



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ  
NANCY 1  
ÉCOLE DOCTORALE  
"BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT"

UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC  
PROGRAMME de DOCTORAT  
en MÉDECINE EXPÉRIMENTALE

**THÈSE**  
**Cotutelle France – Québec**

Présentée et soutenue publiquement  
Le 13 Novembre 2002 à Nancy

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ  
HENRI POINCARÉ – NANCY I**  
Mention Sciences du Médicament

Et le grade de

**PHILOSOPHIAE DOCTOR  
DE L'UNIVERSITÉ LAVAL – QUÉBEC**  
Mention Médecine expérimentale

Par

Jean-Marc LABAUNE

Né le 2 Juillet 1966

Sujet :

**Effet de l'exposition anténatale aux corticoïdes et de l'hypoxie  
sur l'expression du récepteur dopaminergique D1  
dans la surrénale de lapin en développement**

DB 28447

**MEMBRES DU JURY**

Juges :

Pr Aida BAIRAM (Faculté de Médecine - Québec)  
Pr Louise BEAULAC - BAILLARGEON (Faculté de Pharmacie - Québec)  
Dr Marie-Jeanne BOUTROY (Faculté de Médecine - Nancy)  
Dr Gérald CATAU (Faculté de Pharmacie - Nancy)  
Pr Aurore CÔTÉ (Faculté de Médecine McGill - Montréal)  
Pr Guy PUTET (Faculté de Médecine - Lyon)



BU PHARMA-ODONTOL



D

104 063337 6

# SOMMAIRE



## INTRODUCTION

1

## SECTION BIBLIOGRAPHIQUE

3

<p><b><u>CHAPITRE I :</u></b> <b>Les Récepteurs Dopaminergiques</b> <b>et Le Récepteur Dopaminergique D1</b></p>
--

<b>I. Dopamine et Système Dopaminergique</b>	<b>3</b>
<b>II. Structure des Récepteurs Dopaminergiques</b>	<b>5</b>
<b>1. Données Générales</b>	<b>5</b>
<b>2. Particularités des Différents sous-Types</b>	<b>6</b>
<b>III. Propriétés Pharmacologiques des Récepteurs Dopaminergiques</b>	<b>8</b>
<b>1. Profil Pharmacologique</b>	<b>8</b>
<b>2. Mécanisme d'Action des Récepteurs Dopaminergiques</b>	<b>9</b>
2.1 Adénylate Cyclase	10
2.2 Mobilisation du Calcium intracellulaire	10
2.3 Canaux Potassiques	11
2.4 Divers	12
<b>IV. Distribution des Récepteurs Dopaminergiques</b>	<b>13</b>
<b>1. au niveau du Système Nerveux Central</b>	<b>13</b>
1.1 Anatomie des Systèmes Dopaminergiques Centraux	13
1.2 Le Système Dopaminergique Striatum	14

<b>2. au niveau Périphérique</b>	17
2.1 Systèmes Dopaminergiques Périphériques	18
2.1.1 au niveau des vaisseaux sanguins	18
2.1.2 au niveau des reins	18
2.1.3 au niveau du tissu nerveux périphérique	19
2.1.4 au niveau surrénalien	20
2.2 Le Système Dopaminergique Surrénalien	20
2.2.1 au niveau du cortex surrénalien	20
2.2.2 au niveau de la médullosurrénale	22

<p><b><u>CHAPITRE II :</u></b>  <b>La Glande Surrénale</b>  <b>et Les Fonctions Surréaliennes</b></p>
---

<b>I. La Glande Surrénale</b>	24
<b>1. Embryologie</b>	24
1.1 Corticosurrénale	25
1.2 Médullosurrénale	25
<b>2. Anatomie</b>	25
2.1 Macroscopiquement	25
2.1.1 dans l'espèce humaine	25
2.1.2 chez le lapin	26
2.2 Histologiquement	26
2.2.1 corticosurrénale	27
2.2.2 médullosurrénale	27
<b>3. Vascularisation</b>	28
<b>4. Innervation</b>	29
4.1 de la Corticosurrénale	29
4.2 de la Médullosurrénale	30

<b>II. Les Fonctions de la Glande Surrénale</b>	<b>31</b>
<b>1. La Fonction Corticosurrénalienne</b>	<b>31</b>
1.1 Généralités	31
1.2 Les Glucocorticoïdes	32
1.2.1 Structure	32
1.2.2 Biogenèse	33
1.2.3 Transport	34
1.2.4 Catabolisme	34
1.2.5 Contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes	35
1.2.6 Action générale des corticoïdes	36
<i>a. Les effets métaboliques du Cortisol</i>	36
<i>b. Glucocorticoïdes et système immunitaire</i>	37
<i>c. La réponse au stress via les glucocorticoïdes</i>	37
1.2.7 Au cours du développement fœtal	38
<i>a. Activité corticosurrénalienne fœtale</i>	38
<i>b. Mécanisme de régulation</i>	39
<b>2. La Fonction Médullosurrénalienne</b>	<b>40</b>
2.1 Ontogenèse des Cellules Médullosurrénaliennes	40
2.2 Les Hormones de la Médullosurrénale	42
2.3 Les Catécholamines	43
2.3.1 Métabolisme	44
<i>a. Biosynthèse</i>	44
<i>b. Stockage et Libération</i>	44
<i>c. Inactivation</i>	45
- <i>Catabolisme des catécholamines</i>	45
- <i>Captation cellulaire</i>	45
2.3.2 Régulation de la synthèse des catécholamines	46
<i>a. Régulation hormonale</i>	46
<i>b. Régulation nerveuse</i>	46
<i>c. Régulation locale</i>	47
2.3.3 Effets et Mode d'action	48



<b>1.1 Définition</b>	63
<b>1.2 Mécanismes Généraux</b>	64
<b>1.3 Au niveau Tissulaire</b>	65
1.3.1 Place du corps carotidien	65
1.3.2 Production d'Erythropoïétine	67
<b>1.4 Au niveau Moléculaire</b>	69
1.4.1 HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1)	69
1.4.2 Modèles moléculaires de sensibilité à l'oxygène	70
<b>2. Dopamine et Récepteurs Dopaminergiques</b>	71
<b>3. Glande Surrénale et Réponse à l'hypoxie</b>	73
<b>3.1 La Corticosurrénale</b>	73
<b>3.2 La Médullosurrénale</b>	74
<b>3.3 Spécificité de la période périnatale</b>	75
<b><u>SECTION EXPERIMENTALE</u></b>	77

<p><b><u>CHAPITRE I:</u></b>  <b>Exposition Anténatale à la Bétaméthasone</b>  <b>Et Expression des Récepteurs Dopaminergiques</b></p>
--

<b>I. Situation du sujet</b>	77
<b>II. Définition des Objectifs</b>	79
<b>III. Effet d'une exposition anténatale à la Bétaméthasone</b> <b>Sur l'expression de l'ARN messager des récepteurs</b> <b>Dopaminergiques Centraux D1 et D2</b>	81

