

SÉBASTIEN FOURNIER

**L'ÉLEVATION CHRONIQUE DE CORTICOSTÉRONE AUGMENTE LA RÉPONSE  
VENTILATOIRE À L'HYPOXIE CHEZ LES RATS ADULTES MÂLES ET FEMELLES**

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

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

© Sébastien Fournier, 2007

## RÉSUMÉ

La séparation maternelle néonatale (SMN) est une forme de stress qui dérègle le fonctionnement normal de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) résultant en une élévation chronique du niveau de corticostérone (CORT) plasmatique du rat adulte. Cette élévation est spécifique au sexe et elle est exprimée uniquement chez le rat mâle. La SMN mène à d'autres conditions physiologiques comme l'augmentation du chemoréflexe à l'hypoxie par des mécanismes qui demeurent, à ce jour, inconnus. Ce mémoire vise à tester l'hypothèse selon laquelle, chez des rats normaux, l'augmentation chronique des niveaux de CORT plasmatique augmente la réponse ventilatoire à une hypoxie modérée (12% O<sub>2</sub>). Nos résultats indiquent qu'une élévation chronique de CORT augmente significativement la réponse ventilatoire du rat adulte. Tout en appuyant notre hypothèse, ces résultats suggèrent que l'augmentation chronique de CORT contribue au phénotype respiratoire observé auprès des rats SMN.

## ABSTRACT

Early life exposure to a stressor such as neonatal maternal separation (NMS) disrupts the normal functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) and results in chronic elevation of plasma corticosterone (CORT) levels in the adult rat. This elevation is sex-specific and occurs in males only. NMS alone has several functional outcomes including an increase in the hypoxic ventilatory response through mechanisms that remain unknown. In the study presented in this thesis, we hypothesized that chronic increase of CORT alone can amplify the ventilatory response to moderate hypoxia (12% O<sub>2</sub>) in normal adult rats. Results indicate that a chronic elevation of CORT does increase the ventilatory response to hypoxia. Hence, this suggests that chronic CORT elevation can contribute to the respiratory phenotype observed in NMS rats.

## AVANT-PROPOS

Voici la conclusion d'années de persévérance. Il est rare que nous ayons l'occasion de quantifier le travail réalisé, mais je profite de cette opportunité pour vous exprimer mon sentiment du devoir accompli. Ce mémoire vous présente un bouillon de techniques réalisées dans le but de comprendre des éléments fondamentaux de la neurobiologie respiratoire. Il comprend également un article scientifique soumis pour publication. J'en suis l'auteur principal et mon rôle consistait à élaborer le protocole de recherche, à faire les manipulations, à analyser les données, à créer les figures puis à écrire le manuscrit. Le deuxième auteur, Mathieu Allard, a effectué une série de manipulations en début de projet au terme d'un stage d'été. Le troisième auteur, Roumiana Gulemetova, s'est assuré que les manipulations étaient bien effectuées et que le projet roulait bon train. Finalement, les Drs Kinkead et Joseph ont été d'une aide précieuse à l'interprétation des résultats et à la correction du manuscrit.

En premier lieu, je ne pourrais passer sous le silence l'homme incroyable qu'est mon directeur de recherche, le Dr Richard Kinkead. Il m'a redonné goût à la recherche et il m'a fait sentir que je pouvais apporter mon petit grain de sel afin d'accroître et de répandre nos connaissances scientifiques. Je serai à jamais reconnaissant pour tout son aide, sa patience, son intégrité, sa disponibilité et sa générosité. Richard, ce mémoire est ma façon de te transmettre mes plus sincères remerciements. Merci!

J'aimerais également remercier le Dre Aida Bairam pour ses précieux commentaires et je remercie tout spécialement le Dre Roumiana Gulemetova qui fut mon mentor tout au long de cette étude. Je salue et remercie mes collègues de travail, Stéphanie Fournier, Frédéric Dumont et Gaspard Montandon ainsi que Sylvie Viger et Evelyne Vachon à qui revenait les soins et le bon traitement de mes animaux. Merci au Dr André Parent pour sa générosité et grande



disponibilité, et finalement, merci aux évaluateurs de ce mémoire, les Drs Guy Drolet, Vincent Joseph et Richard Kinkead.

Je ne pourrais m'aventurer plus profondément dans l'écriture de ce mémoire sans remercier ma famille, ma mère Lucie, mon beau-père Yvan et mon frère Louis-Samuël qui furent ma source d'inspiration tout au long de ces années d'études. Je leur dois ma ténacité, ma persévérance et le désir d'atteindre toujours les plus hauts sommets. Merci à ma compagne et douce moitié Marie-Josée pour son soutien et son amour. Il n'est pas donné à tout le monde de suivre le rythme de vie d'un homme comme moi et je lui en suis reconnaissant. En souhaitant qu'elle tiendra le coup jusqu'à la fin de mon doctorat! Merci à ces deux petits anges, Camille et Jacob, qui partagent notre quotidien. Leur pureté, leur amour et leur goût de vivre m'aide à passer à travers les moments difficiles. Sur ce, je vous laisse sur ces quelques réflexions qui, je crois, me caractérisent bien. Bonne lecture!

~ SF

The difference between perseverance and obstinacy is that one comes from a strong will, and the other from a strong won't. ~Henry Ward Beecher

The road to success is dotted with many tempting parking places. ~Author Unknown

When the world says, "Give up," Hope whispers, "Try it one more time." ~Author Unknown

People are always blaming their circumstances for what they are. I don't believe in circumstances. The people who get on in this world are the people who get up and look for the circumstances they want, and, if they can't find them, make them. ~G.B. Shaw, *Mrs. Warren's Profession*, 1893

I may not be there yet, but I'm closer than I was yesterday. ~Author Unknown

Keep on going, and the chances are that you will stumble on something, perhaps when you are least expecting it. I never heard of anyone ever stumbling on something sitting down. ~Charles F. Kettering

When you come to the end of your rope, tie a knot and hang on. ~Franklin D. Roosevelt

Fall seven times, stand up eight. ~Japanese Proverb

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES .....	XIII
CHAPITRE I.....	14
INTRODUCTION .....	14
1.3 RÉPONSE VENTILATOIRE À L'HYPOXIE .....	19
1.4 PLASTICITÉ RESPIRATOIRE .....	23
1.5 SÉPARATION MATERNELLE NÉONATALE (SMN).....	26
1.6 L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRÉNALIEN (HHS).....	27
1.7 HYPOTHÈSE .....	31
CHAPITRE II.....	33
CHRONIC ELEVATION OF CORTICOSTERONE AUGMENTS THE VENTILATORY RESPONSE TO HYPOXIA IN MALE AND FEMALE ADULT RATS.....	33
2.1 ABSTRACT .....	34
2.2 RÉSUMÉ .....	35
2.3 INTRODUCTION .....	36
2.4.1 <i>Experimental animals</i> .....	38
2.4.2 <i>Anaesthesia and surgical procedures</i> .....	38
Telemetry.....	38
Pellet Implantation.....	39
2.4.3 <i>Body weight (Wb) profiles</i> .....	39
2.4.4 <i>Ventilatory and metabolic measurements</i> .....	39
2.4.5 <i>Plasma corticosterone measurements</i> .....	40
2.4.6 <i>Data Analysis</i> .....	41
Body Weights.....	41
Ventilatory Activity .....	41
Corticosterone .....	42
Statistical Analysis.....	42
2.5 RESULTS.....	42
2.5.1 <i>Body weight profiles</i> .....	42
2.5.2 <i>Plasma corticosterone</i> .....	43
2.5.3 <i>Breathing frequency (f)</i> .....	45
2.5.4 <i>Tidal Volume (VT)</i> .....	46
2.5.5 <i>Minute Ventilation (<math>\dot{V}_E</math>)</i> .....	47
2.5.6 <i>Metabolic indices</i> .....	49
2.6 DISCUSSION .....	53
2.6.1 <i>Critique of methods</i> .....	53
2.6.2 <i>Effects of placebo versus corticosterone treatment on the hypoxic ventilatory response</i> .....	54
2.6.3 <i>Chronic elevation of plasma corticosterone levels augments the hypoxic ventilatory response</i> .....	55
2.6.4 <i>Perspectives</i> .....	57
CHAPITRE III .....	58
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	58
3.1 DISCUSSION GÉNÉRALE .....	59
3.1.1 <i>Sites d'actions des glucocorticoïdes</i> .....	59
Muscles et /ou adipocytes .....	59
Corps carotidiens (CC) .....	61

Système nerveux central (SNC) .....	62
Dimorphisme sexuel .....	64
3.1.2 <i>Propositions d'approches intégrées pour le traitement de certains désordres cliniques</i> .....	65
Approche pharmacologique .....	65
Approche psychologique et comportementale .....	66
3.1.3 <i>Propositions d'approches expérimentales futures</i> .....	69
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>72</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	Sérotonine
ACTH	Adrenocorticotropin Hormone (corticotropine)
ARNm	Messenger d'acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine Vasopressin (vasopressine)
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (facteur neurotrophique)
BötC	Bötzinger Complex (complex Bötzinger)
BTPS	Température corporelle, pression ambiante, saturée de vapeur d'eau à 37°C
CBG	Corticosterone Binding Globulin (protéine de liaison de la corticostérone)
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CNS/SNC	Central Nervous System (système nerveux central)
CORT	Corticostérone
CPG	Central Pattern Generator (générateur central du patron respiratoire)
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone (corticolibérine)
DA	Dopamine
DEX	Dexaméthasone
DRG	Dorsal Respiratory Group (groupe respiratoire dorsal)
<i>f</i>	Fréquence respiratoire
GABA	Gamma-aminobutyric acid (acide gamma-aminobutyrique)
GR	Glucocorticoid Receptor (récepteur de glucocorticoïdes)

HHS/HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
LC	Locus Coeruleus
N <sub>2</sub>	Azote
NA	Noradrénaline
NGF	Nerve Growth Factor (facteur de croissance des nerfs)
NI	Neonatal Isolation (isolation néonatale)
NTS	Noyau du Tractus (faisceau) Solitaire
O <sub>2</sub>	Oxygène
PaCO <sub>2</sub>	Tension de dioxyde de carbone dans le sang artériel (P : pression partielle; a : artériel)
PaO <sub>2</sub>	Tension de l'oxygène dans le sang artériel (P : pression partielle; a : artériel)
pH	Potentiel Hydrogène
PreBötC	PreBötzinger Complex (complexe pre-Bötzinger)
PRG	Pontine Respiratory Group (groupe respiratoire pontin)
PVN	Paraventricular Nucleus (noyau paraventriculaire de l'hypothalamus)
SMN/NMS	Neonatal Maternal Separation (séparation maternelle néonatale)
SON	Supra Optic Nucleus (noyau supraoptique)
Tb	Température corporelle de l'animal
TH	Tyrosine hydroxylase
Ṡ <sub>E</sub>	Volume minute ou ventilation total (volume expiré par minute)
V <sub>T</sub>	Volume courant (volume d'un cycle respiratoire)
Ṡ <sub>O<sub>2</sub></sub>	Consommation d'oxygène

$\dot{V}_{\text{CO}_2}$	Production de dioxyde de carbone
$\dot{V}_E / \dot{V}_{\text{O}_2}$	Ratio de convection de l'oxygène
$\dot{V}_E / \dot{V}_{\text{CO}_2}$	Ratio de convection du dioxyde de carbone
VLM	Ventrolateral medulla (noyau ventrolatéral de la médulla)
VRG	Ventral Respiratory Group (groupe respiratoire ventral)
VTA	Ventral Tegmental Area (aire tagmentale ventrale)
Wb	Poids corporel de l'animal

## LISTE DES TABLEAUX

- Table 1 L'effet d'une élévation chronique de corticostérone sur des variables métaboliques sélectionnées mesurées auprès de rats mâles et femelles.



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 Neuroanatomie respiratoire du tronc cérébral du rat.
- Figure 1.2 Localisation anatomique et les structures du corps carotidien.
- Figure 1.3 Schéma représentant les composantes impliquées dans la régulation périphérique de la respiration incluant la voie du nerf phrénique et ses motoneurones reliant le diaphragme au tronc cérébral.
- Figure 1.4 Marquage hématoxyline et éosine d'une hypertrophie du corps carotidien.
- Figure 1.5 L'anatomie fonctionnelle de l'axe HHS.
- Figure 2.1 Comparaison, en pourcentage de changement, du poids corporel des rats mâles et femelles, entre le jour 0 et le jour 14 post-opératoire.
- Figure 2.2 Comparaison des niveaux de corticostérone libre (A) et total (B) ainsi que le ratio libre/total (C) pour chaque groupe (contrôle, placebo, corticostérone) entre les rats mâles et femelles.
- Figure 2.3 Comparaison de la fréquence respiratoire pour chaque groupe (contrôle, placebo, corticostérone) en normoxie et en hypoxie entre les rats mâles et femelles.
- Figure 2.4 Comparaison des volumes courants pour chaque groupe (contrôle, placebo, corticostérone) en normoxie et en hypoxie entre les rats mâles et femelles.
- Figure 2.5 Comparaison de la ventilation minute pour chaque groupe (contrôle, placebo, corticostérone) en normoxie et en hypoxie entre les rats mâles et femelles.
- Figure 2.6 L'effet du traitement exprimé en pourcentage de changement par rapport à une valeur correspondante en normoxie sur certaines variables ventilatoires.
- Figure 2.7 Comparaison de  $\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$  allométrique pour chaque groupe (contrôle, placebo, corticostérone) en normoxie et en hypoxie entre les rats mâles et femelles.
- Figure 3.1 Boucle d'intégration spéculative de l'effet du stress sur un individu.

# **CHAPITRE I**

## **Introduction**

## 1.1 PRÉAMBULE

Ce projet de recherche fait suite à une série d'études menées par le Dre Sophie-Émanuelle Genest qui visaient à évaluer l'effet de la séparation maternelle néonatale (SMN) sur le fonctionnement du système de contrôle de la respiration. Ces études ont démontré, entre autres, qu'en condition de base (normoxie), la SMN provoquait une augmentation des taux plasmatiques de l'hormone corticotrope (ACTH) et de la corticostérone (CORT) en plus de révéler une augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Cependant, la SMN eut des conséquences significatives uniquement sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie des animaux mâles. Les mécanismes menant à ce désordre respiratoire sont encore peu connus, particulièrement en ce qui concerne le rôle potentiel des hormones de stress sur le chémoréflexe à l'hypoxie. Est-ce que la manipulation d'une seule de ces hormones augmenterait la réponse ventilatoire à l'hypoxie tout comme la SMN? Afin de répondre à cette question et tenant compte du dimorphisme sexuel rencontré lors des études précédentes, nous avons mesuré l'impact d'une augmentation chronique de CORT sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie auprès de rats adultes mâles et femelles qui, contrairement aux rats SMN, n'ont subi aucun stress néonatal.

## 1.2 LA RESPIRATION

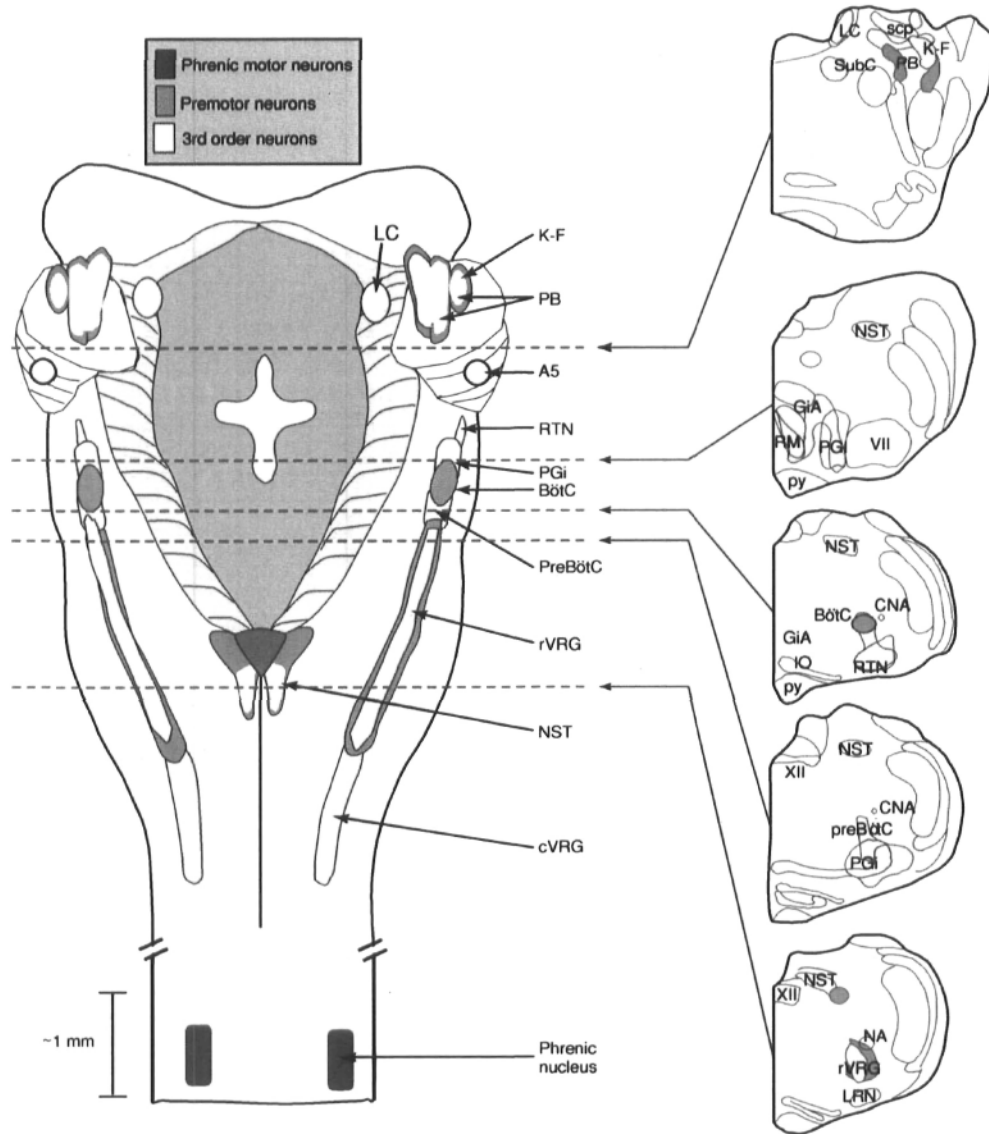
La respiration est ce qui permet à l'organisme vivant d'échanger l'oxygène et le dioxyde de carbone avec l'environnement. Cela assure un équilibre entre ces gaz dans le corps ce qui garantit le maintien d'un métabolisme élevé à des degrés qui s'écartent peu des valeurs optimales. Cet échange gazeux permet aux organismes aérobiques, comme la plupart des animaux, les insectes, les champignons et plusieurs bactéries, d'effectuer la respiration cellulaire qui est l'ensemble des réactions biochimiques assurant la fourniture de molécule d'adénosine triphosphate (ATP) pour le métabolisme cellulaire. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder des substrats énergétiques comme les sucres et les gras afin d'en extraire de l'énergie sous forme d'ATP. Compte tenu du métabolisme très élevé des mammifères, le maintien de l'homéostasie métabolique nécessite une respiration et un échange perpétuel des gaz afin de préserver l'équilibre des constantes physiologiques. La conservation de cet équilibre requiert l'apport d'O<sub>2</sub> vers l'organisme et l'élimination de CO<sub>2</sub> dans le milieu extérieur. Bien qu'il existe une composante volontaire, le contrôle de la respiration se fait principalement de façon involontaire et il est guidé par le cerveau. Des variations trop prononcées des taux des gaz sanguins provoqueront une réponse ventilatoire. Par exemple, une diminution de la pression partielle d'O<sub>2</sub> artérielle (PaO<sub>2</sub>), communément appelé hypoxie, amène le système de régulation de la ventilation à répondre par une augmentation de la ventilation. En revanche, une augmentation de la pression partielle de CO<sub>2</sub>, appelé hypercapnie, force aussi le système de régulation de la ventilation à augmenter la ventilation de façon à expulser davantage de CO<sub>2</sub>.