<b>1. Hypothèse et But du Travail</b>	81
<b>2. Travail Réalisé</b>	82
<b>2.1 Célestone Solupsan</b>	82
2.1.1 Structure chimique	82
2.1.2 Pharmacocinétique et Métabolisme	82
2.1.3 Indication	83
<b>2.2 Traitement des Animaux</b>	83
<b>2.3 Méthodes</b>	84
2.3.1 Prélèvements des striata	84
2.3.2 Extraction de l'ARN	85
2.3.3 Fabrication des sondes	86
2.3.4 Analyse par technique de Northern Blot	86
<b>3. Principaux Résultats</b>	87
<b>3.1 Groupe Témoin</b>	87
<b>3.2 Effet de la Bétaméthasone</b>	88
3.2.1 Sur l'expression du R DA D1	88
3.2.2 Sur l'expression du R DA D2	88
<b>4. Conclusion</b>	89
<b>5. Publication</b>	89
<b>IV. Effet d'une Exposition Anténatale à la Bétaméthasone sur l'Expression de l'ARN messager du Récepteur Dopaminergique Périphérique D1.</b>	90
<b>1. Hypothèse et But du Travail</b>	90
<b>2. Travail Réalisé</b>	91
<b>2.1 Ontogenèse</b>	91

2.1.1 But du travail	91
2.1.2 Etapes du travail	92
2.1.3 Méthodes	92
<b>2.2 Effet Pharmacologique</b>	<b>93</b>
2.2.1 But du travail	93
2.2.2 Etapes du travail	93
2.2.3 Méthodes	94
<b>3. Principaux Résultats</b>	<b>97</b>
<b>3.1 Ontogenèse</b>	<b>94</b>
<b>3.2 Effet de la Bétaméthasone</b>	<b>95</b>
<b>4. Conclusion</b>	<b>95</b>
<b>5. Publication</b>	<b>96</b>

<p><b><u>CHAPITRE II:</u></b>  <b>Exposition Postnatale à l'Hypoxie</b>  <b>Et Expression du Récepteur Dopaminergique Surrénalien D1</b></p>
--

<b>I. Situation du sujet</b>	<b>97</b>
<b>II. Définition des Objectifs</b>	<b>98</b>
<b>III. Effet de l'exposition postnatale à l'hypoxie Sur l'expression de l'ARN messager des récepteurs Dopaminergiques D1 dans la glande surrénale de lapins au cours du développement</b>	<b>100</b>
<b>1. Hypothèse et But du Travail</b>	<b>100</b>
<b>2. Travail Réalisé</b>	<b>101</b>
<b>2.1 L'Hypoxie</b>	<b>101</b>
2.1.1 Niveaux d'hypoxie	101
2.1.2 La chambre d'hypoxie	102

<b>2.2 Méthodologie d'Etude</b>	102
<b>2.3 Méthodes Expérimentales</b>	103
2.3.1 Exposition	103
2.3.2 Prélèvement d'organes	104
2.3.3 Analyse de type Northern Blot	104
<b>3. Principaux Résultats</b>	105
<b>3.1 Groupe Témoin</b>	105
<b>3.2 Groupe des Nouveau-Nés de 1 jour</b>	105
<b>3.3 Groupe des Jeunes de 25 jours</b>	105
<b>3.4 Groupe des Adultes de 6 mois</b>	106
<b>4. Conclusion</b>	106
<b>5. Publication</b>	107
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	108
<b><u>CONCLUSION</u></b>	122
<b><u>ANNEXE TECHNIQUE</u></b>	125
<b>I. Sujets et Prélèvements</b>	125
<b>1. Les Animaux</b>	125
<b>2. Méthodes de Prélèvements</b>	127
<b>II. Techniques de Biologie Moléculaire</b>	127

<b>1. Fabrication des Sondes Spécifiques</b>	128
<b>1.1 Pour le R DA D1</b>	128
<b>1.2 Pour le R DA D2</b>	129
<b>2. Extraction de l'ARN</b>	129
<b>3. Les Etapes de l'Etude par Northern Blot</b>	129
<b>3.1 Etape de Migration de l'ARN</b>	129
<b>3.2 Transfert sur Membrane de Nylon</b>	130
<b>3.3 Etapes d'Hybridation de la Membrane</b>	130
<b>4. Obtention et Analyse des Résultats</b>	131
<b>III. L'Etude Hypoxie et la Chambre d'Hypoxie</b>	132
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	135



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique d'un récepteur dopaminergique	5
<b>Figure 2</b> : Représentation moléculaire du récepteur dopaminergique D1	6
<b>Figure 3</b> : Schéma récapitulatif des différents signaux de transduction impliqués avec les récepteurs dopaminergiques	10
<b>Figure 4</b> : Schéma représentant l'organisation synaptique du système dopaminergique striatal	16
<b>Figure 5</b> : Position anatomique des glandes surrénales de lapin	26
<b>Figure 6</b> : Structure microscopique de la glande surrénale	27
<b>Figure 7</b> : Structure de base des stéroïdes	32
<b>Figure 8</b> : Principales chaînes de biogenèse des glucocorticoïdes	33
<b>Figure 9</b> : Schéma du modèle de contrôle en deux étapes au cours de la différenciation des cellules chromaffines	42
<b>Figure 10</b> : Schéma des différentes voies de biosynthèse des catécholamines	44
<b>Figure 11</b> : Expression des ARNm des R DA D1 et R DA D2 dans le striatum	88
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique de la chambre d'hypoxie telle que conçue par notre laboratoire	133
<b>Tableau 1</b> : Tableau récapitulatif des données biologiques essentielles concernant les récepteurs dopaminergiques	7
<b>Tableau 2</b> : Tableau des caractéristiques pharmacologiques principales des récepteurs dopaminergiques	9

# ABREVIATIONS



<b>αMSH</b>	α Melanocyte stimulating hormone
<b>A</b>	Adrénaline
<b>AC</b>	Adénylate cyclase
<b>ACTH</b>	Hormone adénocorticotrope
<b>AMPc</b>	Adénosine 5'-monophosphate cyclique
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>ARNr</b>	Acide Ribonucléique ribosomal
<b>CA</b>	Catécholamines
<b>CBG</b>	Corticosteroid binding globulin
<b>Cellules PC12</b>	Lignée cellulaire d'un phéochromocytome de rat
<b>Cellules SIF</b>	Cellules "Small Intensively fluorescent"
<b>COMT</b>	Catéchol-O-méthyl transférase
<b>CRF</b>	Corticotrophin Releasing Factor
<b>Cytochrome b-like NAD(P)H</b>	Cytochrome b-like nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduite
<b>DA</b>	Dopamine
<b>DHAS</b>	Sulfate Déhydroépiandrosterone
<b>Epo</b>	Erythropoïétine
<b>F<sub>i</sub>O<sub>2</sub></b>	Fraction inspirée en Oxygène
<b>GMP</b>	Guanosine 5'-monophosphate
<b>GTP</b>	Guanosine Triphosphate
<b>HIF-1</b>	Hypoxia Inducible Factor – 1
<b>kDA</b>	kilodaltons
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante d'inhibition
<b>MAO</b>	Monoamine oxydase
<b>NA</b>	Noradrénaline
<b>nM</b>	nanomoles

<b>PI</b>	Phosphatidyl inositol
<b>PNMT</b>	Phényléthanolamine N-méthyl-transférase
<b>POMC</b>	Pro-Opio-Mélanocortine
<b>Pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase</b>	Pompe Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> AdénosineTriPhosphatase
<b>R DA D1</b>	Récepteur dopaminergique D1
<b>R DA D2</b>	Récepteur dopaminergique D2
<b>R DA D3</b>	Récepteur dopaminergique D3
<b>R DA D4</b>	Récepteur dopaminergique D4
<b>R DA D5</b>	Récepteur dopaminergique D5
<b>ROS</b>	« Reactive Oxygen Species »
<b>SA</b>	Semaine d'aménorrhée
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>TH</b>	Tyrosine Hydroxylase
<b>V max</b>	Vitesse maximale

# **INTRODUCTION**

Chez l'homme, comme chez tous les mammifères, la naissance est une étape cruciale du développement. Elle marque le passage obligatoire de l'état fœtal, stade initial du développement intimement lié à l'organisme maternel, à un état de vie extra-utérine à partir duquel l'organisme poursuivra, de façon indépendante, son évolution. L'adaptation à la vie extra-utérine exige donc une intégrité parfaite des mécanismes physiologiques mis en jeu pour sa réussite, alors même que cet organisme demeure, pour une grande part de ses fonctions, immature. L'enjeu est d'importance car il conditionne à court terme, mais aussi à plus long terme, la survie de l'individu.

Au centre des mécanismes d'adaptation se trouve la glande surrénale, organe spécifique aux mammifères. Son rôle apparaît fondamental tout au long du développement mais plus particulièrement lors de la naissance. Sa capacité à répondre à un stimulus biochimique ou pharmacologique, en libérant catécholamines et corticoïdes, est primordiale pour le maintien de l'homéostasie des fonctions vitales cardiovasculaires et respiratoires au cours du stress généré par la naissance et par le passage à la vie aérienne.

*Notre travail de recherche se situe à la croisée des thématiques des deux équipes qui nous ont accueilli : l'une, basée à Nancy (France), animée par le Dr MJ Boutroy sur le thème de "l'effet de l'exposition anténatale aux médicaments sur l'adaptation néonatale, et particulièrement le fonctionnement surrénalien", la seconde, basée à Québec (Canada), animée par le Dr A Bairam sur le thème de "l'effet de l'hypoxie sur les mécanismes de régulation physiologique via l'expression des récepteurs dopaminergiques périphériques, particulièrement au sein du corps carotidien".*

Il est basé sur le fait que l'expression d'une catécholamine, la dopamine, celle de ses récepteurs ou celle de leurs ARN messagers, peut être perturbée par des stimuli fréquemment présents en période périnatale, et que les modifications engendrées peuvent être observées

tout au long du développement de l'individu. Il s'est focalisé sur les effets d'un stimulus pharmacologique, l'administration anténatale d'un corticoïde, et d'un stimulus physiologique, l'exposition à différents degrés d'hypoxie, sur l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale, de la naissance à l'âge adulte.

Une étude préliminaire consistera, dans un premier temps, à étudier l'expression de l'ARN messager des récepteurs dopaminergiques dans un système de référence, au cours du développement, et à rechercher une modulation de cet ARNm après exposition anténatale à un corticoïde exogène. Nous prendrons le striatum comme organe de référence, car son système dopaminergique est bien connu et très riche en récepteurs dopaminergiques. Ceci nous permettra de valider nos techniques d'analyse de type Northern Blot.

Nous étudierons ensuite, dans la surrénale, l'ontogénèse du récepteur dopaminergique périphérique D1 comparée à celle du récepteur central dans le striatum, puis l'effet de l'exposition anténatale à un corticoïde exogène sur l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1.

Enfin, dans un dernier temps, nous nous intéresserons à l'effet de différentes conditions d'hypoxie sur l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique surrénalien D1.

Le modèle animal retenu pour ces travaux est le Lapin en raison du caractère proche de son système sympatho-adrénergique comparativement à celui de l'Homme, et en raison de l'existence d'une littérature scientifique le concernant dans ce domaine d'investigation.

La présentation de nos travaux sera précédée d'un rappel de la littérature sur les différentes composantes du sujet.

**SECTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre I

# **Les Récepteurs Dopaminergiques Et Le Récepteur Dopaminergique D1**

### **I. Dopamine et Système Dopaminergique**

Chez les mammifères, la dopamine représente un neurotransmetteur prédominant, en particulier dans les structures cérébrales où elle contrôle de multiples fonctions : de l'activité locomotrice, à la prise alimentaire ou les régulations endocrines... (Horn 1990, Missale 1998). Elle participe également en périphérie à plusieurs mécanismes physiologiques. Elle est ainsi particulièrement impliquée dans le tonus vasculaire, la libération catécholaminergique...

Le système dopaminergique a donc été l'objet de nombreuses recherches depuis maintenant plus de 30 ans. Et ceci a conduit, en pratique clinique, à la découverte de thérapeutiques fondées sur l'administration de cette catécholamine ou de ses précurseurs, et qui ont révolutionné la prise en charge de pathologies comme la maladie de Parkinson, ou les états de collapsus cardiovasculaire.

Ce sont les études biochimiques, réalisées au début des années 1970, qui ont, les premières, fait évoquer la présence de récepteurs dopaminergiques dans le SNC en mettant en évidence que la dopamine était capable de stimuler l'Adénylate Cyclase (AC) (voir pour revue

Kebadian 1979). Vers la fin de cette même décennie, il était proposé, sur la base des données pharmacologiques et biochimiques recueillies, l'existence de 2 populations distinctes de récepteurs dopaminergiques : l'une était couplée positivement à l'AC, la seconde était indépendante du système de l'AMPc (Spano 1978). En 1979, Kebabian et Calne ont résumé ces constatations dans un article dans lequel ils suggéraient de nommer D1, le récepteur qui possédait la propriété de stimuler l'AC, et D2 celui qui n'était pas couplé à ce système. Par la suite, les investigations se sont poursuivies permettant de définir plus précisément les caractéristiques pharmacologiques, biochimiques et physiologiques. La distribution anatomique des récepteurs a été précisée ensuite grâce notamment aux techniques de biologie moléculaire.

Dans le même temps, et à partir d'études physiologiques, en particulier, sur le débit sanguin rénal chez le chien, l'existence de récepteurs dopaminergiques périphériques était montrée. Des propriétés pharmacologiques différentes semblaient les distinguer des récepteurs centraux ; ils étaient alors appelés DA1 et DA2 (Goldberg 1978). Une décennie plus tard, les études biochimiques et de biologie moléculaire qui ont suivi au niveau des tissus périphériques ont mis en évidence des similitudes manifestes qui ont amené à écarter cette classification distincte entre récepteurs centraux et périphériques (Andersen 1990).