Physiologiquement, le rythme respiratoire est généré au niveau de la surface ventrale de la médulla dans le complexe de pré-Bötzinger (preBötC). Les neurones de cette structure auraient un rôle « pace-maker » qui contribuerait à la génération du rythme respiratoire (Rekling, J.C., 1998; Koshiya, N., 1999). L'information rythmique créée par le complexe preBötC voyage ensuite vers les neurones prémoteurs qui contrôlent les neurones moteurs respiratoires de la moëlle épinière et du tronc

cérébral. Les neurones prémoteurs sont localisés le long de la colonne rostrocaudale nommée groupe respiratoire ventral (VRG) (Fig. 1.1). La partie rostrale de cette colonne stimule les nerfs moteurs phréniques et thoraciques alors que la partie caudale excite les neurones expiratoires thoracolombaires. Situé rostrale au preBötC à l'extrémité de la colonne VRG se trouve le complexe Bötzing (BötC). Ce dernier modulerait la respiration en inhibant les neurones prémoteurs et moteurs durant la phase silencieuse de la respiration (Ezure, K., 2004).

Par l'intermédiaire du noyau du faisceau solitaire (NTS), qui reçoit les afférences du nerf du sinus carotidien, le groupe respiratoire dorsal (DRG), situé dans la partie centrale de la région ventrolatérale du NTS (Bianchi, A.L., *et al.*, 1995), contrôle les motoneurones crâniens. Ces derniers innervent les muscles de la langue, du larynx et du pharynx, tous responsables de la résistance des voies aériennes supérieures en favorisant une dilatation ou une constriction.

Un autre noyau important serait aussi impliqué dans la respiration. Le noyau Kölliker-Fuse (K-F) (Fig. 1.1), faisant partie du groupe respiratoire pontin (PRG), agirait au niveau de la terminaison de l'inspiration et aurait un rôle dans la communication entre le diencephale et le mésencéphale (Bianchi, A.L., *et al.*, 1995). Entre autres, il serait responsable de transmettre l'information provenant de l'hypothalamus vers les centres respiratoires *via* le noyau réticulaire et le noyau raphé (Cohen, M.I. & Shaw, C.F., 2004; Dutschmann, M. & Herbert, H., 2006).

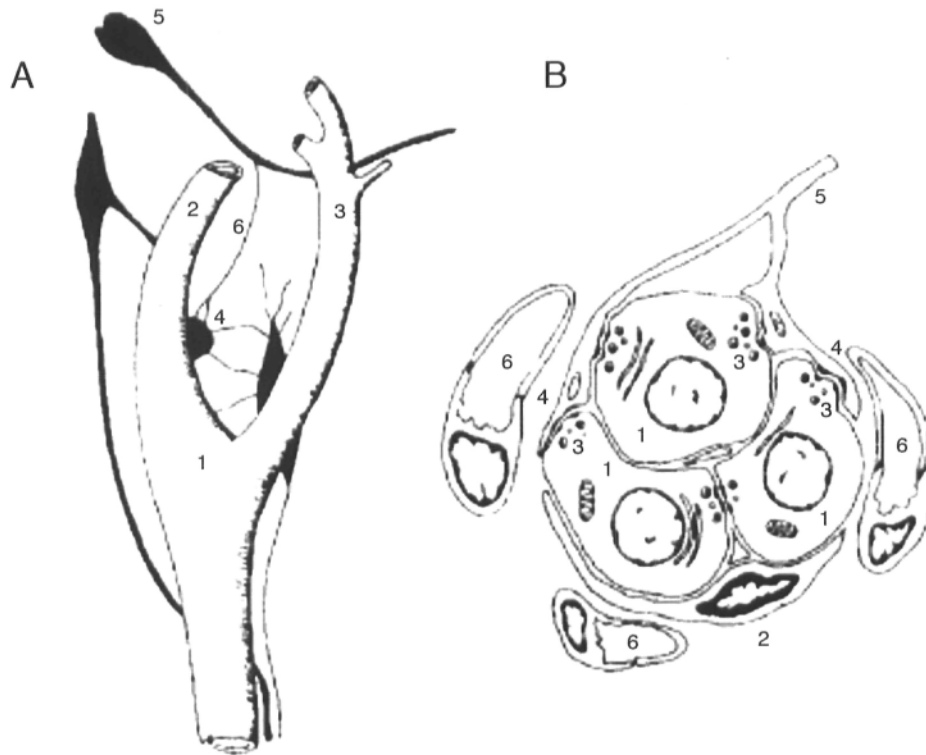


**Fig. 1.1 :** Neuroanatomie respiratoire du tronc cérébral du rat. Vues dorsale et transversale. A5, groupe cellulaire catécholaminergique; BötC, complexe Bötzingier; CNA, noyau caudal ambigu; cVRG, groupe respiratoire caudo-ventral; GiA, subdivision pars alpha du noyau réticulaire gigantocellulaire; IO, olive inférieur; K-F, noyau Kölliker-Fuse; LC, locus ceruleus; LRN, noyau réticulaire latéral; NA, noyau ambigu; NST, noyau du faisceau solitaire; PB, noyau parabranchial; PGI, noyau réticulaire paragigantocellulaire; py, faisceau pyramidal; preBötC, complexe pre-Bötzingier; RM raphé magnus; RTN, noyau rétrotrapézoïde; rVRG, groupe respiratoire rostro-ventral; scp, pédoncule supérieur du cervelet; SubC, subceruleus; VII, noyau facial; XII, noyau hypoglossal. Tiré de Feldman & McCrimmon, 1999.

### 1.3 RÉPONSE VENTILATOIRE À L'HYPOXIE

La réponse ventilatoire à l'hypoxie est une réponse physiologique mise en œuvre par le système respiratoire afin de répondre à une chute d'oxygénation artérielle. L'exposition aiguë à un milieu hypoxique produit une hausse de l'état d'éveil, l'augmentation de la ventilation, l'augmentation de l'activité sympathoexcitatoire chez l'humain (Xie, A., *et al.*, 2000; Shoemaker, J.K., *et al.*, 2002; Cutler, M.J., *et al.*, 2004; Leuenberger, U.A., *et al.*, 2005) et, dans certaines conditions, une chute régulée de la température corporelle (anapyrexie). Ces réponses (hormis l'anapyrexie) sont dépendantes de l'activation des chémorécepteurs périphériques. L'ensemble de ces réponses vise à favoriser l'apport d'oxygène au niveau pulmonaire (adaptation respiratoire) et la redistribution des débits sanguins artérielles (adaptation cardiovasculaire) vers les organes les plus sensibles à la chute de  $PO_2$ .

Toute baisse de la pression artérielle de l' $O_2$  ( $PaO_2$ ) est détectée par les corps carotidiens (CC), situés à la bifurcation de l'artère carotide interne et externe (Fidone S. & Gonzalez, C., 1986) (Fig. 1.2A). Les CCs sont très vascularisés. Malgré leur faible taille, chaque CC reçoit un apport sanguin relatif 5-6 fois plus élevé que le cerveau (Gonzalez, C., *et al.*, 1994). Cette caractéristique permet de subvenir à une consommation d'oxygène élevée dans le CC (Gonzalez, C., *et al.*, 1994) tout en conservant un gradient d'oxygène artéro-veineux négligeable.

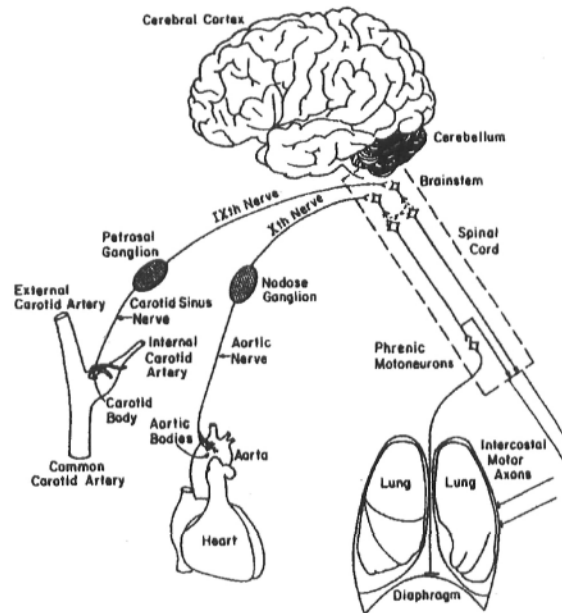


**Fig. 1.2 :** Localisation anatomique et les structures du corps carotidien. A : Vue frontale de la bifurcation de l'artère carotide droite du lapin. L'artère carotide commune (1) se divise en l'artère carotide interne (2) et externe (3). Le corps carotidien (4) reçoit des innervations sensorielles du ganglion pétreux (5) *via* le nerf du sinus carotidien (6). B : Image d'un amas de cellules formées de trois cellules chémoréceptrices (type I) (1) et d'une cellule sustentaculaire (type II) (2). Les cellules chémoréceptrices possèdent des vésicules denses et munies d'un noyau clair (3). Elles sont fréquemment localisées dans des régions de contacts avec les terminaisons nerveuses sensorielles (4) du nerf du sinus carotidien (5). Les amas de cellules sont entourés de plusieurs capillaires (6). Tiré de Gonzalez, C. *et al.*, 1992.

Chez l'humain, en conditions normales, la  $PaO_2$  se situe autour de 104 mm Hg. L'activité des CCs est alors minimale. Lors d'une faible baisse de la  $PaO_2$ , les CCs s'activent davantage, mais ne déclenche pas de réponse marquée. Cependant, une diminution de la  $PaO_2$  pour atteindre environ 60 mm Hg provoque l'augmentation de l'activité nerveuse provenant des CCs. De plus, les CCs reçoivent des innervations sympathiques pouvant contrôler le débit sanguin et d'autres fonctions (Gonzalez, C., *et al.*, 1994). Les CCs contiennent deux types de corps cellulaires : les cellules



sustentaculaires et les cellules glomiques (Kondo, H., *et al.*, 1982) (Fig. 1.2B). Les cellules sustentaculaires, ou type II, sont des cellules gliales situées en périphérie des îlots de cellules glomiques (type I). Elles ont un noyau de forme aplatie et une chromatine condensée. Les cellules glomiques sont les cellules chémosensibles. Elles présentent de nombreuses particularités morphologiques qui en font des cellules à forte activité sécrétoire. Entre autres, elles sont rondes, possèdent un noyau clair, un appareil de Golgi développé et un cytoplasme complexe où apparaissent diverses vésicules de stockage à noyau dense (dense-core vesicles) concentrés à proximité des espaces de contacts synaptiques (Lever, J.D. & Boyd, J.D., 1957; Gonzalez, C., *et al.*, 1994). La sensibilité des cellules glomiques aux variations de  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$ , et de pH active des canaux ioniques (potassique, sodique, calcique) sensibles à l'oxygène (Neubauer, J.A. & Sunderram, J., 2004). Ces dernières libèreraient un neurotransmetteur excitatoire qui dépolariserait les afférences terminales du nerf du sinus carotidien (Powell, F.L., 2007). Les potentiels d'actions atteignent alors les centres respiratoires du système nerveux central (SNC) et stimuleraient la ventilation. Le nerf du sinus carotidien est formé par la liaison des fibres sensorielles et baroréceptrices des CCs. Ces fibres se jettent dans le nerf glossopharyngien (IX) au niveau du ganglion pétreux. Du ganglion pétreux, les fibres motrices projettent dans la région caudale du NTS qui est localisé à la base du tronc cérébral alors que d'autres fibres projettent vers le noyau de la médulla ventrolatérale (VLM) (Branchi, A.L., *et al.*, 1995). Le NTS est une structure d'intégration centrale impliquée dans la régulation de plusieurs autres fonctions du système nerveux autonome et de certaines fonctions neuroendocrines. Il forme des connections synaptiques avec des régions qui participent à la régulation de la respiration (complexe préBötC, complexe Bötzing, motoneurones phréniques). Les motoneurones phréniques relaient l'information vers le nerf phrénique afin d'innover le diaphragme et ainsi stimuler sa contraction lors de l'inspiration (Fig. 1.3).

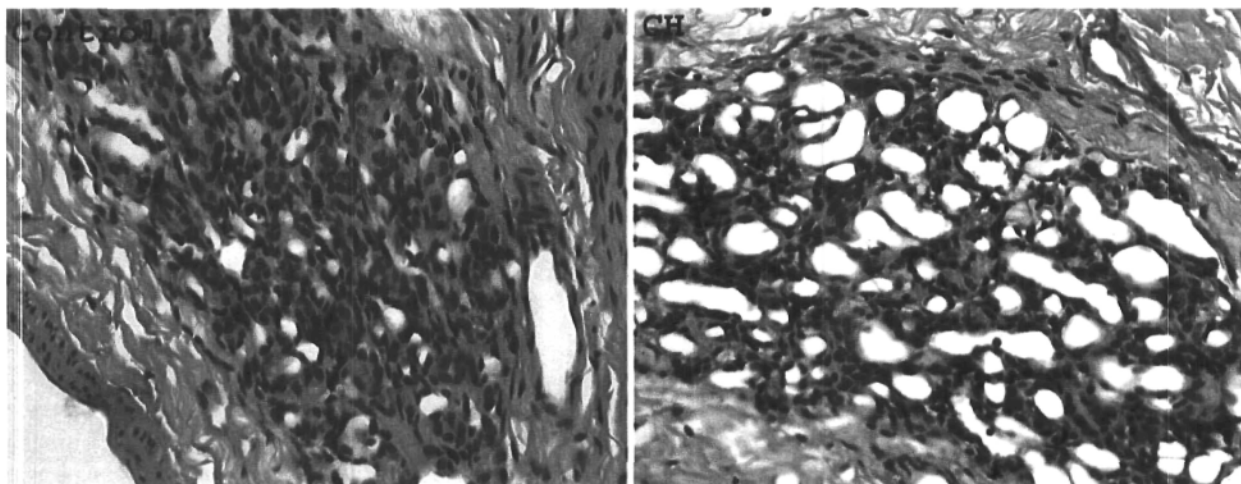


**Fig. 1.3 :** Schéma représentant les composantes impliquées dans la régulation périphérique de la respiration incluant la voie du nerf phrénique et ses motoneurones reliant le diaphragme au tronc cérébral. Tiré de Feldman & McCrimmon, 2003.

Tout comme les CCs, qui détectent les variations de  $\text{PaO}_2$  au niveau périphérique, le SNC est également composé de structures comme la VLM, le NTS et le pré-BötC (Solomon, J.C., *et al.*, 2000; Neubauer, J.A. & Sunderram, J., 2004) sensibles aux variations d' $\text{O}_2$ . Ces variations activeraient les mêmes mécanismes que les CCs soit des canaux ioniques sensibles à l'oxygène (Neubauer, J.A. & Sunderram, J., 2004). Ainsi, placer un animal en milieu hypoxique active à la fois les structures chémosensibles périphériques et centrales qui régulent principalement la fréquence respiratoire de l'animal (Hlastala, M. & Berger, A., 1996).

## 1.4 PLASTICITÉ RESPIRATOIRE

Le système de contrôle de la respiration n'est pas qu'un simple relais de structures dont le mode de fonctionnement est fixe et permanent. Le système de régulation de la respiration peut s'adapter à un environnement précis. Cette propriété, la plasticité, est définie comme étant un changement, à court ou à long terme, dans les structures, les connections ou encore dans la fonction d'un système neuronal respiratoire (Kinkead, R., *et al.*, 2001; Ling, L., *et al.*, 2001; Feldman, J.L., *et al.*, 2003). La plasticité permet d'apporter des changements dans les performances respiratoires motrices basées sur l'expérience (Mitchell, G.S. & Johnson, S.M., 2003). Ce mécanisme permet de récupérer suite à des blessures ou à des lésions survenues à maturité ou pendant le développement. La plasticité permet une adaptation aux changements occasionnés par la maladie, le vieillissement ou un environnement particulier comme l'altitude. En contrepartie, la plasticité peut mener à un fonctionnement non optimal, voir inapproprié, contribuant ainsi à divers états pathologiques. La plasticité fonctionnelle respiratoire implique des mécanismes moléculaires de chémoréception, des canaux ioniques et des neurotransmetteurs dans le CC (Bisgard, G.E., 2000; Dinger, B., *et al.*, 2003; Powell, F.L., 2007). L'hypoxie chronique occasionne des changements morphologiques majeurs dans les CCs incluant une hypertrophie et une hyperplasie cellulaires des tissus chémosensibles (Wang, Z.-Y. & Bisgard, G.E., 2002; Fig. 1.4).



**Fig. 1.4 :** Marquage H&E (Hématoxyline et Éosine) du corps carotidien du rat contrôle à gauche et du corps carotidien de rat après une semaine d'hypoxie chronique à droite. Tiré de Wang, Z-Y. & Bisgard, G. E., 2002.