Jusqu'à l'arrivée des techniques de clonage des gènes, le concept de 2 récepteurs dopaminergiques a prévalu. Depuis le début des années 1990, la mise au point et le recours aux techniques de clonage ont permis de mettre en évidence 3 nouveaux récepteurs dopaminergiques qui ont été nommés D3, D4 et D5 (Sokoloff 1990, O'Malley 1992, Weinshank 1991). Les études ultérieures ont mises en évidence une homologie du domaine transmembranaire de D5 avec D1 et une similitude importante des séquences transmembranaires de D3 et D4 avec D2 (Civelli 1993). Quant aux études de binding, elles

montraient que le récepteur D5 possédait des caractéristiques comparables à celles de D1 ; alors que D3 et D4 avaient des affinités proches pour des ligands spécifiques de D2 (Civelli 1993, Seeman 1994, Sokoloff 1995). Enfin, il était possible de définir, chez ces nouveaux récepteurs, le caractère positif ou négatif de leur couplage à l'AC. De sorte que le concept initial de dualité des 2 récepteurs dopaminergiques D1 et D2 a évolué vers une classification en 2 familles avec des sous-types. Cependant, la distinction selon la propriété de stimulation ou inhibition de l'AC restait valide. En effet, les récepteurs dopaminergiques sont désormais classés en famille des récepteurs dopaminergiques D1 like (qui sont couplés à la stimulation de AC) comprenant les récepteurs dopaminergiques D1 et D5, et en famille des récepteurs dopaminergiques D2 like (qui inhibent la formation d'AMPC) comprenant les récepteurs dopaminergiques D2, D3 et D4 (Missale 1998).

Les dernières années ont vu se réaliser de nombreuses recherches qui permettent aujourd'hui de mieux connaître la répartition de ces récepteurs dans l'organisme, d'en apprécier plus justement leur fonction et d'essayer de comprendre la fonctionnalité du système dopaminergique dans son ensemble, tant au niveau central que périphérique.

## **II. Structure des récepteurs dopaminergiques**

Les études de clonage, développées à la fin des années 1980 et au début des années 1990, ont fait particulièrement progresser la connaissance et la compréhension de la structure des récepteurs dopaminergiques.

### **1. Données générales**

Les récepteurs dopaminergiques sont des glycoprotéines, qui appartiennent à la "*super*" famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils en partagent la plupart des caractéristiques

moléculaires et correspondent au modèle structural admis pour les récepteurs de cette famille (voir sur verso précédent figure 1). Ils présentent donc 7 domaines transmembranaires hydrophobes avec un fragment N-terminal en position extracellulaire; les domaines transmembranaires étant reliés par des boucles protéiques extra (n = 3) ou intracellulaires (n = 3). C'est au sein de ces domaines que se trouve le site de binding du récepteur. Les boucles extracellulaires 2 et 3 possèdent chacune un résidu cystéine qui forment ainsi un pont disulfure, qui paraît essentiel pour la stabilisation de la structure du récepteur. Quant au fragment C-terminal, de localisation intracellulaire, il est riche en sérine et thréonine. Il possède également un résidu cystéine (élément hautement conservé entre tous les récepteurs couplés aux protéines G) et porte un résidu palmitoyl qui permet alors d'avoir un lien plus fort avec la membrane cellulaire (Strange 1990).

## **2. Particularités des différents sous types**

A l'intérieur d'une même sous famille de récepteurs dopaminergiques, il existe une homologie au niveau principalement des domaines transmembranaires: 80 % entre D1 et D5, 75 % entre D2 et D3 et 53 % entre D2 et D4 (Missale 1998). Cependant, ils se distinguent les uns des autres par plusieurs caractéristiques:

- Ainsi, le nombre de sites de N- glycosylation est variable : deux pour D1 et D5 dont un situé dans le fragment N-terminal et un dans la seconde boucle extracellulaire, quatre pour D2, trois pour D3 et seulement un pour D4.

- La longueur du fragment C-terminal semble déterminante. 7 fois plus longue chez les récepteurs D1-like par rapport aux D2-like, elle est associée chez les D1-like à une troisième boucle intracellulaire courte (voir ci-contre figure 2). Alors que l'on note l'inverse chez les D2-like, dont la troisième boucle intracellulaire est longue et le fragment C-

terminal court. Il est avancé que ceci pourrait avoir une importance dans les mécanismes d'interaction avec les protéines G et par voie de conséquence avec le mécanisme d'action des récepteurs dopaminergiques. En effet, une troisième boucle intracellulaire longue est une caractéristique commune aux récepteurs interagissant avec la protéine  $G_i$  qui inhibe l'adénylate cyclase. Inversement, une troisième boucle courte est retrouvée généralement chez les récepteurs couplés à la protéine  $G_s$  (Sibley 1992).

- La nature et la localisation des acides aminés au sein de la structure protéique du récepteur apparaissent également primordiales. Les récepteurs D1-like possèdent comme tous les récepteurs couplés aux protéines G un résidu cystéine situé au niveau du début du fragment C-terminal. Chez les récepteurs D2-like, il est présent à la fin du fragment.

- A l'intérieur même des sous familles de récepteurs dopaminergiques, la séquence des acides aminés représente l'élément divergent lorsque la taille du fragment est identique. C'est, par exemple, le cas de D1 et D5 pour leur troisième boucle intracellulaire ou leur fragment C-terminal.

- Enfin, le nombre d'acides aminés est primordial et variable selon le type du récepteur et l'espèce animale considérée. Il détermine même l'existence de deux isoformes du récepteur D2 (résultant d'un épissage alternatif du gène) nommées D2L (plus long de 29 acides aminés) et D2S (forme la plus courte).

Les caractéristiques principales de chaque récepteur sont complétées et résumées dans le tableau 1 ci-contre.

### **III. Propriétés pharmacologiques des récepteurs dopaminergiques**

#### **1. Profil pharmacologique**

La dopamine représente l'agoniste naturel de tous les récepteurs dopaminergiques. Cependant, de nombreux composants sont susceptibles d'interagir avec les différents récepteurs dopaminergiques. La mise en évidence d'un profil pharmacologique propre à chaque récepteur a été à l'origine de la classification initiale des récepteurs dopaminergiques. En 1979, Kébadian et Calne ont distingué la dualité des 2 sous familles en étudiant les effets d'agonistes et d'antagonistes dopaminergiques sur la concentration intracellulaire en 3'5'adénosine monophosphate (AMPC). La stimulation de D1 en activant l'adénylate cyclase, provoque une augmentation du contenu intracellulaire en AMPC. Ce qui n'est pas le cas lors de la stimulation de D2 qui inhibe cette enzyme, ou n'interagit pas avec elle.

Les études de l'affinité des récepteurs dopaminergiques pour différents ligands ont complété les données initiales. Il est désormais possible de préciser pour chacun d'eux des substances agonistes spécifiques: SKF 38393 pour le récepteur D1, quinpirole pour le récepteur D2; comme des substances antagonistes spécifiques: SCH 23390 pour D1 et sulpiride pour D2. L'analyse plus fine pour chaque sous type permet de déterminer des profils pharmacologiques, qui, bien que comparables selon leur appartenance à la sous famille D1 like ou D2 like, se distinguent par des niveaux d'affinité différents. Par exemple, si D1 et D5 ont une sensibilité très proche vis-à-vis de leurs antagonistes ; c'est leur agoniste naturel, la dopamine, qui permet le plus justement de les discriminer. Dans la famille des récepteurs D2 like, les isoformes du récepteur D2 paraissent ne pas pouvoir être distinguées avec un profil quasi identique (2 publications font cependant état d'une petite différence d'affinité pour le sulpiride

et le raclopride (Castro 1993, Malmberg 1993)). En revanche D3 et D4 présentent des affinités distinctes à leurs composants classiques. La dopamine est une nouvelle fois un bon élément discriminant. (voir ci-contre tableau 2).

Les études pharmacologiques ont été les premières à pouvoir apprécier la distribution par tissu de l'expression des récepteurs dopaminergiques. Il a ainsi été déterminé que certains tissus n'exprimaient qu'un seul type de récepteurs: D1 dans la glande parathyroïde, D2 au sein des cellules mamotrophes de l'hypophyse antérieure.

## **2. Mécanismes d'action des récepteurs dopaminergiques**

Lors de la liaison de la dopamine à son récepteur spécifique, une cascade d'évènements de transduction va s'amorcer. Elle aboutira à une réponse intracellulaire adaptée et conséquence de l'information véhiculée par la dopamine. Cette information aura cheminé à travers la membrane plasmique à la suite d'un signal initial, largement amplifié et mettant en jeu des voies énergétiques indispensables au bon fonctionnement de cette voie de signalisation intracellulaire.

Les récepteurs dopaminergiques sont liés à plusieurs systèmes de seconds messagers cellulaires. Le système obligatoire et/ou préférentiel (historiquement le premier et mieux connu) est celui du couplage récepteur dopaminergique - adénylate cyclase. Néanmoins, les études plus récentes ont permis d'établir la présence d'autres mécanismes impliqués dans la réponse aux récepteurs dopaminergiques.

## **2.1 Adénylate cyclase**

Le rôle de second messenger intracellulaire de l'AMPc est connu depuis plus de quatre décennies. L'accumulation dans la cellule de ce produit, qui provient de la transformation de l'ATP, permet la modulation de nombreux processus enzymatiques. Sa production est catalysée par une enzyme: l'adénylate cyclase. Il y a maintenant plus de trente ans qu'est mise en évidence une influence des récepteurs dopaminergiques sur l'activité de l'adénylate cyclase. Le couplage se fait grâce à plusieurs sous-unités dont l'une à la propriété de fixer le GTP (ou protéine G). On décrit plusieurs protéines G qui se distinguent par leurs fonctions: protéine Gs, responsable de l'activation de l'AC, protéine Gi qui l'inhibe.

L'activation de l'adénylate cyclase médiée par la protéine Gs est une propriété générale des récepteurs D1 like, alors que l'inhibition de l'AC représente une propriété générale des récepteurs D2 like (voir ci-contre figure 3).

## **2.2 Mobilisation du calcium intracellulaire**

De nombreuses études montrent que la stimulation des récepteurs dopaminergiques donne lieu à une modification du taux de calcium intracellulaire (Lin 1995, Frail 1993, Valentijn 1993). Leur influence sur cet autre second messenger impliqué dans la réponse cellulaire à un stimulus est aujourd'hui bien admise. Cependant, les mécanismes apparaissent multiples et complexes, encore imparfaitement appréhendés. Les récepteurs D1 like comme les D2 like possèdent une propriété de régulation sur le taux de calcium intracellulaire.

L'association activation des récepteurs D2 et baisse de la concentration cellulaire en calcium a été mise en évidence chez plusieurs lignées cellulaires, dont les cellules lactophores hypophysaires (Lledo 1992). Elle est le fait d'une inhibition du flux calcique entrant *via* l'inhibition de plusieurs types de canaux calciques voltage-dépendants (VSCCs) comme cela

a été montré sur les cellules chromaffines bovines (Bigornia 1990). 2 hypothèses sont avancées pour expliquer cet effet, soit une action par l'intermédiaire du courant potassique qui modifierait le potentiel de membrane, soit l'activation des protéines G qui inhiberait directement certains canaux calciques. A l'inverse des premières constatations concernant stimulation de D2 et baisse du calcium intracellulaire, quelques auteurs ont observé sur des lignées cellulaires très spécifiques une augmentation du calcium intracellulaire secondaire à la stimulation de l'hydrolyse du phosphatidylinositol (PI). C'est le cas des cellules Ltk<sup>c</sup> (Vallar 1990) et CCL1.3 (Tang 1994).

Cependant, ce mécanisme cellulaire de mobilisation du calcium intracellulaire après stimulation d'un récepteur dopaminergique semble être plutôt l'apanage du récepteur D1. Il a maintenant été bien montré qu'un des mécanismes de réponse cellulaire engendrée par le récepteur dopaminergique D1 et conduisant à une élévation du taux de calcium intracellulaire était la stimulation de l'hydrolyse du PI par la phospholipase C. Il y a alors production de 1.4.5-trisphosphate qui mobilise les stocks intracellulaires de calcium (Missale 1998). Ce mécanisme de couplage récepteur D1 et augmentation du calcium intracellulaire ne semble pas unique. Il a été décrit chez les cellules 293 un autre mécanisme mettant en jeu une élévation de l'AMPc, résultat probable d'une activation de la protéine kinase A (Lin 1995).

### **2.3 Les canaux potassiques**

Le rôle des récepteurs dopaminergiques dans la modulation des courants potassiques cellulaires a surtout été bien documenté pour le D2 (voir Missale pour revue 1998). L'action de D1 semble plus accessoire et moins bien définie: elle augmente la sortie du potassium cellulaire dans les cellules rétinienne de poussins (Laitinen 1993) alors qu'elle inhiberait les courants potassiques dans les neurones striataux de rat (Kitai 1993). En revanche, il est

parfaitement admis que les récepteurs dopaminergiques D2 augmentent l'activité des canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation cellulaire. Cette activation des courants potassiques est modulée par un mécanisme protéine G dépendant.

## 2.4 Divers

D'autres signaux de transduction semblent pouvoir être mis en jeu après une stimulation des récepteurs dopaminergiques, mais les mécanismes conduisant du récepteur au second messenger ou à l'effet physiologique apparaissent moins clairs.

Il est cependant certain que le récepteur D2 potentialise la libération d'acide arachidonique au sein des cellules CHO (Piomelli 1991), probablement par modification de l'activité de la phosphokinase C. D1 pourrait avoir également un effet sur cette libération.