En période néonatale, la plasticité respiratoire est critique. Une stimulation excessive ou insuffisante des réflexes respiratoires pendant les trois premières semaines post-partum chez le rat peut entraîner des altérations temporaires ou permanentes dans le développement du système de contrôle de la respiration (Carroll, J.L., 2003). La maturation complète du système respiratoire s'effectue lors des dernières semaines de gestation (entre 30 et 36 semaines chez l'humain) lorsqu'une dose massive de glucocorticoïdes produite par le fœtus permet le développement final des poumons. Une naissance prématurée pourrait empêcher cette étape cruciale du développement et ainsi provoquer un retard. Ce retard peut être atténué ou évité si l'on administre un traitement de glucocorticoïdes suffisamment longtemps avant l'accouchement. Une naissance avant terme peut provoquer des reflux gastro-intestinaux, des troubles cardio-respiratoires, de la bradycardie, de la désaturation d'oxygène et de l'instabilité respiratoire comme dans le cas des apnées de prématurité (Martin, R.J., *et al.*, 2004; Finer, N.N., *et al.*, 2006). L'apnée du prématuré est commune (>50% des enfants prématurés et presque universelle chez les enfants de <1000 g à la naissance), mais elle peut maintenant être traitée par l'administration de citrate de caféine en période néonatale (Finer, N.N., *et al.*, 2006).

Bien que certains traitements existent pour contrer les effets néfastes d'un retard respiratoire, le système de contrôle de la respiration n'est optimal que s'il atteint la maturité (43-44 semaines post-conception chez l'humain) par la présence de stimuli chémosensoriels adéquats en période critique du développement.

Un cas typique d'adaptation respiratoire à l'âge adulte est celui d'une respiration en altitude. Les gens qui vivent au niveau de la mer inspirent l'air à une pression barométrique de 760 mm Hg, l'équivalent à une  $PO_2$  artérielle d'environ 104 mm Hg. Lorsque ces gens se déplacent vers un milieu haut en altitude, comme à La Paz en Bolivie, la pression barométrique à une altitude de 3600 mètres est d'environ 500 mm Hg, l'équivalent à une  $PO_2$  artérielle de 54 mm Hg. Cette condition d'hypoxie chronique entraîne une forte activation des CCs et l'augmentation de la ventilation (Joseph, V., *et al.*, 2000). L'augmentation de la ventilation provoque une chute du  $CO_2$  artérielle et une hausse du pH sanguin. Inversement, ces deux effets réduisent la respiration et stabilisent l'effet stimulant de l'hypoxie. Cependant, des conditions hypoxiques prolongées mènent à l'acclimatation ventilatoire à l'hypoxie (Bisgard, G.E., 1994; Lahiri, S., *et al.*, 2000). En effet, l'affectation à un milieu hypoxique pendant plus d'une semaine provoque une augmentation progressive du débit ventilatoire qui s'accompagne d'une importante augmentation de la sensibilité des chémorécepteurs périphériques à l'hypoxie et d'une hypertrophie marquée des CCs.

La plasticité respiratoire permet la malléabilité et l'adaptation du système de contrôle de la respiration à des conditions qui s'éloignent de la normale. Il s'ajuste constamment aux variations environnementales. Jusqu'à récemment, ces phénomènes de plasticité ont été étudiés dans des environnements qui affectaient directement le système respiratoire tel que l'hypoxie intermittente ou l'altitude. Toutefois, des études récentes démontrent que les conditions ou stimuli pouvant affecter le développement du système de contrôle respiratoire ne sont pas limités aux stimuli respiratoires puisque certains stress comme la séparation maternelle néonatale (un modèle de perturbation neurosensorielle) peuvent aussi affecter le développement de ce système de façon significative.

## 1.5 SÉPARATION MATERNELLE NÉONATALE (SMN)

La SMN est une forme de stress qui perturbe le développement normal de l'axe HHS et occasionne un dérèglement fonctionnel à long terme de ce dernier (Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Kinkead, R., *et al.*, 2005a). Plusieurs études soutiennent que la perturbation des interactions mère-bébé influence le développement et le fonctionnement de l'axe HHS tout au long de la vie adulte de l'animal (Liu, D., *et al.*, 1997; Caldji, C., *et al.*, 1998; Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999; Caldji, C., *et al.*, 2000b). La SMN affecte davantage les rats mâles (Kuhn, C.M. & Schanberg, S.M., 1998; Wigger, A. & Neumann, I.D., 1999; Matthews, S.G., 2001) et les conséquences de cette dernière sont directement proportionnelles à la durée de la séparation (Schmidt, M., *et al.*, 2004). Des séparations de 3h/jr pendant 10 jours consécutifs déclenchent des altérations au niveau des réponses comportementales et neuroendocriniennes lorsque l'animal est à nouveau confronté à un stress à l'âge adulte. Un seul épisode de SMN d'une durée variant d'une à quatre heures augmente considérablement les niveaux de CORT du raton, mais n'affecte pas l'expression de corticolibérine (CRH) au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) (Liu D., *et al.*, 1997; Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999). Une séparation chronique mène à la sensibilisation de l'axe HHS et génère des effets différents d'un seul épisode de séparation. Entre autres, les effets à long terme de la séparation maternelle incluent des niveaux d'anxiété plus élevés lorsque l'animal est réévalué à l'âge adulte sur des tests psychomoteurs comme le labyrinthe en plus élevé (elevated plus-maze) ou encore sur des champs circulaires ouverts (circular open field) (Patchev, V.K., *et al.*, 1997; Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999; Caldji, C. *et al.*, 2000a; Caldji, C. *et al.*, 2000b; Liu, D., *et al.*, 2000; Huot, R.L., *et al.*, 2002; Pryce, C.R., *et al.*, 2002). La SMN cause également une hyperactivité de l'axe HHS en réponse à un agent stressueur (Patchev, V.K., *et al.*, 1997; Liu, D., *et al.*, 2000; Huot, R.L., *et al.*, 2002; Pryce, C.R., *et al.*, 2002) en augmentant l'expression du CRH dans le PVN (Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999) et en diminuant les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) impliqués dans le mécanisme de rétrocontrôle de la synthèse et de la libération du CRH dans le PVH (Liu, D., *et al.*, 1997; Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999). Or, les

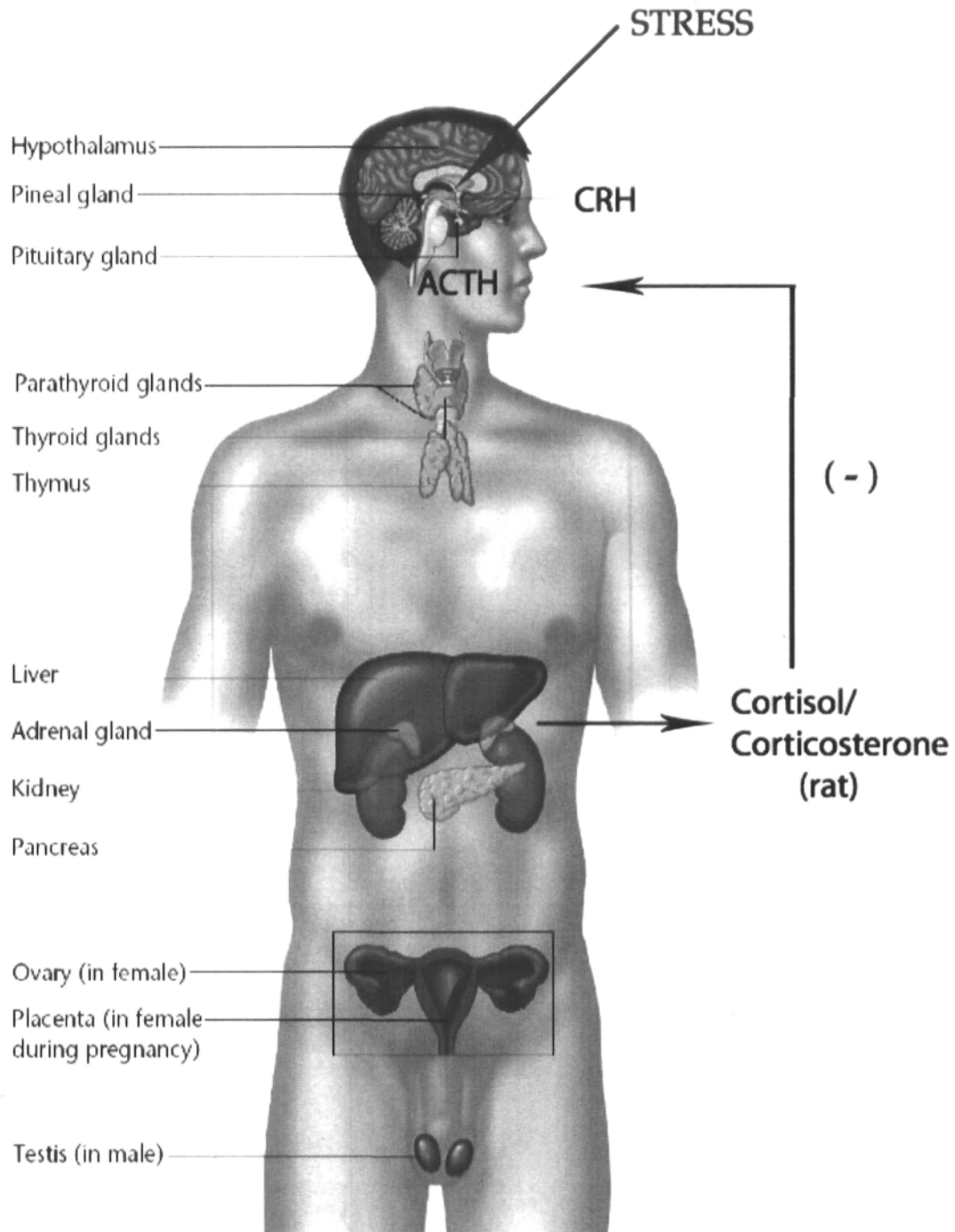
interactions mère-bébé s'avèrent fondamentales dans le développement de la réponse au stress du raton et dictent ainsi les caractéristiques comportementales de ce dernier à l'âge adulte. Cependant, les conséquences de la SMN ne sont pas limitées aux perturbations de l'axe HHS et aux problèmes comportementaux. Comme il sera discuté ci-dessous, la SMN affecte aussi le développement du système de contrôle de la respiration (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Puisque ces effets peuvent impliquer des éléments neuronaux communs aux deux systèmes (axe HHS et contrôle respiratoire) la prochaine section discutera du fonctionnement de l'axe HHS en détails.

## 1.6 L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN (HHS)

L'axe HHS contrôle les principales fonctions neuroendocrines. À ce titre, c'est l'une des voies effectrices impliquée dans la réponse au stress. L'axe HHS orchestre les réponses physiologiques et contribue ainsi à maintenir l'homéostasie de l'organisme en ces périodes de stress aiguës ou chroniques (Miller, D.B. & O'Callaghan, J.P., 2002). Le terme stress est communément utilisé pour référer à des situations qui incluent un stresser (stimulus) et les réponses physiologiques et comportementales produites par ce stresser. Le stress est donc défini par sa répercussion sur l'organisme, non pas uniquement par l'impact du stimulus lui-même, mais aussi par les effets néfastes qu'occasionne la réponse au stress (Drolet, G., *et al.*, 2001). L'exposition à un agent stresser provoque l'échange d'informations sensorielles entre des structures précises du cerveau et du corps. D'abord, ces informations sont transmises à l'hypothalamus par des afférences viscérales et somatosensorielles en provenance de plusieurs noyaux noradrénergiques du tronc cérébral, des noyaux intrahypothalamiques, de projections limbiques ainsi que des organes circumventriculaires (Cullinan, W.E., *et al.*, 1993; Sawchenko, P.E., *et al.*, 2000). Suite à l'activation de ces voies neuronales, les neurones parvocellulaires du noyau PVN sécrètent le CRH dans la circulation de la porte hypophysale (Swanson, L.W., *et al.*, 1983; Sawchenko, P.E. & Bohn, M.C., 1989) (Fig. 1.5). Le CRH stimule

alors la synthèse et la libération d'ACTH de l'hypophyse antérieure. L'ACTH atteint la glande corticosurrénale *via* la circulation sanguine où elle activera finalement la production et la libération de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes, le cortisol chez les primates et la corticostérone chez les rongeurs, jouent un rôle de rétrocontrôle négatif au niveau des GRs de l'hippocampe, de l'hypothalamus et de l'hypophyse antérieure. Comme ces récepteurs sont des régulateurs transcriptionnels de l'expression de certains gènes comme le gène du CRH, ils régularisent ainsi l'homéostasie de l'axe HHS en diminuant, au besoin, l'expression génique du CRH en provenance de l'éminence médiane du PVN. Simultanément, les glucocorticoïdes mobilisent les substrats énergétiques durant le stress et agissent en synergie avec les catécholamines de la glande médullosurrénale pour élever le taux de glucose sanguin ainsi que la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Le PVH est le centre d'intégration des noyaux de l'hypothalamus qui a comme principale fonction le maintien de l'homéostasie (Schlenker, E.H., 2005) alors que la CORT et le CRH sont considérés comme d'importantes hormones impliquées dans la réponse au stress.





**Figure 1.5 :** Anatomie fonctionnelle de l'axe hypophysio-hypothalamo-surrénalien (HHS) en réponse à un stress. Adapté de ScienceBlogs LLC.  
 (source : [http://scienceblogs.com/clock/2006/06/bio101\\_lecture\\_6\\_physiology\\_re.php](http://scienceblogs.com/clock/2006/06/bio101_lecture_6_physiology_re.php))

Le PVN est également impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, du taux métabolique, de la thermorégulation et dans le contrôle du système nerveux autonome incluant les fonctions cardio-vasculaires et respiratoires (Yeh, E.R., *et al.*, 1997; Kc, P., *et al.*, 2002; Mack, S.O., *et al.*, 2002). Le PVN communique avec d'autres noyaux hypothalamiques tels que le noyau dorsomédial, le noyau arqué et l'hypothalamus caudal (Baker, R.A. & Herkenham, M., 1995; Herman, J.P., *et al.*, 2002). Il reçoit des afférences indirectes des régions rostrales du cerveau comme le système limbique et l'amygdale, ainsi que des afférences directes des régions caudales du tronc cérébral comme la région A5 du pons, la partie ventrolatérale de la médulla, le locus ceruleus (LC) et le NTS (Herman, J.P., *et al.*, 2003). Tout particulièrement, le NTS est considéré comme un centre majeur impliqué dans le contrôle de la respiration. À cause de ses afférences en provenance du PVN, le système de contrôle de la respiration peut être perturbé dépendamment des agents stressés présents. Or, les communications entre le PVN et les noyaux du tronc cérébral sont primordiales afin de maintenir la régulation de plusieurs systèmes vitaux comme la respiration. Ces communications neuronales ont conduit notre laboratoire à postuler qu'un stress néonatal, comme la séparation maternelle, affecterait le développement du système de contrôle de la respiration.

Les études du Dre Genest, menées dans notre laboratoire en 2004 et en 2007, ont permis de confirmer l'effet de la SMN sur le développement du système respiratoire. Ces études ont démontré que la SMN exerçait un effet sexe-spécifique sur les fonctions homéostatiques vitales comme la régulation cardio-respiratoire (Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Genest, S.-E., *et al.*, 2007). Nous apprenons que les rats NMS mâles (et non les femelles) produisent un volume courant ( $V_T$ ) et des réponses du nerf phréniques augmentées en hypoxie par rapport aux animaux contrôles. D'ailleurs, lorsque comparés aux contrôles, les rats NMS mâles démontrent une réponse ventilatoire à l'hypoxie 25% plus élevée alors que les femelles NMS démontrent une réponse 30% plus basse (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). L'effet est réciproque en hypercapnie alors que les rats NMS mâles démontrent une ventilation minute ( $\dot{V}_E$ ) 47% plus faible que les contrôles causée par une diminution du  $V_T$  (22%). En revanche, les

femelles NMS démontrent une  $\dot{V}_E$  et un  $V_T$  augmenté de 63% et 18% respectivement (Genest, S.-E., *et al.*, 2007). Ces différences indiquent que les effets de la SMN sur le développement du contrôle respiratoire ne se limitent pas aux chémorécepteurs périphériques. À ce sujet, des analyses sur l'ARN messenger (ARNm) de la tyrosine hydroxylase (TH : enzyme limitant la vitesse de biosynthèse des catécholamines) et sur l'expression des récepteurs  $D_2$  de la dopamine suggèrent que la SMN affecte probablement la neurotransmission dopaminergique dans le corps carotidien (Kinkead, R., *et al.*, 2005c). L'effet marqué de la SMN sur la ventilation des mâles, et non des femelles, laisse aussi présumer une implication des hormones ovariennes en tant qu'un des nombreux facteurs contribuant à la programmation du système physiologique (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Ces études ont aussi démontré que la SMN provoquait l'élévation des niveaux plasmatiques d'ACTH et de CORT (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Or, l'effet de la SMN sur le développement du système de contrôle respiratoire aurait pu être orchestré par l'élévation chronique de l'ACTH ou de CORT. Est-ce qu'une élévation chronique d'une de ces hormones de l'axe HHS impliquées dans la réponse au stress contribuerait à reproduire le même phénotype respiratoire et le même dimorphisme sexuel que la SMN?

## 1.7 HYPOTHÈSE

Des études démontrent que la perturbation des interactions mère-bébé influence le développement et le fonctionnement de l'axe HHS tout au long de la vie adulte de l'animal. De plus, compte tenu des résultats hormonaux soulevés lors de ces études et lors d'études antérieures dans notre laboratoire, nous avons décidé d'isoler et de manipuler une seule hormone de l'axe HHS impliquée dans les résultats du protocole de séparation maternelle. Nous proposons l'hypothèse qu'une élévation chronique des niveaux de cette hormone, la corticostérone, une des hormones impliquées dans la réponse au stress, puisse à elle seule augmenter la réponse

ventilatoire à l'hypoxie. Puisque les résultats antérieurs présentaient un important dimorphisme sexuel, le travail suivant inclut des études sur les mâles et les femelles.

## CHAPITRE II

### **Chronic elevation of corticosterone augments the ventilatory response to hypoxia in male and female adult rats**

*Sébastien Fournier, Mathieu Allard, Roumiana Gulemetova, Vincent Joseph, and Richard Kinkead*

Department of Pediatrics, Université Laval, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Quebec City, QC, Canada

## 2.1 ABSTRACT

Perinatal stress disrupts normal development of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA). Adult male (but not female) rats previously subjected to a stress such as neonatal maternal separation (NMS) are characterized by chronic elevation of plasma corticosterone (CORT) levels and an abnormally elevated hypoxic ventilatory response through mechanisms that remain unknown. The present study tested the hypothesis that a chronic increase of plasma CORT levels alone augments the ventilatory response to hypoxia in adult rats. Three groups of Sprague Dawley® male and female rats were used (control, placebo, and CORT implants). Rats subjected to chronic CORT elevation received a subcutaneous CORT implant (300 mg) 14 days prior to ventilatory measurements, whereas sham-operated rats received placebo implants. Controls received no treatment. Plasma CORT levels and body weight profiles were measured to assess protocol efficiency. Whole body plethysmography was used to measure ventilatory activity and metabolic indices during normoxia following by a 20-min period of moderate hypoxia (12% O<sub>2</sub>). Both male and female rats implanted with CORT showed a ventilatory response to hypoxia higher than untreated rats; however, this effect was greater in males. In this group, augmentation of the ventilation response was mainly due to a larger tidal volume response, whereas in females, CORT treatment increased the breathing frequency response. Taken together, these data show that chronic elevation of CORT alone increases the ventilatory response to hypoxia, but in a sex-specific manner. These data raise important questions regarding the potential link between HPA axis dysfunction and respiratory disorders related to abnormal ventilatory chemoreflex.