Les récepteurs dopaminergiques sont impliqués plus généralement dans des mécanismes complexes de physiologie cellulaire. Ainsi D1 inhibe l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  alors que D2 la stimule; ils participent ainsi à la régulation du pH ou du volume intracellulaires. Au niveau rénal ou cérébral, ils participent aux phénomènes de variabilité des flux cellulaires en modulant l'activité de la pompe  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  qui est une propriété de D1. Les agonistes D1 inhibent cette pompe ionique alors que les agonistes D2 sont sans effet (Missale 1998).

Enfin, les données les plus récentes font état de l'implication des récepteurs dopaminergiques dans les phénomènes de différenciation cellulaire et de mitogenèse (Missale 1998). Ce serait l'apanage des récepteurs dopaminergiques D2 like. Mais leur rôle demande à être clarifié au vu de données contradictoires faisant état selon le type cellulaire de phénomènes de

facilitation de la mitogenèse (Lajiness 1993) ou d'inhibition de la croissance cellulaire (Florio 1992).

Plus généralement, ces différentes voies de transduction du message dopaminergique nécessitent d'être mieux définies afin de comprendre plus clairement leur rôle réel dans les tissus nerveux centraux ou périphériques.

## **IV Distribution des récepteurs dopaminergiques**

### **1. au niveau du Système Nerveux Central**

Le Système Nerveux Central représente la région de l'organisme où les récepteurs dopaminergiques sont répandus de façon prédominante. Ils constituent au sein de ce tissu nerveux de véritables systèmes dopaminergiques individualisables.

#### **1.1 Anatomie des systèmes dopaminergiques centraux**

Les premières études menées concernant la localisation des récepteurs dopaminergiques l'ont été dans ce tissu. La répartition est donc particulièrement bien connue. On trouve ainsi plusieurs groupes de neurones dopaminergiques: les neurones mésencéphaliques à axone long qui se projettent dans les différentes structures télencéphaliques et les neurones diencephaliques à axone court qui innervent certaines régions hypothalamiques.

Les études immunohistochimiques ont permis d'établir une véritable cartographie qui a amené à déduire cinq domaines dopaminergiques centraux:

- Le système tubérohypophysaire constitué des cellules dopaminergiques à axone court se projetant dans l'éminence médiane, la tige hypophysaire et le lobe intermédiaire chez le rat, la post-hypophyse chez l'Homme.
- Les systèmes périventriculaire et incertohypothalamique.
- Le système mésolimbique dont les projections concernent le tubercule, le septum, le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe.
- Le système mésocortical innervant les cortex préfrontal médian, cingulaire, suprarhinal, piriforme et entorhinal.
- Le système nigro-striatal innervant le noyau caudé-putamen et le globus pallidus. Cette voie nigrostriée est la voie majoritaire où l'on retrouve deux tiers des neurones dopaminergiques centraux. Les corps cellulaires sont localisés dans la pars compacta, ainsi que dans la partie tegmentale ventrale et la partie latérale de la substance noire. Les axones rejoignent le faisceau prosencéphalique pour gagner le striatum et les autres structures centrales.

Une partie de nos travaux expérimentaux a concerné ce système, c'est la raison pour laquelle nous allons nous attacher à ne développer plus précisément que cette région du SNC.

## **1.2 Le Système Dopaminergique Striatal**

Au cours des années 1960, la dopamine a été reconnue comme neurotransmetteur du système nerveux central. Dans le cerveau, elle emprunte des voies reliant les noyaux du mésencéphale (où elle est synthétisée) à des structures sous-corticales, striatum et hypothalamus, et à des structures corticales au niveau du lobe frontal. Ses effets sont particulièrement manifestes sur le comportement ou l'activité motrice de l'individu. Le dysfonctionnement de cette structure

donne lieu à l'apparition d'une maladie neurodégénérative bien connue, la maladie de Parkinson, dont le *substratum* physiopathologique est lié à une diminution de la concentration en dopamine du système dopaminergique striatal.

La distribution de la dopamine au sein du cerveau est connue depuis les travaux de Hardy en 1987. Cette répartition n'est pas uniforme. Il apparaît des régions où la dopamine est particulièrement concentrée, d'autres où elle est absente (voir pour revue Horn 1990). C'est bien au niveau du striatum que la quantité de dopamine est la plus élevée, 18,6 nmol/g dans le putamen, 12,6 nmol/g dans le noyau caudé, soit 10 à 100 fois plus que dans l'hypothalamus ou le cortex frontal par exemple. De plus, des études *in vitro* de binding avec [3H]CBR 12935 ont mis en évidence que la densité des sites était âge-dépendante (diminution chez les individus plus âgés) (Zelnik 1986) et également fortement déplétée chez les sujets atteints de maladie de Parkinson (Maloteaux 1988).

Parallèlement à ces travaux prouvant la prédominance de ce neurotransmetteur au sein du striatum, il a été montré que la dopamine agissait par l'intermédiaire de 5 différents récepteurs dont elle constituait l'agoniste naturel. Ces récepteurs appelés dopaminergiques (nommés D1 à D5) sont répartis en 2 familles selon des critères pharmacologiques, biochimiques et de structure. Ils se distribuent de façon variable selon leur type et la région cérébrale considérée. Les études pharmacologiques de binding, d'autoradiographie et plus récemment de biologie moléculaire ont toutes mises en évidence une prédominance des récepteurs dopaminergiques dans le striatum par rapport aux autres structures cérébrales (e.g. Chen 1991). L'analyse de l'expression des récepteurs dopaminergiques par hybridation *in situ* et technique de northern blot a confirmé que le striatum représentait la région cérébrale où l'ARNm des R DA D1 et D2 était le plus concentré, et ce chez plusieurs espèces animales, comme le singe (Choi 1995)

ou la souris (Chen 1991). Ainsi la comparaison à l'hippocampe donnait, pour la souris, les résultats suivants : 180,19 *versus* 55 pour le D1 et 206,13 *versus* 64,18 pour le D2.

Le striatum apparaît donc comme l'organe de référence dans l'étude des R DA centraux. Le R DA D1 (qui est le plus largement distribué) est exprimé préférentiellement dans le striatum par les neurones GABAergiques co-exprimant la substance P (Missale 1998), tout comme, le R DA D2 mais par les neurones GABAergiques co-exprimant les enképhalines. En revanche, les R DA D3, D4, et D5 sont exprimés plus faiblement. La présence d'un synergisme D1 / D2 dans le striatum est apparue évidente au vue des études électrophysiologiques, pharmacologiques et de biologie moléculaire (Sibley 1990, Lahoste 1993, Missale 1998). Une première théorie dans l'organisation fait appel aux neurones striataux efférents qui sont connus comme étant sous influence dopaminergique. Ils sont répartis en 2 groupes définis par leur projection axonale et leur synthèse neuropeptidique (Gerfen 1992) – (voir ci-contre figure 4) : La première population qui constitue par ses projections, la voie striatonigrée, exprime la substance P et la dynorphin ; la seconde, qui forme la voie striatopallidale, contient les enképhalines. Les neurones striatonigrés expriment préférentiellement le R DA D1, médiant les effets stimulants de la dopamine sur la substance P et la dynorphin, alors que les neurones striatopallidaux expriment les R DA D2, inhibant ainsi l'expression de la prepro-enképhaline A. Il semblerait plus probable aujourd'hui que cette séparation soit le fait d'une population neuronale relativement minoritaire. Le concept qui prédomine désormais est celui d'un synergisme qui serait la résultante d'une co-expression des R DA D1 et D2 au niveau de mêmes neurones, où d'ailleurs D3, D4 et D5 pourraient jouer un rôle non négligeable (Bergson 1995).

L'effet du système dopaminergique striatal a largement été étudié sur l'activité motrice et met en lumière le caractère fondamental de ces R DA centraux. Il implique principalement le R DA D2 qui selon sa localisation peut entraîner 2 types de réaction opposée : la stimulation du R DA D2 présynaptique de nature autorécepteur est suivie d'une diminution de la libération de dopamine et donc d'une réduction de l'activité locomotrice. Alors que la stimulation du R DA D2 postsynaptique augmente modérément cette même activité. La stimulation concomitante du R DA D1 vient renforcer l'effet positif du R DA D2 postsynaptique (Missale 1998).

## **2. au niveau périphérique**

Dans de nombreux tissus périphériques, il a été possible de mettre en évidence des récepteurs dopaminergiques. Initialement, ce sont les données d'évaluation physiologique qui ont conduit à caractériser la présence de récepteurs dopaminergiques comme dans le système cardiovasculaire: les variations du flux sanguin en réponse à des agents agonistes ou antagonistes dopaminergiques le prouvaient. L'apparition des techniques de biologie moléculaire a permis de définir plus précisément dans certains tissus l'existence d'une expression ubiquitaire des récepteurs dopaminergiques. Mais tous n'ont pas encore été évalués. Cependant, les études de biologie moléculaire ont conduit à considérer les récepteurs dopaminergiques périphériques comme équivalents (au moins sur le point structural) aux récepteurs dopaminergiques centraux. La classification et la dénomination distinctes ont d'ailleurs été abandonnées.

## **2.1 systèmes dopaminergiques périphériques**

### 2.1.1 au niveau des vaisseaux sanguins

Les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont représentés dans le réseau vasculaire artériel. Les données d'études physiologiques, confirmées par des travaux faisant appel aux techniques de radioligand ou de mesures de l'activité AC, ont défini la présence de récepteurs D1 post synaptiques (localisés dans la média) au niveau des artères rénales, mésentériques et spléniques (Missale 1988). Ces récepteurs sont responsables d'une vasodilatation directe et non influencée par l'innervation sympathique (Missale 1998). On trouve également des récepteurs dopaminergiques D2, qui sont présynaptiques au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques (localisés donc dans l'adventice), et qui sont alors responsables d'une inhibition de la libération de noradrénaline, et par conséquent d'une vasodilatation indirecte (Amenta 1990). Certains ont été retrouvés dans l'intima et leur fonction demeure mal définie. Il manque encore aujourd'hui des études de biologie moléculaire portant sur les autres sous types de récepteurs dopaminergiques afin de définir dans son ensemble le système dopaminergique vasculaire.

### 2.1.2 au niveau des reins

Présents au niveau de la vascularisation rénale, les récepteurs dopaminergiques le sont également au niveau du parenchyme rénal. Ils apparaissent particulièrement impliqués dans la régulation de l'homéostasie du sodium. Les récepteurs D1 sont localisés dans le tubule proximal, la portion ascendante de l'anse de Henlé et le canal collecteur où ils inhibent alors la réabsorption du sodium. L'inhibition des pompes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  est consécutive à la stimulation de D1, avec la particularité de la présence d'un synergisme D1/D2 pour  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ .

Les récepteurs dopaminergiques rénaux sont également impliqués dans les fonctions endocrines du rein. Le récepteur D1 localisé au niveau du juxtaglomérule stimule la sécrétion de rénine. Cependant ces résultats restent controversés au vu d'études réalisées chez l'humain qui ne retiennent pas d'effet significatif de la dopamine sur la rénine (Sowers 1980, Carey 1986). De même, les récepteurs D2 du canal collecteur inhibent l'action de la vasopressine. Enfin, les récepteurs dopaminergiques D1 situés dans le glomérule rénal améliorent la filtration glomérulaire.

L'ensemble des sous types de D1 à D5 est exprimé dans le rein. La présence même d'un sixième récepteur reste très controversée (Missale 1998).

En tout état de cause, le système dopaminergique rénal est considéré comme un système périphérique majeur et donne lieu à de nombreuses études. Les implications d'un système dopaminergique défectueux dans la genèse de l'hypertension artérielle sont fortement évoquées. Et le recours à la dopamine en pathologie humaine pour améliorer la perfusion rénale est largement admis.

### 2.1.3 au niveau du tissu nerveux périphérique

La présence de récepteurs dopaminergiques D2 pré synaptiques est reconnue au niveau des terminaisons nerveuses des ganglions sympathiques. Leur stimulation inhibe la sécrétion de noradrénaline.

Plus spécifiquement, ces mêmes récepteurs ont été identifiés au niveau des corpuscules carotidiens, des ganglions pétreux et des ganglions sympathiques cervicaux supérieurs de plusieurs espèces constituant une voie nerveuse complexe responsable des chémoréflexes du corps carotidien. Dans ce corps carotidien, les récepteurs D2 sont situés en pré et post

synaptiques. Leur stimulation par la dopamine inhibe le chémoréflexe (Verna 1995). Cependant, quelques effets excitateurs ont été décrits (Monti-Bloch 1980). Et depuis peu, l'expression de l'ARNm du récepteur D1 dans le corps carotidien a été mise en évidence. Sa signification physiologique reste discutée, mais pourrait rendre compte des effets excitateurs décrits (Bairam 1998).

#### 2.1.4 au niveau surrénalien

Cet organe présente la particularité d'assurer une fonction neuro-endocrine tout à fait spécifique au sein de l'organisme, caractérisée principalement par la libération de catécholamines. A la croisée de voies nerveuses et sanguines, elle exprime et est porteuse de récepteurs dopaminergiques, tout en étant productrice de leur agoniste naturel la dopamine. Notre travail s'est intéressé essentiellement au système dopaminergique de cet organe. Nous allons donc particulièrement développer les connaissances acquises sur le sujet.

### **2.2 Le système dopaminergique surrénalien**

L'avènement dans les années 1990 des techniques de biologie moléculaire et d'immunofluorescence a permis de faire progresser de manière significative les connaissances sur le système dopaminergique surrénalien. Mais, il a souligné aussi la particulière complexité du système en rapport probable avec les multiples fonctions de cet organe. Il est possible de distinguer 2 niveaux.