## 2.2 RÉSUMÉ

La séparation maternelle néonatale (SMN) est une forme de stress qui perturbe le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS) résultant en une élévation chronique du niveau de corticostérone dans le plasma du rat adulte. Cette élévation est spécifique au sexe et est exprimée uniquement chez le rat mâle. La SMN provoque d'autres problèmes physiologiques comme l'augmentation du chemoréflexe à l'hypoxie par des mécanismes qui demeurent, à ce jour, inconnus. Cette étude teste l'hypothèse selon laquelle l'augmentation chronique des niveaux de corticostérone (CORT) plasmatique augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Les rats assujettis à une élévation de CORT ont reçu 300 mg d'un implant de CORT sous-cutané 14 jours avant le début de l'enregistrement ventilatoire, alors que les rats placebo recevaient un implant placebo. Des échantillons de sang prélevés après l'expérience ont permis de valider notre protocole. Les mesures ventilatoires ont été effectuées par pléthysmographie en condition de base (normoxie) et en hypoxie modérée (12% O<sub>2</sub>). L'impact du sexe sur ces effets a été évalué en comparant les résultats obtenus chez les mâles *versus* ceux des femelles. Les rats implantés avec de la CORT ont démontrés une réponse ventilatoire à l'hypoxie plus élevée que celle des rats placebos et contrôles et ce, tant chez les rats mâles que femelles. Ces données démontrent qu'une élévation chronique de CORT exogène affecte, à elle seule, la réponse ventilatoire à une hypoxie modérée de 12%, et ce tant pour les mâles que les femelles. Ceci suggère qu'une élévation chronique de CORT pourrait donc contribuer au phénotype respiratoire observé auprès des rats SMN.

## 2.3 INTRODUCTION

Early life exposition to a stressor has several and persistent consequences on central nervous system (CNS) development. The impact of exposing offspring to different forms of stress has been addressed using various models such as neonatal maternal separation (NMS) (Wigger, A. & Neuman, I.D., 1999; Lehmann, J. & Feldon, J., 2000) and neonatal isolation/deprivation (NI) (Lai, M.C., *et al.*, 2006). NMS and NI are similar experimental paradigms extensively used to show that mother-pup interactions play an important role in early life programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) (Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Lai, M.C., *et al.*, 2006; Slotten, H.A., *et al.*, 2006). NMS disrupts development of the circuits regulating HPA activity and ultimately results in a persistent increase in blood plasma CORT levels (Francis, D.D., *et al.*, 1999; Francis, D.D. & Meaney, M.J., 1999; Liu, D., *et al.*, 2000), a condition that predisposes to several anomalies ranging from anxiety, hypertension (Hofer, M.A., 1994; Boccia, M.L. & Pedersen, C.A., 2001; Anand, D., *et al.*, 2003) and immunosuppression (Brown-Borg, H.M., *et al.*, 1993; Wrona, D. & Trojnar, W., 2005).

We have shown that NMS has functional consequences that extend beyond behaviour since it alters the normal development of the animal's respiratory control system also (Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Kinkead, R., *et al.*, 2005a; Kinkead, R., *et al.*, 2005b; Kinkead, R., *et al.*, 2005c). The neuroendocrine and respiratory phenotype that develop following NMS include an increase in blood plasma ACTH and CORT as well as an increase in the hypoxic ventilatory response. These traits are sex-specific as they are apparent in males only; however, the mechanisms underlying this manifestation of respiratory plasticity remain unknown (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). In light of these data, we tested the hypothesis that chronic CORT elevation is sufficient to augment the ventilatory response to hypoxia in the adult rat. To do so, we used a pharmacological approach to chronically increase plasma CORT levels in male and female rats by implanting slow release CORT pellets to raise hormonal level within a physiologically relevant range. We also used whole body plethysmography to compare ventilatory activity and metabolic indices under normoxic and hypoxic



conditions of awake, unrestrained rats subjected to the CORT treatment as opposed to control and placebo-treated animals.

Results show that, in adult male rats, chronic elevation of plasma CORT alone augments the hypoxic ventilatory response. In females, however, the CORT treatment altered specific components of the hypoxic response, but the changes in minute ventilation were not significant. These discrepancies further illustrate the differences in male and female physiology. These results have been reported previously in abstract form (Fournier, S., *et al.*, 2006).

## 2.4 MATERIALS AND METHODS

### 2.4.1 Experimental animals

Experiments were performed on 44 adult Sprague-Dawley® rats aged between 12 and 16 weeks; 22 males weighing between 328 g and 474 g, and 22 females weighing between 244 g and 332 g on the day of surgery. All animals were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Québec, Canada). Animals were supplied with food and water *ad libitum* and maintained in standard animal care conditions (21°C, 12:12h dark-light cycle: lights on at 06:00 and off at 18:00). Université Laval Animal Care Committee approved the experimental procedures and the protocols were in accordance with the guidelines detailed by the Canadian Council on Animal Care.

### 2.4.2 Anaesthesia and surgical procedures

#### Telemetry

All 44 animals received a surgical intervention for the implantation of a fixed telemetric probe transponder (E-mitter, Mini Mitter, Bend, Oregon, USA) to measure core body temperatures (T<sub>b</sub>) during ventilatory measurements. Rats were anaesthetised with isoflurane (2-2.5% in air). The probe was inserted inside their peritoneum and sutured behind the internal wall of the abdominal cavity (Montandon, G., *et al.*, 2006). Following this procedure, rats subjected to the placebo (6 males, 6 females) or the CORT treatment (9 males, 10 females) received subcutaneous implants (see below). Control rats received surgery solely for the implantation of the telemetric probe (7 males, 6 females).

## Pellet Implantation

In addition to telemetric probe implantation, CORT-treated rats received respectively three 100 mg pellets of CORT conceived to be released slowly over a 21-day period (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA). The dosage of the pellet used in this experiment was based on the protocol established by Orchinik and colleagues (Orchinik, M., *et al.*, 2001) and preliminary data. The intervention for implanting pellets consisted of incising the upper back of the animal at the level of the scapula and gently introducing the pellets subcutaneously. Placebo-treated animals received three 100 mg placebo pellets obtained from the same supplier.

For all groups of rats, post-surgical care consisted of subcutaneous injections of a non-steroid anti-inflammatory (ketoprofen: 2 mg/kg), an antibiotic (baytril: 5 mg/kg) and 5cc of ringer-lactate given immediately after surgery, 24h, and 48h post-operation.

### 2.4.3 Body weight (Wb) profiles

Individual Wb were recorded every two days from the day of surgery until the day of blood withdrawal, which occurred on average  $4 \pm 1$  days following hypoxic measurements (day 14).

### 2.4.4 Ventilatory and metabolic measurements

Ventilatory measurements were performed using a whole body, flow through plethysmography system (model PLY3223, Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) according to a protocol identical to the one used in our previous studies (Kinkead, R., *et al.*, 2001; Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Montandon, G., *et al.*, 2006). Briefly, the rat was placed in the plethysmographic chamber and the resting respiratory and metabolic measurements were started once the animal was calm and the breathing activity was stable. The acclimatization period typically lasted between 30 to 60

minutes. The breathing frequency ( $f$ ), tidal volume ( $V_T$ ) and minute ventilation ( $\dot{V}_E$ ) were all recorded using a data acquisition software (IOX, EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA). After 10 minutes of normoxic measurements,  $N_2$  was added to the inflowing gas mixture to reach 12%  $O_2$ . The composition of the hypoxic mixture delivered to the chamber was monitored continuously with an  $O_2$  analyser and rats were exposed to this stimulus for 20 minutes. All measurements were made between 9:00AM and 01:00PM to minimize fluctuations associated with circadian rhythms.

During ventilatory measurements, the barometric pressure, body temperature, chamber temperature and humidity were recorded for subsequent calculation of  $V_T$  in mL per 100 g of body weight (BTPS) according to the equations provided by Drorbaugh and Fenn (Drorbough, J.E. & Fenn, W.O., 1955). Given the between group differences in  $W_b$ , the calculations of the  $\dot{V}_E$ , the consumption of oxygen ( $\dot{V}_{O_2}$ ), and the ratio  $\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$  were also corrected using allometric factors according to the equations described by Mortola and colleagues (Mortola, J.P., *et al.*, 1994). The flow rate and composition of the gas mixtures flowing in and out of the chamber was analysed with an oxygen analyzer (model S-3A, Ametek, Pittsburgh, PA, USA) and a carbon dioxide analyser (model CD-3A, Ametek, Pittsburgh, PA, USA) for subsequent calculation  $\dot{V}_{O_2}$  and carbon dioxide ( $\dot{V}_{CO_2}$ ) production in an open system (Mortola, J.P. & Dotta, A., 1992). These measurements were taken under baseline conditions and at the end of the hypoxic period.

#### 2.4.5 Plasma corticosterone measurements

Following respiratory measurements, rats were returned to the animal care facility where they recovered on average  $4 \pm 1$  days before being deeply anaesthetised with ketamine-xylazine 5% (0.2 mg/100g) to collect blood samples through intra cardiac puncture. Blood samples were collected between 09:00AM and 01:00PM and transferred into a  $K_2$  EDTA vacutainer tube (Becton Dickinson). Blood

plasma was separated by centrifugation at 3500 rpm and 4°C for 15 minutes before being stored at -80°C until assayed.

CORT levels were determined using the Correlate™-EIA ELISA Kits (Assay Design Inc., Ann Harbour, MI, USA). CORT detection was done with a microplate spectrophotometer (u-Quant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). By default, the enzyme immunoassay procedure quantifies free plasma CORT only. Knowing that female rats possess a greater amount of CORT binding globulin (CBG) in their blood plasma when compared to male rats (Tinnikov, A.A., 1999; Breuner, C.W. & Orchinik, M., 2002), the analysis was repeated in the presence of a steroid displacement reagent to measure total plasma CORT. The relative proportion of effective CORT was assessed by calculating the ratio of free over total CORT for both male and female rats.

## 2.4.6 Data Analysis

### Body Weights

Body weights were expressed as a percent change from pre-surgery values.

### Ventilatory Activity

Normoxic measurements of ventilatory variables ( $f$ ,  $V_T$  and  $\dot{V}_E$ ) were obtained by averaging the last 10 minutes of stable recording using the Datanalyst software (EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA). During hypoxia, the time course of the breathing frequency response was assessed by obtaining frequency data every 2 min. For all ventilatory measurements, steady state hypoxic values were obtained by averaging data from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> min of hypoxic exposure. For selected variables, the hypoxic ventilatory response was expressed as a percentage change from baseline.

## Corticosterone

Corticosterone concentrations were calculated from the parameters of the standard curve linearised by a 3-log transformation.

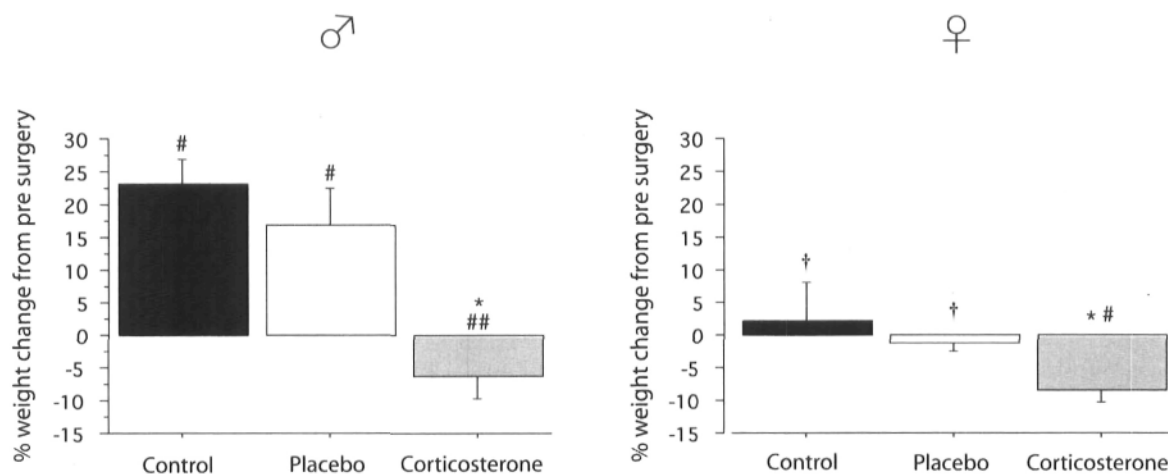
## Statistical Analysis

Respiratory data were analysed using a three-way ANOVA; sex, stimulus, and treatment (Statview 5.0 SAS Institute, Cary, NC, USA). A repeated measures design was used when appropriate. Body weight changes were deemed significant when statistically different from 0. Hypoxic responses were compared using a two-way ANOVA (sex and treatment). All analyses were followed by a Fisher post hoc test when appropriate (see Table 1). ANOVA results are typically indicated by specifying the factors of interest. Unless specified otherwise, results of post hoc tests appear in figures only. Data were considered statistically different at  $P < 0.05$  unless otherwise mentioned and were expressed as standard error of the mean (SEM).

## 2.5 RESULTS

### 2.5.1 Body weight profiles

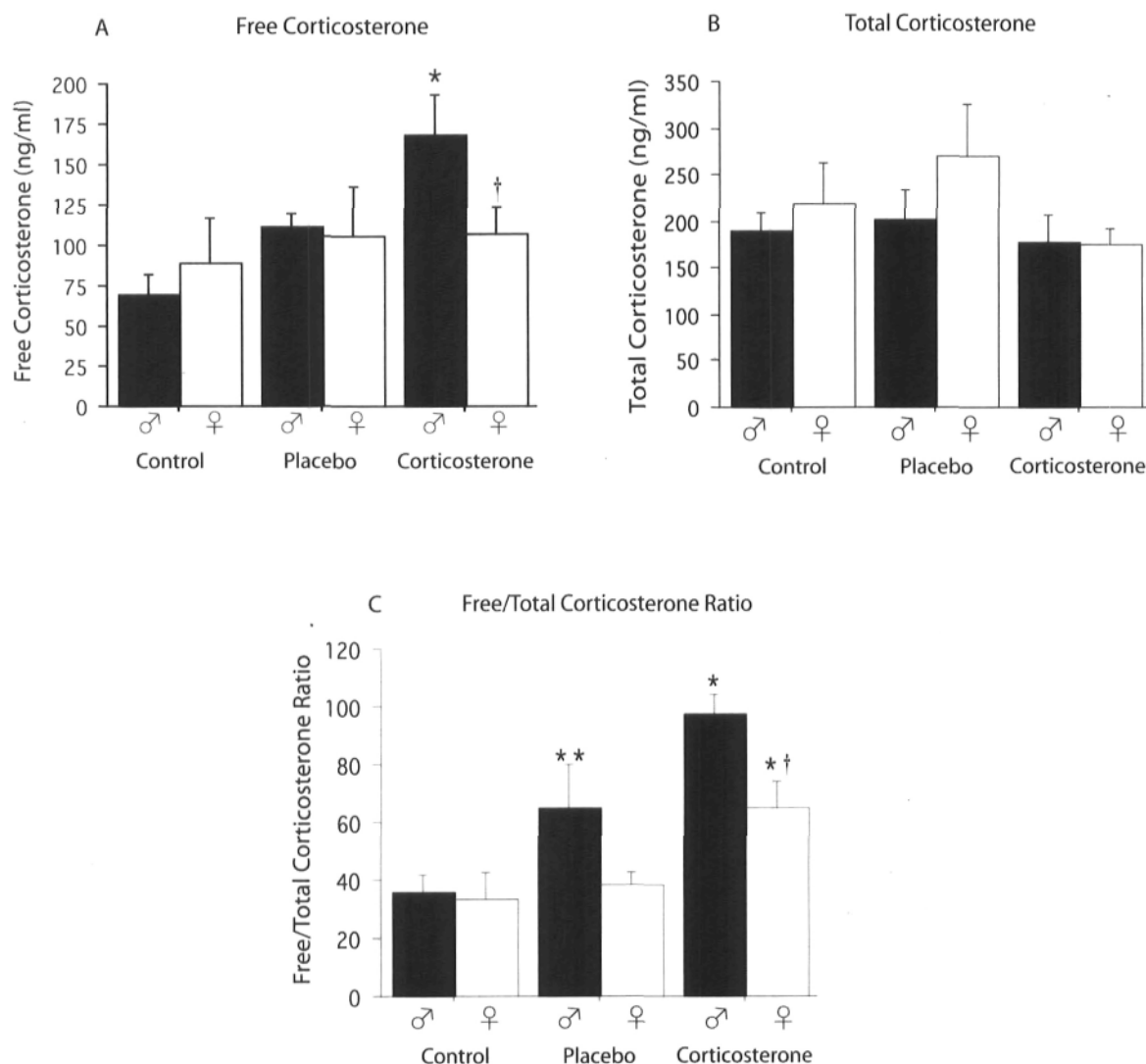
Prior to surgery, females' weights were lower than males regardless of the group condition ( $p < 0.0001$ ; data not shown). However, the magnitude of the weight change induced by the treatment was greater in males than females (time \* sex \* treatment,  $p = 0.007$ ; Fig. 2.1). A weight gain was observed in control and placebo-treated males only, whereas a weight loss was recorded in both CORT-treated males and females (treatment effect:  $p = 0.08$  and  $p = 0.0006$ , respectively; Fig. 2.1).



**Figure 2.1** : Comparison of % body weight changes from day 0 to day 14. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different vis-à-vis the control condition, ( $p < 0.05$ ). † indicates a value different from corresponding male value ( $p < 0.05$ ). # indicates a significant weight change from zero ( $p < 0.05$ ). ## indicates a significant weight change from zero ( $p < 0.1$ ).

## 2.5.2 Plasma corticosterone

Analysis of the plasma collected on average  $4 \pm 1$  days following the implantation of CORT pellets showed that this treatment effectively increased free CORT levels in male ( $p = 0.009$ ) but not in female rats ( $p = 0.84$ ; Fig 2.2A). Total CORT measurements revealed no treatment effect in any of the groups ( $p = 0.18$ ; Fig 2.2B). However, chronic CORT treatment increased the free/total ratio of CORT of both male ( $p = 0.0007$ ) and female rats ( $p = 0.04$ ) but the ratio achieved was greater in males than females (sex \* treatment:  $p = 0.01$ ; Fig 2.2C).

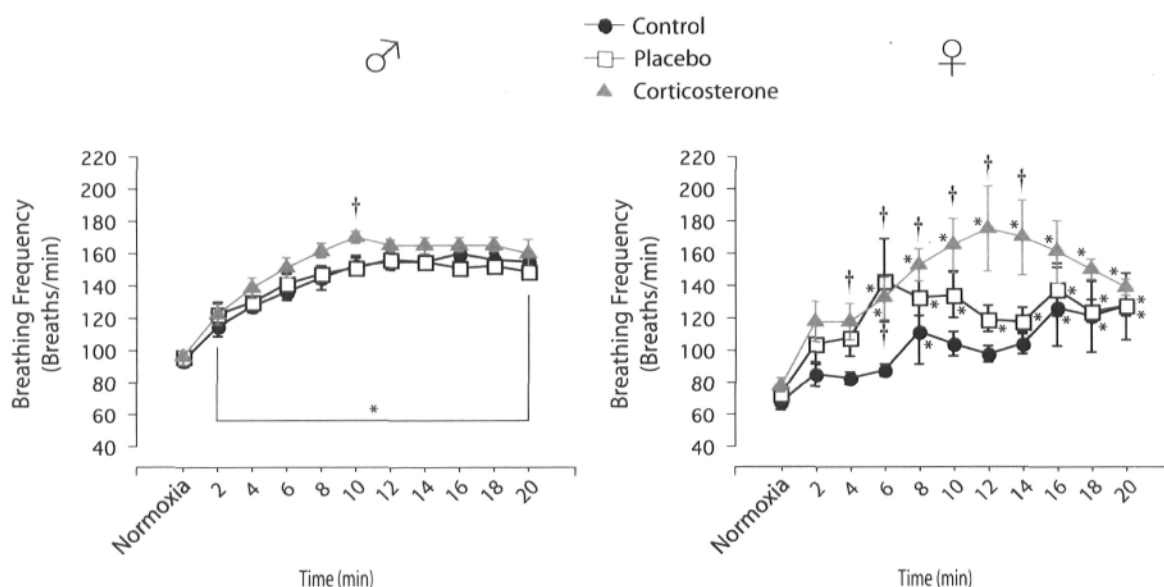


**Figure 2.2 :** Comparison of free (A) and total corticosterone (B) levels as well as the ratio free/total (C) for all groups (control, sham, corticosterone-implant) between male and female rats. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different from the control condition, ( $p < 0.05$ ). \*\* indicates a value significantly different from the control condition, ( $p < 0.06$ ). † indicates a value different from corresponding male value ( $p < 0.05$ ). Notice that for visualization purposes, the scale of each figure differs.



### 2.5.3 Breathing frequency (f)

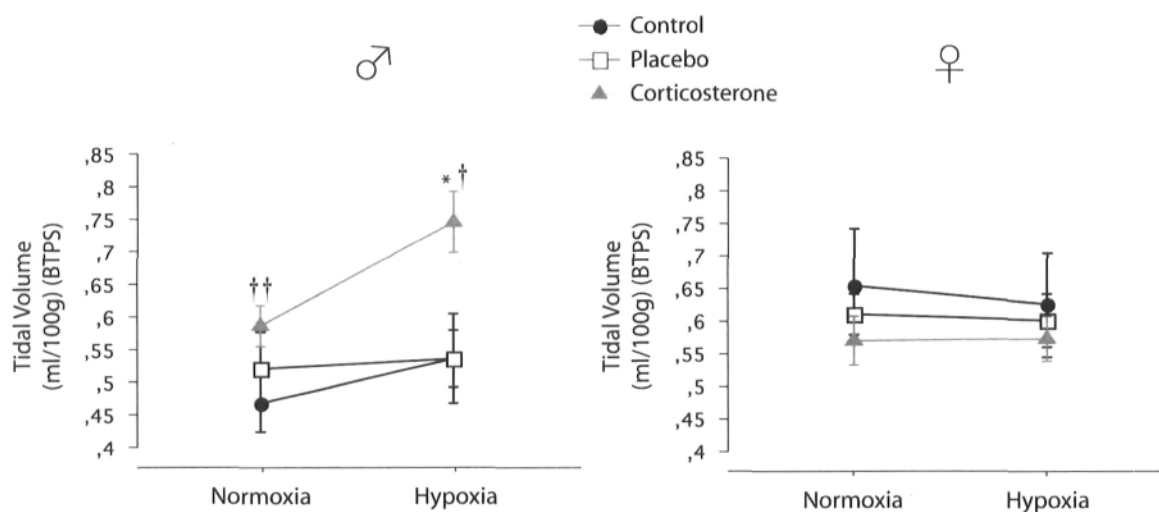
During normoxia, breathing frequency of females was lower than that of males ( $p < 0.0001$ ), but these resting values were unaffected by the treatment ( $p = 0.26$ ; Fig. 2.3). Hypoxia increased the breathing frequency of all rats ( $p < 0.0001$ ; Fig. 2.3). Overall, CORT treatment increased breathing frequency ( $p = 0.0006$ ); however, this effect was greater in females than in males (sex \* treatment:  $p = 0.05$ ). During hypoxia, the breathing frequency response was largest around the 10<sup>th</sup> minute of hypoxia, yet the response measured during the late phase of hypoxia remained higher in females subjected to CORT treatment (hypoxia \* treatment:  $p = 0.37$  and  $p = 0.04$  for males and females, respectively). Expressing these data as percent change from baseline was consistent with these trends (treatment effect:  $p = 0.5$  and  $p = 0.14$  for males and females, respectively; Fig. 2.6).



**Figure 2.3** : Comparison of the breathing frequency of all three-group conditions. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different from normoxia. † indicates a value significantly different from the corresponding control group at each specific time (min).

### 2.5.4 Tidal Volume ( $V_T$ )

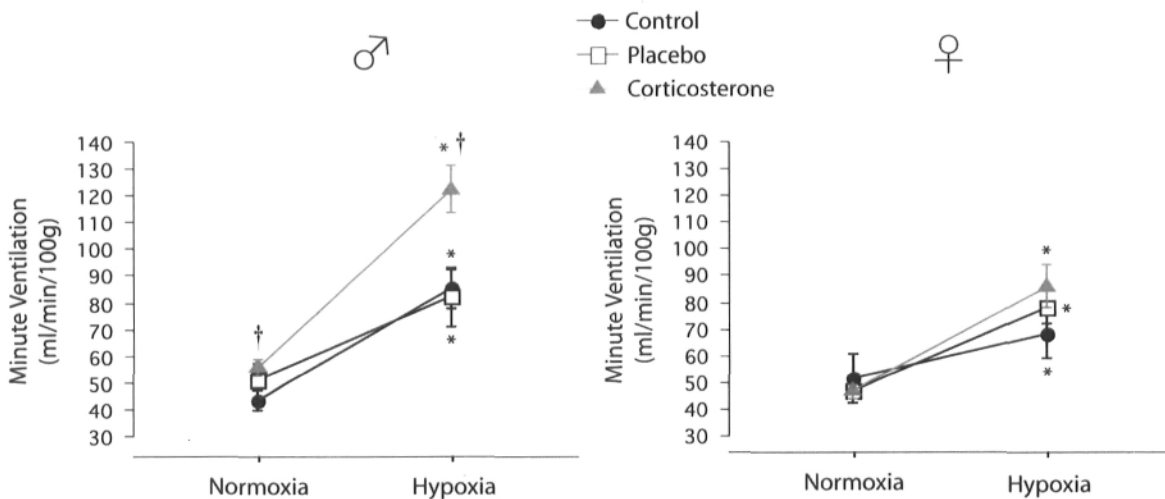
Under baseline conditions, corrected  $V_T$  were higher in females than in males (sex effect:  $p = 0.02$ ). In comparison with controls, CORT treatment tended to decrease baseline  $V_T$  in females but to increase them in males (treatment \* sex:  $p = 0.06$ ). Hypoxia increased  $V_T$  in males only (hypoxia \* sex:  $p = 0.009$ ; Fig. 2.4). Similarly, CORT treatment augmented the  $V_T$  response in male rats only (hypoxia \* treatment:  $p = 0.009$  and  $p = 0.6$  for males and females, respectively; Fig. 2.4). Expressing these data as percent change from baseline confirmed these observations (treatment effect:  $p = 0.02$  and  $0.64$  for males and females, respectively; Fig. 2.6).



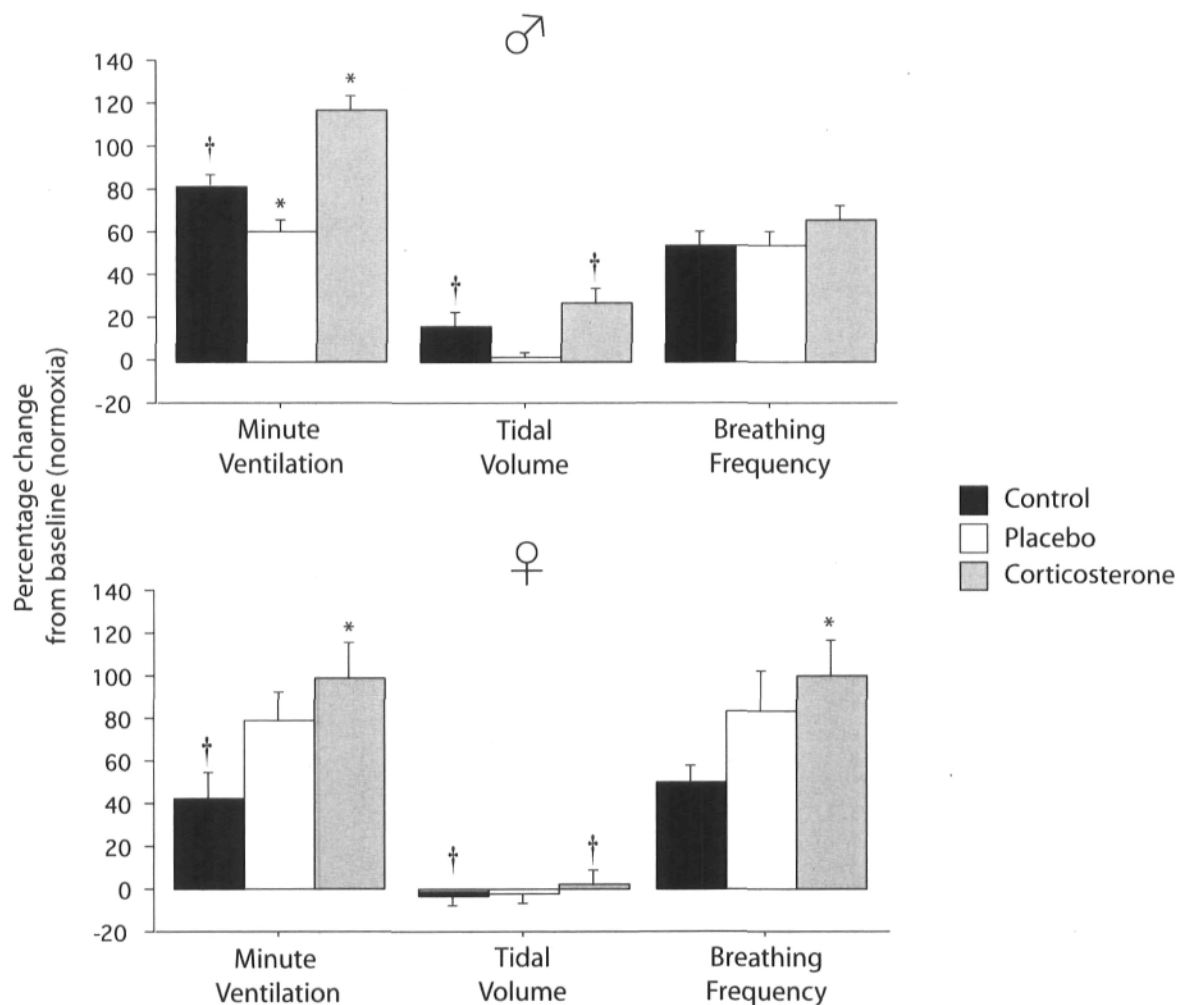
**Figure 2.4** : Comparison of the tidal volumes of control, placebo and corticosterone-implanted male and female rats across conditions of normoxia and hypoxia. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different from normoxia ( $p < 0.05$ ). † indicates a value significantly different from the corresponding control condition ( $p < 0.05$ ), and †† ( $p < 0.06$ ).

### 2.5.5 Minute Ventilation ( $\dot{V}_E$ )

As shown in figure 2.5, baseline  $\dot{V}_E$  was similar between males and females (sex effect:  $p = 0.26$ ) and across groups (treatment effect:  $p = 0.75$ ). Hypoxia increased  $\dot{V}_E$  of all animals ( $p < 0.0001$ ), but male rats had a greater ventilatory response than females (hypoxia \* sex:  $p = 0.009$ ). Subjecting rats to the chronic CORT treatment increased the hypoxic ventilatory response (hypoxia \* treatment:  $p = 0.0004$ ); however, the increase was more important in males than in females (hypoxia \* sex \* treatment:  $p = 0.08$ ). Expressing the response as a percent change from baseline confirmed these observations (treatment \* sex:  $p = 0.03$ ; Fig. 2.6). Correcting  $\dot{V}_E$  for allometric factors yielded nearly identical results (hypoxia \* sex \* treatment:  $p = 0.10$ ; Table 1).



**Figure 2.5** : Comparison of the minute ventilation of control, placebo and corticosterone-implanted male and female rats across conditions of normoxia and hypoxia. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different from normoxia ( $p < 0.05$ ). † indicates a value significantly different from the corresponding control group ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.6 :** Effect of treatment on various ventilatory variables expressed as a percentage change from the corresponding normoxic value. For each group condition, the minute ventilation, tidal volume, breathing frequency and inspiratory flow were measured after 20 minutes of exposure to moderate hypoxia (12% O<sub>2</sub>). Data are expressed as means  $\pm$  1 SEM. \* indicates a value significantly different from the corresponding control value ( $p < 0.05$ ). † indicates sex-specific differences ( $p < 0.05$ ).

### 2.5.6 Metabolic indices

Measurement of selected metabolic variables shows that, during normoxia, CORT treatment did not alter body temperature of male nor female rats ( $p = 0.21$ ; Table 1). Body temperature decreased during hypoxia and this response was greatest in CORT-treated females (sex \* hypoxia \* treatment:  $p = 0.002$ ).

Analyzing  $\dot{V}_{O_2}$  under normoxic conditions showed no differences related to sex ( $p = 0.70$ ) or treatment ( $p=0.63$ ). During hypoxia,  $\dot{V}_{O_2}$  decreased in all rats ( $p < 0.0004$ ); however, neither sex nor treatment affected this response (hypoxia \* sex:  $p = 0.73$ ; hypoxia \* treatment:  $p = 0.67$ ). Allometric correction of  $\dot{V}_{O_2}$  data produced similar results (hypoxia effect:  $p < 0.001$ ; hypoxia \* sex:  $p = 0.34$ ; hypoxia \* treatment:  $p = 0.67$ ; Table 1).

Under normoxia, the  $\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$  ratio did not differ between sexes ( $p = 0.19$ ) and was not affected by treatment ( $p = 0.67$ ; Table 1). As expected, hypoxia increased the  $\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$  ratio in all rats ( $p < 0.0001$ ), but the response was greater in females than in males (hypoxia \* sex \*:  $p < 0.0001$ ). However, these results are strongly biased by Wb because calculation of the  $\dot{V}_e / \dot{V}_{O_2}$  ratio from corrected (allometric) data showed that this response was greatest in CORT treated males (hypoxia \* sex \* treatment:  $p = 0.1$ ; Fig. 2.7).

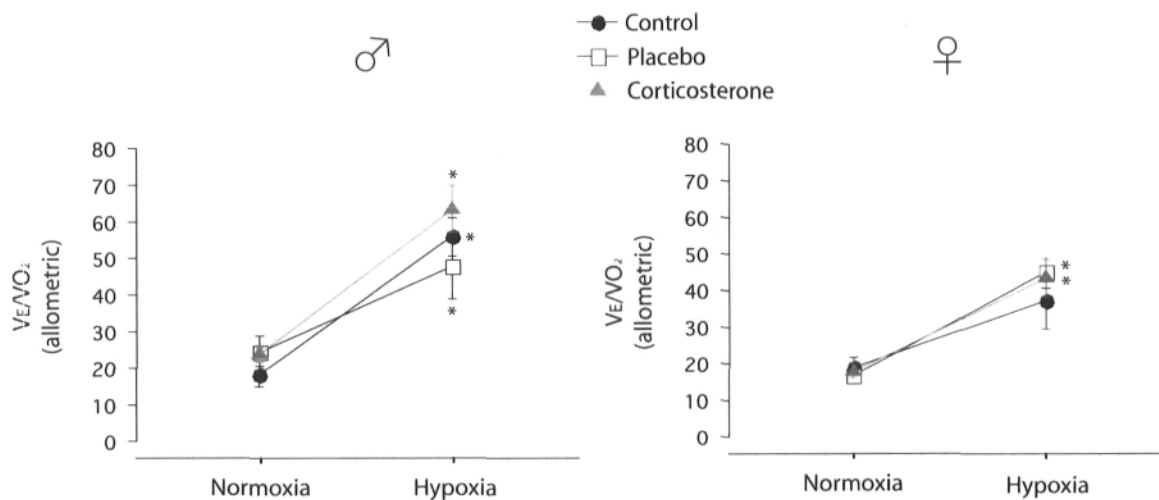
Normoxic  $\dot{V}_{CO_2}$  was not affected by sex ( $p = 0.68$ ) or treatment ( $p = 0.38$ ). Hypoxia decreased the  $\dot{V}_{CO_2}$  of rats regardless of their group condition ( $p < 0.0001$ ). Neither sex nor treatment affected this response (hypoxia \* sex:  $p = 0.42$ ; hypoxia \* treatment:  $p = 0.75$ ).

Normoxic  $\dot{V}_E / \dot{V}_{CO_2}$  did not differ between sexes ( $p = 0.09$ ) and was not affected by treatment ( $p = 0.91$ ). Hypoxia significantly increased the  $\dot{V}_E / \dot{V}_{CO_2}$  ratio of both sexes ( $p < 0.0001$ ), while treatment positively increased the males'  $\dot{V}_E / \dot{V}_{CO_2}$  response only (male treatment effect:  $p = 0.006$ ; female treatment effect:  $p = 0.72$ ). The effect of treatment on sex was insignificant ( $p = 0.48$ ).

	Females						Males					
	Normoxia			Hypoxia (12%)			Normoxia			Hypoxia (12%)		
	CTRL	SHAM	CORT	CTRL	SHAM	CORT	CTRL	SHAM	CORT	CTRL	SHAM	CORT
	n=6	n=6	n=10	n=6	n=6	n=10	n=7	n=6	n=9	n=7	n=6	n=9
$\dot{V}_{O_2}$	37.6 ± 0.2	38.1 ± 0.4	<b>38.2 ± 0.2</b>	37.4 ± 0.2	37.7 ± 0.4	37.7 ± 0.2	38.0 ± 0.4	37.8 ± 0.4	<b>37.5 ± 0.2</b>	37.6 ± 0.4	37.4 ± 0.4	37.2 ± 0.2
$\dot{V}_{O_2}$ (ml min <sup>-1</sup> 100 g <sup>-1</sup> )	50 ± 10	44 ± 3	<b>44 ± 3</b>	67 ± 10 *	79 ± 7 *	<b>87 ± 9 *</b>	44 ± 4	51 ± 7	<b>56 ± 3 †</b>	85 ± 8 *	82 ± 11 *	<b>123 ± 9 †*</b>
$\dot{V}_{O_2}$ (l STPD 0 g <sup>-1</sup> )	2.3 ± 0.1	2.7 ± 0.3	<b>2.3 ± 0.2</b>	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.2 *	<b>2.2 ± 0.2</b>	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	<b>2.6 ± 0.1</b>	1.8 ± 0.1 *	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.2
$\dot{V}_{O_2}$ (l STPD 0 g <sup>-1</sup> )	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	<b>2.1 ± 0.2</b>	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	<b>1.9 ± 0.1</b>	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	<b>2.4 ± 0.1 †</b>	1.5 ± 0.1 *	1.8 ± 0.1 †	<b>1.8 ± 0.1 †*</b>
$\dot{V}_{O_2}$	19 ± 3	17 ± 1	<b>19 ± 2</b>	65 ± 9 *	80 ± 7 *	<b>73 ± 6 *</b>	17 ± 3	23 ± 4	<b>22 ± 2</b>	52 ± 5 *	44 ± 8 *	<b>59 ± 6 *</b>
$\dot{V}_{CO_2}$	20 ± 3	20 ± 2	<b>22 ± 2</b>	77 ± 12 *	80 ± 7 *	<b>89 ± 9 *</b>	24 ± 3	26 ± 6	<b>24 ± 3</b>	60 ± 7 *	49 ± 9 *	<b>68 ± 6 *</b>

$\dot{V}_{O_2}$ allo	79 ± 16	74 ± 5	<b>78 ± 6</b>	112 ± 18	114 ± 10 *	<b>131 ± 14 *</b>	88 ± 8	104 ± 15	<b>111 ± 6</b>	141 ± 12 *	138 ± 20	<b>199 ± 14 †*</b>
$\dot{V}_{O_2}$ allo	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.4	<b>3.9 ± 0.3</b>	3.1 ± 0.3	2.6 ± 0.3 *	<b>3.0 ± 0.3</b>	4.7 ± 0.3	4.3 ± 0.2	<b>4.8 ± 0.2</b>	2.7 ± 0.2 *	3.0 ± 0.1 *	<b>3.3 ± 0.3 *</b>
$\dot{V}_{O_2}$ allo	20 ± 3	18 ± 1	<b>20 ± 2</b>	38 ± 8 *	46 ± 4 *	<b>42 ± 5 *</b>	18 ± 3	25 ± 4	<b>24 ± 2</b>	56 ± 5 *	48 ± 9 *	<b>64 ± 6 *</b>

**Table 1** : Effect of chronic elevation of corticosterone on selected metabolic variables measured in male and female rats. Comparison of mean values for baseline and hypoxia of different metabolism variables. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* indicates a value significantly different from normoxia ( $p < 0.05$ ). † indicates a value significantly different from the corresponding control value ( $p < 0.05$ ). Values presented in bold represent sex-specific differences. Numbers in brackets represent the number of animals in each group.



**Figure 2.7** : Comparison of the VE/VO<sub>2</sub> allometric of control, placebo and corticosterone-implanted male and female rats across conditions of normoxia and hypoxia. Data are expressed as absolute values. \* indicates a value significantly different from normoxia ( $p < 0.05$ ).



## 2.6 DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study is the first to show that chronic elevation of plasma corticosterone levels (CORT), by itself, leads to persistent enhancement of the hypoxic ventilatory response in adult rats of both sexes. Besides the sex-specific differences in the magnitude of the effect, our study has revealed important sexual dimorphism in the way that CORT is managed by the animal and affects respiratory control (tidal volume *versus* frequency). These results are important because they indicate that neuroendocrine disorders leading to chronic CORT elevation, regardless of their origin, could contribute to the emergence of disease related to respiratory control dysfunction.

### 2.6.1 Critique of methods

In male rats, our protocol efficiently raised free plasma CORT to levels similar to those reported in adult rats previously subjected to conditions such as chronic stress, neonatal maternal separation, or perinatal maternal food restriction which interfere with normal hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) function (Dumont, E.C., *et al.*, 2000; Leonhardt, M., *et al.*, 2002a; Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Our inability to elevate free corticosterone levels significantly in females was not anticipated given that, relative to body weight, the dose administered to females was higher than males. The use of a higher dose was attempted in preliminary experiments (400 mg), but the overall condition of these females in the days that followed CORT implantation clearly showed that this dose exceeded the rats' ability to manage such high CORT levels and suggest that CORT delivery rate may not have been constant through out the protocol. Females are known to have higher plasma levels of CORT binding globulin (CBG) which help reduce (and thus regulate) plasma levels of free CORT (Breuner, C.W. & Orchinik, M., 2002). However, total CORT levels achieved were not higher in CORT treated rats of either sex. While this observation is consistent with the higher CORT excretion rate associated with higher plasma CORT levels (Ohmori, S., *et al.*, 1997), it would imply that CORT excretion rate is further

enhanced in females than in males. But the fact that CORT is a liposoluble molecule, adipose tissue (which is proportionally higher in females) may help remove free CORT from the circulation in females. However, these possibilities remain to be addressed experimentally.

In conclusion, our inability to show a significant increase in plasma CORT levels (free or total) in females raise our awareness to the numerous factors that one must consider during experimental hormone manipulation, especially in females. These caveats are the basis of the debate concerning the indicators and factors that determine bioavailability (and thus effectiveness) of the CORT molecule (Mendel, C.M., 1989; Petersen, H.H., *et al.*, 2006). While resolving this issue is well beyond the scope of the present study, our physiological measurements (e.g. body weight) clearly show that our protocol was efficient to chronically elevate plasma CORT levels in both sexes and indicate that the free/total CORT ratio is a valuable indicator of CORT bioavailability, especially in females.

Between-group differences in the  $\text{PaO}_2$ 's achieved during hypoxia could contribute to the enhancement of the hypoxic ventilatory response in CORT treated rats. While the present protocol does not allow us to dismiss this possibility, the fact that neither neonatal maternal separation nor immobilisation stress (two experimental procedures which increase CORT levels) affect arterial blood gases, either at rest or during acute hypoxic exposure (Kinkead, R., *et al.*, 2001; Genest, S.-E., *et al.*, 2004), indicates that the level of chemical stimulation unlikely accounts for the CORT-related differences in hypoxic ventilatory response.

### **2.6.2 Effects of placebo versus corticosterone treatment on the hypoxic ventilatory response**

We initially anticipated that placebo treatment would have no effect on any of the variables measured such that these data could be pooled with those of controls as it is commonly done to increase statistical power. However, data analysis showed that this procedure was not appropriate because in some instances, results obtained in

placebo treated rats (especially males) were different from controls (see Fig. 2.2). The factors contributing to this placebo effect are unclear but suggest that the matrix used to contain CORT in the pellets is an irritant to the animal with undesirable (and unknown) side effects. While placebo treatment was not statistically significant in females, the trends observed suggest that it partially contributes to the CORT related enhancement of the hypoxic ventilatory response in these rats. However, the lower hypoxic ventilatory response observed in placebo treated males indicate that we likely underestimate the effects of chronic CORT *per se* on the hypoxic ventilatory response.

### **2.6.3 Chronic elevation of plasma corticosterone levels augments the hypoxic ventilatory response**

The hypoxic ventilatory response is the result of a complex interplay between an increase in peripheral chemoreceptor activity, central integration of afferent signals (including behaviour), and motor output regulation (Powell, F.L., *et al.*, 1998). While performing experiments at the whole animal level enabled us to assess the functional consequences of our CORT treatment in a physiologically relevant context, this approach makes it difficult at this point to identify the specific neural mechanisms underlying this manifestation of respiratory plasticity. Furthermore, the current literature provides little information on the impact of glucocorticoids on ventilatory control. In that regard, Joseph *et al.* (Joseph, V., *et al.*, 1998) have shown that chronic dexamethasone administration (1 mg/kg daily for 10 days) augments tyrosine hydroxylase activity in the carotid body but not the hypoxic ventilatory response. The factors underlying the discrepancies between these results and those reported here are unclear, but indicate that the nature of the steroid used (dexamethasone *versus* CORT) and/or the administration procedure (daily injection *versus* chronic implants) are important variables.

The free CORT levels measured in our experiments are comparable to those measured in adult male rats previously subjected to neonatal maternal separation (NMS). Clearly, the means by which chronic elevation of CORT levels were achieved in

this study is very distinct, yet the consequences on the hypoxic ventilatory response of male rats are strikingly similar as both approaches augment the hypoxic ventilatory response by ~25%, owing mainly to an increase in the tidal volume response (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Data obtained thus far indicate that NMS has extensive effects on the respiratory control system of male rats because it affects both the chemosensory as well as the central components of the hypoxic chemoreflex (Genest, S.-E., *et al.*, 2004; Kinkead, R., *et al.*, 2005a; Kinkead, R., *et al.*, 2005b; Kinkead, R., *et al.*, 2005c). Given that differences in metabolic regulation do not explain the enhancement of the hypoxic ventilatory response observed in CORT treated rats, it is likely that the effects of CORT on neural control mechanisms are as extensive as those reported in NMS rats. The observation that chronic stress increases noradrenaline levels in brainstem and pontine neurons (e.g. NTS, A1/C1, and locus coeruleus) which modulate respiratory activity (Lachuer, J., *et al.*, 1994) is consistent with this interpretation. Similar changes in catecholaminergic neurotransmission within carotid bodies could explain the enhancement of the breathing frequency response observed in females.

The functional consequences of perinatal stress exposure on CNS development and function are strikingly different between males and females. Unlike males, NMS does not affect HPA axis function in females because “resting” plasma ACTH and CORT levels measured in NMS females are not different from controls (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). Furthermore, the hypoxic ventilatory response of NMS females is lower than controls (Genest, S.-E., *et al.*, 2004). The neuroendocrine mechanisms “protecting” HPA axis development in the face of neonatal stress are still unknown. While ovarian hormones are prime candidates for such protective action, females are not entirely immune to the effects of chronic CORT elevation as our protocol augmented the hypoxic ventilatory response in this group also. These results support our hypothesis, but more importantly, they suggest that the mechanisms protecting females from perinatal stress act on the mechanisms regulating CORT release.

## 2.6.4 Perspectives

Factors such as chronic or perinatal stress can affect HPA axis function in ways that will ultimately lead to chronic CORT elevation, a condition commonly associated with behavioural and psychiatric disorders both in humans and animal models (Graham, Y.P., *et al.*, 1999; Gunnar, M.R., 2003; Nicolson, N.A., 2004). However, since enhancement of the hypoxic ventilatory response predicts adverse prognosis in patients with chronic heart failure (Ponikowski, P., *et al.*, 2001) and predisposes to respiratory instability and recurrent apneas during sleep (Younes, M., *et al.*, 2001; Smith, C.A., *et al.*, 2003), the present study suggests that chronic CORT elevation may exacerbate and/or contribute to such cardio-respiratory disorders. While further studies are necessary to determine the mechanisms by which CORT affects the respiratory control system, these results provide valuable clues to understand the pathophysiology of respiratory disease and develop new intervention strategies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was also supported by the Canada Research Chair in Respiratory Neurobiology and by the Fondation de la recherche sur les maladies infantiles.

We would like to express our most sincere appreciation for the support and technical assistance of Dr Sophie-Emanuelle Genest, Sylvie Viger, and Evelyne Vachon.

## **CHAPITRE III**

### **Discussion Générale**

### 3.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'étude présentée dans ce manuscrit révèle qu'une élévation chronique de corticostérone (CORT) entraîne l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le rat adulte. Ces résultats tissent un lien entre le rôle d'une hormone importante dans la réponse au stress et ses conséquences sur la réponse ventilatoire. La discussion fait un retour critique sur les résultats obtenus. Elle propose aussi des suggestions afin de rendre cette recherche plus précise et amène finalement des perspectives d'études futures.

#### 3.1.1 Sites d'actions des glucocorticoïdes

Il existe des récepteurs de glucocorticoïdes (GR) sur la majorité des neurones noradrénergique (NA), sérotoninergique (5-HT), dopaminergique (DA) et GABAergique (GABA) (Schoffelmeer, A.N., 1997; Czyrak, A., *et al.*, 2003). Nous retrouvons également des GRs sur les tissus adipeux et les muscles (Cleasby, M.E., 2003). Nos résultats démontrent que l'élévation chronique des niveaux de CORT augmente le réflexe ventilatoire à l'hypoxie, mais ces études ne permettent pas de déterminer à quel niveau de la voie chémoréflexe agit la CORT. Cependant plusieurs de ces sites d'actions des corticostérones sont connus et nous donnent des pistes de recherche prometteuse en lien avec leurs mécanismes d'action.

#### Muscles et /ou adipocytes

Nos résultats démontrent, qu'à la suite du traitement, les taux de CORT plasmatique libre enregistrés chez les femelles sont significativement plus faibles que ceux des mâles. Puisque nos analyses de CORT se limitent à la détection de la CORT dans le plasma sanguin, il est possible qu'une quantité non négligeable de l'hormone se retrouve liée à d'autres récepteurs comme les adipocytes et/ou les muscles. De plus, l'étude de ce mémoire fait mention de mortalité (11 rats décédés / 30 rats

traités) survenue à la suite de l'implantation de la CORT. Le paragraphe suivant propose une explication à ce phénomène et présente des hypothèses sur les sites potentiels d'action des glucocorticoïdes.

D'abord, la CORT pourrait se lier directement aux muscles (ex. : diaphragme, intercostaux) et aux motoneurones impliqués dans la respiration. Toutefois, il existe, chez le lapin, des sites de liaison pour les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes sur divers muscles lisses (ex. : reins) et sur des parois veineuses (ex. : veine cave, aorte). La liaison de la CORT sur ces récepteurs augmenterait la contraction des muscles artériels et artériolaires et augmenterait la résistance périphérique ce qui résulterait en de l'hypertension (Kornel, L., *et al.*, 1982). Cependant, il est connu qu'un excès de glucocorticoïdes peut entraîner une activité perturbée du rôle de l'insuline (Bailey, J.L., *et al.*, 1999). L'insuline participe à l'oxydation du glucose en CO<sub>2</sub> dans le tissu adipeux ainsi qu'à la synthèse du glycogène à partir du glucose. En se liant aux tissus adipeux, la CORT pourrait affecter l'activité du métabolisme intermédiaire qui régule la glycolyse et la glycogénèse. Une glycolyse trop importante provoquerait un excès de production d'ATP, mènerait à la dégradation protéinique des muscles et à une condition pathologique comme l'urémie (un état causé par une défaillance rénale qui occasionne une rétention d'urée dans le sang) (Bailey, J.L., *et al.*, 1999). La dégradation musculaire peut provoquer une perte importante de poids et occasionner la mort. Or, notre étude fait mention des conséquences de la CORT exogène sur la perte de poids. Une perte de poids fut remarquée, sans exception, chez tous les rats traités à la CORT plusieurs jours post-opératoire. Certains ont été incapables de surmonter le déficit et sont décédés (perte >20% masse corporelle). L'hypothèse d'une défaillance rénale pour expliquer les décès est plausible. Une quantité importante de glucocorticoïdes se lierait aux tissus adipeux de l'animal laissant une quantité plasmatique détectable plus faible. La surproduction d'ATP serait à l'origine de la dégradation musculaire et la perte de poids. L'incapacité des reins à excréter les toxines et l'accumulation d'urée dans le sang causerait alors un choc toxique et le décès de l'animal.



## Corps carotidiens (CC)

Puisque la CORT augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie, son action agit certainement sur la voie chémoréflexe (périphérique et/ou centrale). L'organe périphérique de la voie chémoréflexe majoritairement impliqué dans la chémodétection des variations d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, le corps carotidien, serait possiblement un site de liaison potentiel de la corticostérone.

Nous savons que les CCs contiennent d'importantes quantités de catécholamines. Les catécholamines, comme la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA) sont impliquées dans la neuromodulation de la chémosensibilité périphérique et dans les mécanismes centraux de la respiration. De plus, il est reconnu que les glucocorticoïdes peuvent affecter le métabolisme des catécholamines dans le CC et dans le tronc cérébral (Joseph, V., *et al.*, 1998). Un traitement aigu à la dexaméthasone (DEX : un glucocorticoïde synthétique) affecte la biosynthèse des catécholamines, augmente les contenus de noradrénaline et de dopamine, et stimule l'activité de la TH dans le corps carotidien (Hellström, S., *et al.*, 1979; Joseph, V., *et al.*, 1998). Si le traitement de DEX est chronique (10 jours), l'effet au niveau des CCs reste similaire (hausse de l'activité TH), tandis que dans les régions catécholaminergiques du tronc cérébral l'activité TH diminue légèrement (Joseph, V., *et al.*, 1998). La DEX perturbe également le patron respiratoire. Une seule injection de DEX, et non le traitement chronique, réduit la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Cet effet sur le contrôle de la respiration est en accord avec l'influence inhibitrice de la dopamine sur la neuromodulation de la chémosensibilité au niveau des chémorécepteurs périphériques. Cependant, comment expliquer que le traitement chronique à la CORT augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie tandis qu'un traitement chronique à la DEX n'a pas d'effet? Bien que nous ignorions à quel niveau structural agisse la CORT, une des hypothèses serait que la CORT produise une diminution de l'activité TH et une réduction de l'influence inhibitrice de la dopamine chez le rat adulte mâle. Or, l'administration chronique de DEX induit une augmentation de l'activité de la TH dans le CC, mais une diminution dans les régions

A5 et A7 du tronc cérébral (Joseph, V., *et al.*, 1998). Des différences reliées à la dose, à la méthode d'injection, et/ou à la nature de la molécule utilisée (la DEX est un très puissant agoniste des récepteurs GR) peuvent expliquer ces différences de résultats entre ces deux études. De plus, l'affinité de la DEX et de la CORT pour les récepteurs minéralo- et glucocorticoïdes est différente. Bien que la DEX et la CORT puissent conjointement lier certains récepteurs, ils possèdent chacun de plus fortes affinités pour d'autres sites de liaison (Kornel L., *et al.*, 1982). Somme toute, ces données supportent l'idée que les glucocorticoïdes ont des effets différents sur la synthèse des catécholamines dans les structures périphériques et centrales impliquées dans la voie chémoréflexe.

### **Système nerveux central (SNC)**

Les effets d'une administration chronique de la CORT au niveau des centres respiratoires sont mal connus, mais on sait que l'administration chronique de DEX fait chuter l'activité de la TH des groupes cellulaires A2C2, A5 et A7 (Joseph, V. *et al.*, 1998). Puisque nos résultats montrent une augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie, il est logique de supposer que l'activité des structures impliquées dans le chémoréflexe respiratoire est modifiée. La TH au niveau central peut être modulée indirectement (activation transsynaptique) par l'activité des chémorécepteurs. La liaison de la CORT au niveau des neurones noradrénergiques centraux pourrait faire diminuer l'activité de la TH dans le tronc cérébral. Puisque au niveau central la noradrénaline a des effets inhibiteurs de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Bianchi, A.L., *et al.*, 1995; Joseph, V. *et al.*, 1998; Joseph, V., *et al.*, 2002; Wang, Z.Y., *et al.*, 2002), ceci contribuerait à augmenter la réponse ventilatoire à l'hypoxie. D'ailleurs, des études récentes dans notre laboratoire ont démontré que la SMN (qui provoque l'augmentation des niveaux plasmatiques de CORT) augmentait l'expression d'ARNm pour la TH dans le CC des rats mâles (Kinkead, R., *et al.*, 2005c). La SMN augmentait également l'expression d'ARNm codant pour les récepteurs D<sub>2</sub> de la dopamine dans le CC des rats mâles et femelles (Kinkead, R., *et al.*, 2005c). Comment expliquer, dans ce cas, que la réponse ventilatoire à l'hypoxie augmente? Y aurait-il un effet sur des

voies excitatrices? Selon le Dr Kinkead et ses collaborateurs, les mécanismes responsables de ce phénomène se trouvent probablement au niveau des CCs puisque la neurotransmission dopaminergique à l'intérieur de cet organe contribue aux effets sexe-spécifiques de la SMN sur la régulation cardio-respiratoire (Kinkead, R., *et al.*, 2005c). Bien que la CORT n'affecte pas les récepteurs DA D<sub>2</sub> et l'expression d'ARNm dans les structures cérébrales (Czyrak, A., *et al.*, 2003), elle pourrait affecter, tout comme la SMN, l'expression des récepteurs DA D<sub>2</sub> et possiblement DA D<sub>1</sub> localisés sur les CCs.

Tandis que les CCs relais des signaux au NTS et au VLM *via* le ganglion pétreux, il est possible que la CORT agisse sur différents sites impliqués dans la régulation du chémoréflexe à l'hypoxie localisés au niveau du SNC.

D'un point de vue fonctionnel, les cellules chémosensibles des CCs jouent un rôle capital dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Les afférences des CCs atteignent le NTS qui est réciproquement connecté aux noyaux pontins impliqués dans les régulations cardio-respiratoires. Ces structures sont associées à plusieurs fonctions respiratoires. Le générateur central du patron respiratoire (CPG) est localisé dans le PreBötC et est impliqué dans la génération du rythme respiratoire. En plus de recevoir des afférences du NTS et VLM, ce générateur central reçoit également les projections du LC et de l'hypothalamus. De part leurs propriétés morphologiques et électrophysiologiques, les neurones du générateur central ressemblent à plusieurs types neuronaux du tronc cérébral (Branchi, A.L., *et al.*, 1995), certains possédant des bases inhibitrices (Liu, Y.Y., *et al.*, 2002) et catécholaminergiques. Ces neurones sont impliqués dans l'élaboration périodique des patrons de décharge et/ou de régulation respiratoire.

Ces noyaux du tronc cérébral contiennent plusieurs groupes de neurones noradrénergiques comme les cellules de groupes A2, A5 et A6. Les cellules du groupe A2 innervent le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) et le noyau supraoptique (SON) tous deux impliqués dans les régulations neuroendocriniennes. Or,

l'élévation chronique de CORT pourrait agir centralement (*via* les récepteurs des glucocorticoïdes) sur ces groupes de neurones noradrénergiques et perturber les régulations neuroendocriniennes. Les GRs agissent comme facteurs de transcription (Czyrak, A., *et al.*, 2003) et leur colocalisation avec la TH du neurone pourrait être considéré comme un élément explicatif des résultats ventilatoires que l'on retrouve. D'ailleurs, des études rapportent que la transcription de l'ARNm de la TH est sous le contrôle des glucocorticoïdes (Rastogi, R.B., *et al.*, 1978; de Kloet, E.R., *et al.*, 1990; Czyrak, A., *et al.*, 2003). Bien que la CORT agisse, chez le rat, sur les GRs, son action peut aussi réguler la neurotransmission dopaminergique au niveau des récepteurs D<sub>1</sub> de la dopamine (Czyrak, A., *et al.*, 2003). Il est possible que les récepteurs D<sub>1</sub> régularisent la libération de la CORT par l'activation de neurones du PVN (Czyrak, A., *et al.*, 2003). La CORT pourrait ainsi accentuer le débit dopaminergique en altérant la synthèse de la TH. De plus, elle pourrait évoquer la translocation de la TH en provenance des corps cellulaires vers les terminaisons. Ainsi, par une action sur les voies noradrénergiques et dopaminergiques, la CORT pourrait provoquer une diminution de l'activité inhibitrice de la dopamine et l'élévation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Cependant, comment expliquer les différences ventilatoires des femelles et des mâles?

### **Dimorphisme sexuel**

Selon les études du Dr Joseph, les CCs seraient un site majeur de différenciation sexuel pour le contrôle respiratoire (Joseph, V., *et al.*, 2000; Joseph, V., *et al.*, 2002). De plus, nous apprenons que la progestérone et l'estradiol sont de puissants stimulants ventilatoires (Joseph, V., *et al.*, 2002). L'injection de dompéridone (un antagoniste périphérique des récepteurs D<sub>2</sub> de la dopamine) augmente la ventilation en normoxie et en hypoxie aiguë des femelles ovariectomisées alors qu'une supplémentation chronique de stéroïdes ovariens (progestérone + estradiol) supprime cet effet inhibiteur de la dompéridone (Joseph, V., *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que les stéroïdes ovariens réduisent l'activité TH et le turnover de la dopamine dans les CCs, et puisque la dopamine est reconnue dans le CC

comme un puissant inhibiteur de la chémotransduction et de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Gonzalez, C., 1994; Gonzalez, C., 1995; Joseph, V., *et al.*, 2002), il est logique de proposer un lien de causalité direct entre l'effet des stéroïdes ovariens sur le système dopaminergique et la réponse à l'hypoxie. Or, l'effet du traitement de CORT serait atténué chez les femelles en raison de leur production d'hormones sexuelles. La CORT causerait probablement une diminution de la TH. Mais afin de comparer l'action de la corticostérone exogène sur les mâles et les femelles, nous devrions envisager un protocole d'ovariectomie.

### **3.1.2 Propositions d'approches intégrées pour le traitement de certains désordres cliniques**

#### **Approche pharmacologique**

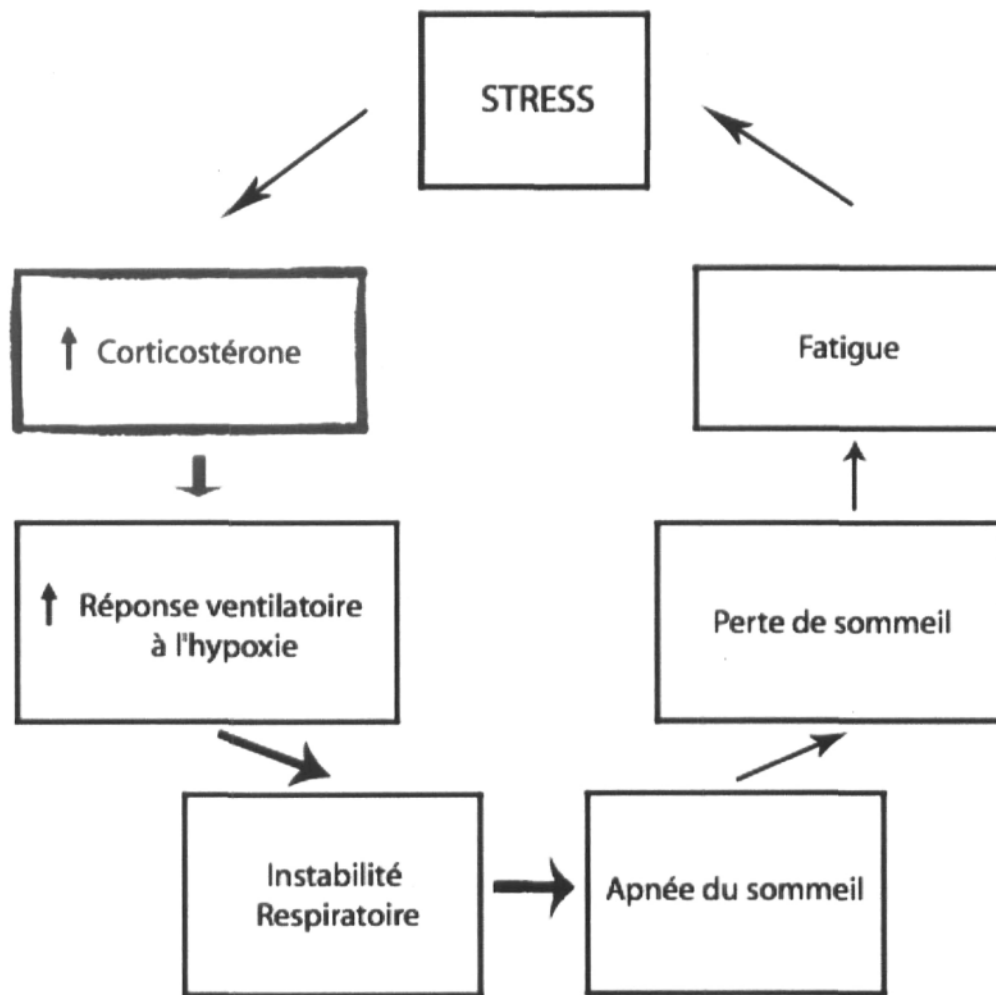
Le modèle animal utilisé dans ce mémoire s'apparente au stress chronique chez l'humain. Le stress chronique est causé par une exposition répétée et continue à un stress. Chez l'humain, le stress chronique peut mener à des troubles cardiovasculaires (Hansen, P.R., 2007). Bien que le lien soit peu documenté, il est fort probable que le stress chronique mène aussi à des désordres respiratoires. Au meilleur de nos connaissances, l'étude de ce mémoire est la première à démontrer, qu'à elle seule, la CORT augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie du rat adulte. Cette réaction peut avoir des implications cliniques intéressantes. En conditions basales et de stress, le CRH fonctionne en synergie avec la vasopressine (AVP) pour contrôler l'axe HHS. En situations de stress, le CRH augmente la sécrétion d'ACTH dans l'hypophyse ce qui stimule la production de glucocorticoïdes des surrénales. Les glucocorticoïdes ont une fonction de rétrocontrôle sur le CRH pour inhiber la réponse au stress. Plusieurs conditions cliniques comme la dépression majeure et l'anxiété sont associées à l'hyperactivité de l'axe HHS (Zoumakis, E., *et al.*, 2006). Physiologiquement, il est possible que le mécanisme de rétroaction soit déficient ou que l'action des glucocorticoïdes soit inefficace en raison d'une saturation des GRs au

niveau de l'hypothalamus. Il est possible que la saturation des GRs soit même néfaste pour l'organisme. Ces gens pourraient bénéficier d'un traitement inhibant la réponse au stress par l'action d'un antagoniste au CRH et éviter tous dommages cellulaires par l'utilisation d'un antagoniste aux glucocorticoïdes. Chez l'animal, plusieurs antagonistes au CRH sont connus, bien qu'ils soient non spécifiques. Nous pourrions observer, en laboratoire, l'effet d'un antagoniste au CRH (ex. : antalarmin, CRH9-41 ou CP-154, 526) sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie et sur le système de contrôle respiratoire des rats NMS ou traités à la CORT.

### **Approche psychologique et comportementale**

Le schéma de la figure 3.1 fait un lien entre l'état de l'axe HHS et l'effet sur le système de contrôle de la respiration. Nous savons qu'un stress néonatal (ex. : SMN) et l'élévation chronique de CORT augmentent la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Ici une hypothèse est proposée selon laquelle l'augmentation du chémoréflexe à l'hypoxie pourrait entraîner de l'instabilité respiratoire. Sur le plan clinique, nous savons que des épisodes d'instabilité respiratoire peuvent mener à des troubles respiratoires tels les apnées du sommeil (Naughton, M., *et al.*, 1993; Solin, P., *et al.*, 1999). L'apnée du sommeil est un désordre lié, en partie, au dysfonctionnement du système de contrôle de la respiration. Les apnées occasionnent particulièrement une perte de la qualité du sommeil. Une telle fragmentation du sommeil devient un stress supplémentaire et consent à faire augmenter la production naturelle de CORT du rat (Dugovic, C., *et al.*, 1999). En revanche, ces forts niveaux de CORT pourraient contribuer à altérer les phases sommeil-éveil à long terme de l'animal. Chez l'humain, un patient aux prises avec ces complications serait assujetti à développer une fatigue excessive ce qui pourrait occasionner un manque de productivité, une perte d'intérêt pour ses occupations, et possiblement des délais insurmontables dans ses échéanciers ce qui aurait comme conséquences d'augmenter davantage le stress ressenti par cet individu. La formation d'un stress chronique comme celui-ci pourrait mener à plusieurs maladies connues d'ordre cardio-respiratoire ou cardio-vasculaire. Compte tenu que

les glucocorticoïdes, le stress et les troubles cardio-respiratoires sont probablement inter-reliés, nous pourrions corriger cette défaillance en utilisant une approche holistique et complémentaire à la médication contrôlée. Une meilleure gestion du stress par voie de relaxation ou de méditation pourrait contribuer à diminuer les niveaux de cortisol et, par le fait même, les problèmes respiratoires (ex. : apnée du sommeil) adjacents. Peut-être même que la psychothérapie ou l'hypnose pourraient alors devenir des approches d'envergure pour traiter, ou du moins contrôler, certains troubles cardio-respiratoires.



**Figure 3.1** : Boucle d'intégration spéculative de l'effet du stress sur un individu. Cette boucle pourrait constituer un facteur d'aggravation de bien des maladies cardio-vasculaires ou cardio-respiratoires. Les flèches noirs démontrent des faits établis dans la littérature. La flèche rouge correspond maintenant à un fait établi tel que présenté dans l'étude de ce mémoire. Les flèches bleus correspondent à des syndrômes possibles d'une augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et ils seront étudiés dans un projet de recherche futur de notre laboratoire.



### 3.1.3 Propositions d'approches expérimentales futures

Récemment dans la littérature, nous avons remarqué un intérêt grandissant pour les neurotrophines tels les facteurs neurotrophiques dérivés du système nerveux central (BDNF) ou encore de facteur de croissance des nerfs (NGF). Les neurotrophines régularisent la survie et la différenciation des neurones pendant le développement (Tapia-Arancibia, L., *et al.*, 2004; Van den Hove, D.L., *et al.*, 2006). Comme ces facteurs sont synthétisés dans le cerveau et dans la moelle épinière, il est possible qu'ils entretiennent des rapports étroits avec certains circuits régularisant la respiration. D'ailleurs, l'équipe du Dr Mitchell a rapportée, en 2004, qu'une augmentation de la synthèse de BDNF dans la moelle épinière était nécessaire à la facilitation à long terme du nerf phrénique (Baker-Herman, T.L., *et al.*, 2004). L'activité du nerf phrénique est directement liée à la respiration puisque c'est ce dernier qui transmet la commande inspiratoire. Cette avancée démontre un rôle important du BDNF dans les mécanismes liés à la plasticité respiratoire. Il serait intéressant d'établir s'il existe un lien entre le BDNF et l'augmentation du volume courant des rats traités à la CORT ou des rats NMS. Si c'était le cas, serions-nous confronté au même dimorphisme sexuel que celui observé lors des études antérieures? Le rôle du BDNF soulève de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de désordre respiratoire comme l'insuffisance respiratoire développée à la suite d'un traumatisme de la moelle épinière ou encore du vieillissement.

Bien que les neurotrophines aient un rôle de différenciation lors du développement, plusieurs études impliquent le BDNF dans la plasticité neuronale du cerveau des rats adultes (Rage, F., *et al.*, 2006). Le BDNF possède des récepteurs localisés dans l'hypophyse et l'expression de ces récepteurs chute avec le vieillissement. Donc, si ces récepteurs perdent de leur efficacité et qu'ils se retrouvent en nombre réduit à l'âge adulte, qu'advient-il du BDNF sécrété? Se retrouve-t-il en plus grand nombre? Aurait-il un effet sur l'axe HHS en provenance de

l'hypophyse? Ce phénomène pourrait nous aider à comprendre certains changements associés aux variations rencontrés dans le système neuroendocrinien.

Comme le cerveau est résilient au stress et que sa plasticité le rend capable de s'adapter, il est possible que les neurotrophines agissent en tant que médiateurs de plasticité cérébrale à la suite d'épreuve comme le stress. Toutefois, les mécanismes liés au dimorphisme sexuel de cette réponse sont peu connus. L'équipe du Dre Franklin témoigne cependant du lien qu'entretient le BDNF avec les hormones ovariennes (Franklin, T.B. & Perrot-Sinal, T.S., 2006). Les hormones ovariennes affectent directement les niveaux cérébraux de BDNF et puisqu'il existe un parallèle entre les niveaux de BDNF et la dépression, les fluctuations hormonales ovariennes des femelles pourraient correspondre à leur incidence plus élevée de dépression. Ceci propose un lien avec le dimorphisme sexuel rencontré chez nos animaux mâles et femelles traités à la CORT. Une combinaison d'hormones ovariennes et de BDNF pourrait être à l'origine des différentes variables ventilatoires observées chez les femelles (ex. : fréquence respiratoire plus élevée). Il se pourrait que les hormones sexuelles et les neurotrophines agissent différemment sur la régulation des états de stress perçus par les mâles et les femelles. Or, une approche expérimentale future pourrait évaluer le rôle des hormones sexuelles en procédant à la castration et à l'ovariectomie des animaux suivit d'une supplémentation d'hormones sexuelles précises. Les effets de ces manipulations hormonales sur le système chémoreflexe pourraient être évalués en mesurant la ventilation des animaux par plethysmographie. Des hormones sexuelles comme l'estradiol, la progestérone et la testostérone seraient manipulées individuellement ou en pair afin d'évaluer leur participation à un stress respiratoire comme l'hypoxie modérée. Dans l'étude actuelle, l'échec du traitement à faire élever les taux de CORT plasmatique des animaux femelles nous laisse croire que ces dernières sont davantage tolérantes à ce stressor que les animaux mâles. Serait-ce le résultat des hormones ovariennes? Quelle serait la réponse ventilatoire à l'hypoxie des femelles traitées à la CORT et dépourvues de leurs hormones ovariennes? Ou encore, quelle serait la réponse ventilatoire à l'hypoxie des mâles s'ils étaient supplémentés avec des hormones ovariennes? Ces idées feront l'objet d'un projet de recherche

futur. Le but : découvrir le rôle des hormones sexuelles dans le dimorphisme sexuel des conséquences du stress néonatal sur le système respiratoire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Anand D, Stevenson CJ, West CR and Pharoah PO. (2003). Lung function and respiratory health in adolescents of very low birth weight. *Arch Dis Child* **88**, 135-138.
- Baker RA and Herkenham M. (1995). Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *J Comp Neurol* **358**, 518-530.
- Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Johnson RA, Watters JJ and Mitchell GS. (2004). BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci* **7**, 48-55.
- Bailey JL, Wang X and Price SR. (1999). The balance between glucocorticoids and insulin regulates muscle proteolysis via the ubiquitin-proteasome pathway. *Miner Electrolyte Metab* **25**, 220-223.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M and Champagnat J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1-45.
- Bisgard GE. (1994). The role of arterial chemoreceptors in ventilation acclimatization to hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **360**, 109-122.
- Bisgard GE. (2000). Carotid body mechanism in acclimatization to hypoxia. *Respir Physiol* **121**, 237-246.
- Boccia ML and Pedersen CA. (2001). Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 657-672.
- Breuner CW and Orchinik M. (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* **175**, 99-112.
- Brown-Borg HM, Klemcke HG and Blecha F. (1993). Lymphocyte proliferative responses in neonatal pigs with high or low plasma cortisol concentration after stress induced by restraint. *Am J Vet Res* **54**, 2015-2020.

- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM and Meaney MJ. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adulthood in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5335-5340.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM and Meaney MJ. (2000a). The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* **22**, 219-229.
- Caldji C, Diorio J and Meaney MJ. (2000b). Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry* **48**, 1164-1174.
- Carroll JL. (2003). Plasticity in Respiratory Motor Control. Invited Review: Developmental plasticity in respiratory control. *J Appl Physiol* **94**, 375-389.
- Cleasby ME, Kelly PA, Walker BR and Seckl JR. (2003). Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* **144**, 999-1007.
- Cohen MI and Shaw CF. (2004). Role in the inspiratory off-switch of vagal inputs to rostral pontine inspiratory-modulated neurons. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 127-140.
- Cullinan WE, Herman JP and Watson SJ, (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus : evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* **332**, 1-20.
- Cutler MJ, Swift NM, Keller DM, Wasmund WL and Smith ML. (2004). Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J Appl Physiol* **96**, 754-761.
- Czyrak A, MAckowiak M, Chocyk A, Fijal K and Wedzony K. (2003). Role of glucocorticoids in the regulation of dopaminergic neurotransmission. *Pol J Pharmacol* **55**, 667-674.
- de Kloet ER, Ruel JM and Sutanto W. (1990). Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**, 387-394.
- Dinger B, He L, Chen J, Stensaas L and Fidone S. (2003). Mechanisms of morphological and functional plasticity in the chronically hypoxic carotid body. In : Lahiri S, Semenza G, Prabhakar NR. (Eds), *Oxygen Sensing Responses and Adaptation to Hypoxia*. Marcel Dekker, New York, pp. 439-465.

- Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S and Trottier JF. (2001). Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25**, 729-741.
- Drorbough JE and Fenn WO. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**, 81-86.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW and Van Reeth O. (1999). High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci* **19**, 8656-8664.
- Dumont EC, Kinkead R, Trottier J, Gosselin I and Drolet G. (2000). Effect of chronic psychogenic stress exposure on enkephalin neuronal activity and expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurochem* **75**, 2200-2211.
- Dutschmann M and Herbert H. (2006). The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* **24**, 1071-1084.
- Ezure K. (2004). Respiration-related afferents to parabrachial pontine regions. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 167-175.
- Felman JL and McCrimmon DR. (1999). Neural control of breathing. In *Fundamental Neuroscience*, ed. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL and Squire LR, pp. 1063-1090. Academic Press, San Diego.
- Feldman JL, Gordon MS and Nattie EE. (2003). Breathing: Rythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* **26**, 239-266.
- Fidone SJ and Gonzalez C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In: Fishman AP (ed) *The respiratory system (Handbook of physiology series, section 3, vol. 2, part. 1)*. American Physiological Society, Bethesda, pp. 247-312.
- Finer NN, Higgins R, Kattwinkel J and Martin RJ. (2006). Summary proceedings from the apnea-of-prematurity group. *Pediatrics* **117**, S47-S51.
- Fournier S, Allard M, Gulemetova R and Kinkead R. (2006). Chronic elevation of corticosterone increases the ventilatory response to hypoxia in adult rats. *FASEB J* **20**.
- Francis DD, Caldji C, Champagne F, Plotsky PM and Meaney MJ. (1999). The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol Psychiatry* **46**, 1153-1166.

- Francis DD and Meaney MJ. (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 128-134.
- Franklin TB and Perrot-Sinal TS. (2006). Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 38-48.
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G and Kinkead R. (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* **554**, 543-557.
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G and Kinkead R. (2007). Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *J Appl Physiol* **102**, 1416-1421.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A and Rigual R. (1994). Carotid Body Chemoreceptors : from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**, 829-898.
- Gonzalez C, Lopez-Lopez JR, Obeso A, Perez-Garcia MT and Rocher A. (1995). Cellular mechanisms of chemoreception in the carotid body. *Respir Physiol* **102**, 137-147.
- Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH and Nemeroff CB. (1999). The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol* **11**, 545-565.
- Gunnar MR. (2003). Integrating neuroscience and psychological approaches in the study of early experiences. *Ann N Y Acad Sci* **1008**, 238-247.
- Hansen PR. (2007). Stress induced "Takotsubo" cardiomyopathy: you can die from a broken heart! *Ugeskr Leager* **169**, 1209-1211.
- Hellström S, Commissiong J and Hanbauer I. (1979). Modification of the dopamine and noradrenaline content in rat carotid body by carbohydrate-active steroids. *Neuroscience* **4**, 1157-1162.
- Herman JP, Tasker JG, Ziegler DR and Cullinan WE. (2002). Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 457-468.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC and Cullinan WE. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* **24**, 151-180.

- Hlastala M and Berger A. (1996). *Physiology of Respiration*. New York : Oxford University Press.
- Hofer MA. (1994). Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr Suppl* **397**, 9-18.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH and McNamara RK. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* **950**, 52-63.
- Joseph V, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM and Pequignot JM. (1998). Dexamethasone's influence on tyrosine hydroxylase activity in the chemoreflex pathway and on the hypoxic ventilatory response. *Pflugers Arch* **435**, 834-839.
- Joseph V, Soliz J, Pequignot J, Sempore B, Cottet-Emard JM, Dalmaz Y, Favrier R, Spielvogel H and Pequignot JM. (2000). Gender differentiation of the chemoreflex during growth at high altitude: functional and neurochemical studies. *Am J Regul Integr Comp Physiol* **278**, R806-R816.
- Joseph V, Soliz J, Soria R, Pequignot J, Favier R, Spielvogel H and Pequignot JM. (2002). Dopaminergic metabolism in carotid bodies and high-altitude acclimatization in female rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **282**, R765-R773.
- Kc P, Haxhiu MA, Trouth CO, Balan KV, Anderson WA and Mack SO. (2002). CO<sub>2</sub>-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin containing neurons. *Respir Physiol* **129**, 289-296.
- Kinkead R, Dupenloup L, Valois N and Gulemetova R. (2001). Stress-induced attenuation of the hypercapnic ventilatory response in awake rats. *J Appl Physiol* **90**, 1729-1735.
- Kinkead R, Genest SE, Gulemetova R, Lajeunesse Y, Laforest S, Drolet G and Bairam A. (2005a). Neonatal maternal separation and early life programming of the hypoxic ventilatory response in rats. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 313-324.
- Kinkead R, Gulemetova R and Bairam A. (2005b). Neonatal maternal separation enhances phrenic responses to hypoxia and carotid sinus nerve stimulation in the adult anesthetised rat. *J Appl Physiol*.
- Kinkead R, Joseph V, Lajeunesse Y and Bairam A. (2005c). Neonatal maternal separation enhances dopamine D<sub>2</sub> receptor and tyrosine hydroxylase mRNA expression levels in carotid body of rats. *Can J Physiol Pharmacol* **83**, 76-84.



- Kondo H, Iwanaga T and Nakajima T. (1982). Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body rats. *Cell Tissues Res* **227**, 291-295.
- Kornel L, Kanamarlapudi N, Travers T, Taff DJ, Patel N, Chen C, Baum RM, Raynor WJ. (1982). Studies on high affinity binding of mineralo- and glucocorticoids in rabbit aorta cytosol. *J Steroid Biochem* **16**, 245-264.
- Koshiya N and Smith, JC. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* **400**, 360-363.
- Kuhn CM and Schanberg SM. (1998). Responses to maternal separation : mechanisms and mediators. *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**, 261-270.
- Lachuer J, Delton I, Buda M and Tappaz M. (1994). The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo- pituitary-adrenal axis. *Brain Res* **638**, 196-202.
- Lahiri S, Rozanov C and Cherniack NS. (2000). Altered structure and function of the carotid body at high altitude and associated chemoreflexes. *High Alt Med Biol* **1(1)**, 63-74.
- Lai MC, Holmes GL, Lee KH, Yang SN, Wang CA, Wu CL, Tiao MM, Hsieh CS, Lee CH and Huang LT. (2006). Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats--the role of corticosterone. *Epilepsy Res* **68**, 123-136.
- Lehmann J and Feldon J. (2000). Long-term Biobehavioral Effects of Maternal Separation in the Rat: Consistent or Confusing? *Rev Neurosci* **11**, 383-408.
- Leonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V and Dupouy JP. (2002). Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* **75**, 45-54.
- Lever JD and Boyd JD. (1957). Osmiophile granules in glomus cells of the rabbit carotid body. *Nature* **179**.
- Leuengerger UA, Brubaker D, Quraishi S, Hogeman CS, Imadojemu VA, and Gray KS. (2005). Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood in humans. *Anton Neurosci* **121**, 87-93.
- Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB Jr and Mitchell GS. (2001). Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J Neurosci* **21**, 5381-5388.

- Liu D, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S., Pearson D, Plotsky PM and Meaney MJ. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659-1662.
- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM and Meaney MJ. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* **12**, 5-12.
- Liu YY, Wong-Riley MT, Liu JP, Jia Y, Liu HL, Jiao XY and Ju G. (2002). GABAergic and glycinergic synapses onto neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Botzinger complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur J Neurosci* **16**, 1058-1066.
- Mack SO, Kc P, Wu M, Coleman BR, Tolentino-Silva FP and Haxhiu MA. (2002). Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *J Appl Physiol* **92**, 826-834.
- Martin RJ, Abu-Shaweesh JM and Baird TM. (2004). Apnoea of prematurity. *Paediatr Respir Rev.* **5**, S377-S382.
- Matthews SG. (2001). Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin Neonatol* **6**, 309-317.
- Mendel CM. (1989). The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* **10**, 232-274.
- Miller DB and O'Callaghan JP. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* **51**, 5-10.
- Mitchell GS and Johnson SM. (2003). Plasticity in Respiratory Motor Control: Invited Review: Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* **94**, 358-374.
- Montandon G, Bairam A and Kinkead R. (2006). Long-Term Consequences of Neonatal Caffeine on Ventilation, Occurrence of Apneas, and Hypercapnic Chemoreflex in Male and Female Rats. *Pediatr Res* **59**, 519-524.
- Mortola JP and Dotta A. (1992). Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *Am J Physiol* **263**, R267-272.
- Mortola JP, Matsuoka T, Saiki C and Naso L. (1994). Metabolism and ventilation in hypoxic rats: effect of body mass. *Respir Physiol* **97**, 225-234.

- Naughton M, Benard D, Tam A, Rutherford R, Xie A, Bradley TD. (1993). Role of hyperventilation in the pathogenesis of central sleep apneas in patients with congestive heart failure. *Am Rev Respir Dis* **148**, 330-338.
- Neubauer JA and Sunderram J, (2004). Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol* **96**, 367-374.
- Nicolson NA. (2004). Childhood parental loss and cortisol levels in adult men. *Psychoneuroendocrinology* **29**, 1012-1018.
- Ohmori S, Kurokouchi K, Kanda K, Kawano S, Ito T, Izumi R, Yasukawa K, Inazu M, Murata Y and Seo H. (1997). Effect of bisphosphonate administration on the excretion of stress hormones in tail-suspended rats. *Environ Med* **41**, 9-12.
- Orchinik M, Carroll SS, Li YH, McEwen BS and Weiland NG. (2001). Heterogeneity of hippocampal GABA(A) receptors: regulation by corticosterone. *J Neurosci* **21**, 330-339.
- Patchev VK, Montkowski A, Rouskova D, Koranyi L, Holsboer F and Almeida OFX. (1997). Neonatal Treatment of Rats with the Neuroactive Steroid Tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) Abolishes the Behavioral and Neuroendocrine Consequences of Adverse Early Life Events. *J Clin Invest* **99**, 962-966.
- Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Brasen JH, Schulz H, Gross V, Grone HJ, Nykjaer A and Willnow TE. (2006). Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* **26**, 7236-7245.
- Ponikowski P, Chua TP, Anker SD, Francis DP, Doehner W, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Piepoli MF and Coats AJS. (2001). Peripheral Chemoreceptor Hypersensitivity: An Ominous Sign in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* **104**, 544-549.
- Powell FL, Milsom WK and Mitchell GS. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* **112**, 123-134.
- Powell FL. (2007). The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. *Respir Physiol Neurobio* **157**, 154-161.
- Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC and Feldon J. (2002). Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. *News Physiol Sci* **17**, 150-155.

- Rage F, Silhol M, Biname F, Arancibia S and Tapia-Arancibia L. (2006). Effect of aging on the expression of BDNF and TrkB isoforms in rat pituitary. *Neurobiol Aging* Epub ahead of print.
- Rastogi RB and Singhal RL. (1978). Evidence for the role of adrenocortical hormones in the regulation of noradrenaline and dopamine metabolism in certain brain areas. *Brit J Pharmacol* **62**, 131-136.
- Rekling, JC and Feldman JL. (1998). PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* **60**, 385-405.
- Sawchenko PE and Bohn MC. (1989). Glucocorticoid receptor-immunoreactivity in C1, C2 and C3 adrenergic neurons that project to the hypothalamus or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* **285**, 107-116.
- Sawchenko PE, Li HY and Ericsson A. (2000). Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress : a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* **122**, 61-78.
- Schlenker EH. (2005). Integration in the PVN : another piece of the puzzle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R653-655.
- Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER and Oitzl MS. (2004). The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol* **16**, 52-57.
- Schoffelmeer AN, De Vries TJ, Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Wardeh G and Mulder AH. (1997). Intermittent morphine administration induces a long-lasting synergistic effect of corticosterone on dopamine D1 receptor functioning in rat striatal GABA neurons. *Synapse* **25**, 381-388.
- Shoemaker JK, Vovk A and Cunningham DA. (2002). Peripheral chemoreceptor contributions to sympathetic and cardiovascular responses during hypercapnia. *Can J Physiol Pharmacol* **80**, 1136-1144.
- Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA and Fone KCF. (2006). Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: Gender-dependent effects. *Brain Research* **1097**, 123-132.
- Smith CA, Nakayama H and Dempsey JA. (2003). The essential role of carotid body chemoreceptors in sleep apnea. *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 774-779.
- Solin P, Bergin P, Richardson M, Kaye DM, Walters EH, Naughton MT. (1999). Influence of Pulmonary Capillary Wedge Pressure on Central Apnea in Heart Failure. *Circulation* **99**, 1574-1579.

- Solomon JC, Edelman NH and Neubauer JA. (2000). The pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemoreceptor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* **83**, 2354-2868.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J and Vale WW. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* **36**, 165-186.
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L and Arancibia S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* **25**, 77-107.
- Tinnikov AA. (1999). Responses of serum corticosterone and corticosteroid-binding globulin to acute and prolonged stress in the rat. *Endocrine* **11**, 145-150.
- Toran-Allerand CD, Tinnikov AA, Singh RJ and Nethrapalli IS. (2005). 17 $\alpha$ -estradiol: a brain-active estrogen? *Endocrinology* **146**, 3843-3850.
- Van den Hove, DL, Steinbush HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J and Blanco CE. (2006). Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience* **137**, 145-155.
- Wang ZY and Bisgard GE. (2002). Chronic Hypoxia-Induced Morphological and Neurochemical Changes in the Carotid Body. *Microsc Res Tech* **59**, 168-177.
- Wigger A and Neumann ID. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* **66**, 293-302.
- Wróna D and Trojnar W. (2005). Suppression of natural killer cell cytotoxicity following chronic electrical stimulation of the ventromedial hypothalamic nucleus in rats. *J Neuroimmunol* **163**, 40-52.
- Xie A, Skatrub JB, Crabtree DC, Puleo DS, Goodman BM and Morgan BJ. (2002). Neurocirculatory consequences of intermittent asphyxia in humans. *J Appl Physiol* **89**, 1333-1339.
- Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC and Haxhiu MA. (1997). The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci Lett* **232**, 63-66.
- Younes M, Ostrowski M, Thompson W, Leslie C and Shewchuk W. (2001). Chemical control stability in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1181-1190.
- Zoumakis E, Rice KC, Gold PW and Chrousos GP. (2006). Potential uses of corticotropin-releasing hormone antagonists. *Ann N Y Acad Sci* **1083**, 239-251.