#### 2.2.1 au niveau du cortex surrénalien

Dans cette partie de la glande, le système dopaminergique est impliqué dans la régulation de la sécrétion des hormones minéralocorticoïdes. Ce sont les études *in vivo* réalisées chez

l'homme et l'animal qui ont les premières suggérées la participation de la dopamine dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone. En effet, L'administration de métopropramide, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2-like, est suivie d'une élévation de la concentration plasmatique d'aldostérone ; alors qu'une perfusion de dopamine bloquait cet effet (Carey 1979, Cuche 1988). Les études de binding et d'autoradiographie menées par Amenta en 1994 ont confirmé ces résultats en montrant la présence dans le cortex surrénalien au niveau de la zone glomérulée, de récepteurs dopaminergiques D2, et peut-être plus précisément D4. La dopamine agit donc par l'intermédiaire seule des récepteurs dopaminergiques D2 (ou apparentés) afin d'inhiber la sécrétion d'aldostérone par les cellules corticosurréaliennes.

La présence des autres types de récepteurs dopaminergiques, en particulier D1 est restée controversée pendant plusieurs années. Certaines études de binding, utilisant les ligands spécifiques des récepteurs dopaminergiques D1 (notamment le SCH23390) étaient en faveur d'une localisation corticale de ces récepteurs (Bevilacqua 1982, Missale 1989). A contrario, d'autres auteurs affirmaient l'absence au niveau cortical de récepteurs D1 (Amenta 1994, Zdilar 1989). Le recours aux techniques de mise en évidence directe du récepteur a permis de préciser récemment que le récepteur dopaminergique D1 était exprimé par la corticosurrénale. Aherne en 1997, en utilisant les méthodes d'hybridation *in situ* et d'amplification *in situ*, a localisé chez le rat le R DA D1 et son ARNm. Il se situait dans les zones corticales où l'on retrouve également exprimé le récepteur dopaminergique D2 : c'est-à-dire préférentiellement au niveau de la zone glomérulée et de façon beaucoup plus accessoire dans les autres zones. Si la présence du R DA D1 dans le cortex surrénalien est admise désormais (Missale 1998), son rôle demeure inconnu en particulier pour la fonction minéralocorticoïde.

### 2.2.2 au niveau de la médullosurrénale

Le système dopaminergique est impliqué dans le contrôle de la sécrétion catécholaminergique. On retrouve à ce niveau la dualité du système avec la présence concomitante des récepteurs dopaminergiques D1 et D2.

Les études fonctionnelles pratiquées chez des chiens anesthésiés ont montré que l'activation par le quinpirole des récepteurs D2 de la médullosurrénale était suivie d'une baisse de la libération d'adrénaline lors d'un stimulus nerveux splanchnique, alors que leur blocage par de la domperidone potentialisait la réponse adrénargique post stimulus (Foucart 1988). Les études de binding conduites à partir de cellules chromaffines surrenaliennes bovines ont confirmé l'existence de ces récepteurs dopaminergiques D2 impliqués dans l'inhibition de la sécrétion catécholaminergique (Bigornia 1990, Lyon 1987). Bigornia (1990) suggère que cet effet est médié par l'inhibition des canaux calciques voltage dépendants. Enfin, les techniques d'autoradiographie (Amenta 1988), et les techniques d'analyse par Northern Blot (Pupilli 1994) ont prouvé définitivement la présence des récepteurs dopaminergiques dans la médullosurrénale. Il est possible de distinguer deux types selon leur localisation : le R DA D2 présynaptique situé sur les terminaisons nerveuses et le R DA D2 postsynaptique se trouvant sur les cellules chromaffines.

La présence de récepteur dopaminergique D1 dans la médullosurrénale n'a pas pu être mise en évidence avant le début des années 1990. Les méthodes de ligands radio-marqués n'ont jamais été capables de montrer l'existence des R DA D1 dans ce tissu. Ce n'est qu'en utilisant les outils moléculaires et l'immunofluorescence que cela est devenu possible (Barili 1996, Artéléjo 1990). Le R DA D1 semble impliqué dans la voie de réponse rapide au stress avec libération massive de catécholamines. En effet, il représenterait dans ce tissu, la base d'un

rétrocontrôle positif permettant de mobiliser rapidement les réserves en catécholamines. Cette fonction passe par la potentialisation de canaux calciques (qui doublent le courant calcique dans la cellule chromaffine) par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A. L'augmentation du calcium intracellulaire favorise la sécrétion de catécholamines. On a donc une boucle : la dopamine libérée de façon concomitante avec la noradrénaline et l'adrénaline par la surrénale stimule le R DA D1, qui stimule l'adénylate cyclase, puis la protéine kinase A qui mobilise le calcium dans les cellules chromaffines et renforce la libération catécholaminergique (Artéléjo 1990).

Plus récemment, le recours aux techniques PCR a montré qu'il existait au sein des cellules chromaffines bovines une expression des sous-types D4 et D5 qui pourraient constituer une dualité dont l'impact physiologique passerait par des voies différentes (Dahmer 1996). Dahmer en 1996 évoque un effet *via* l'inhibition plus marquée des flux sodiques des cellules chromaffines pour le R DA D5. Cependant, ils conduiraient aux mêmes effets de stimulation de la libération des catécholamines par D5 et d'inhibition par D4. D'autres investigations sont nécessaires pour apprécier la place de ces 2 sous types de récepteurs dopaminergiques.

En somme, dans la médullosurrénale, on peut retrouver un certain synergisme, comme au niveau striatal, entre les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dont les effets opposés permettent de participer au contrôle de la fonction catécholaminergique : D1 stimule la libération des catécholamines, D2 l'inhibe. Ce système semble d'ailleurs particulièrement intéressant lorsque la glande surrénale possède une certaine autonomie de réponse vis-à-vis de stimuli endo ou exogènes ; alors qu'elle n'est pas encore sous l'influence directe du contrôle neurogénique central *via* son innervation splanchnique.

## Chapitre II

# **La Glande Surrénale Et Les Fonctions Surréaliennes**

## **I. La Glande Surrénale**

Les surrénales sont des organes, au nombre de deux, que l'on retrouve chez tous les mammifères supérieurs. Elles appartiennent au groupe des glandes endocrines. Elles possèdent la particularité d'être formées de deux entités morphologiquement et physiologiquement distinctes : la partie externe, le cortex surrénal, qui entoure la partie profonde, la médullosurrénale fonctionnellement différente.

La structure corticale synthétise des hormones stéroïdes, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes, mais aussi les hormones sexuelles qui en dérivent, androgènes et oestrogènes. La médullosurrénale sécrète principalement les catécholamines, adrénaline, noradrénaline et dopamine, mais aussi quelques peptides comme les chromogranines.

Indispensables à la survie de l'individu, leur ablation ou dysfonctionnement oblige à une substitution hormonale et saline à vie. Son agénésie est incompatible avec le développement fœtal.

### **1. Embryologie**

Les deux parties de la glande surrénale ont une origine embryologique différente.

## **1.1 corticosurrénale**

Les cellules du cortex surrénalien dérivent du mésoderme à partir de cellules qui se développent au niveau de la paroi coelomique postérieure et de cellules mésenchymateuses adjacentes de chaque côté de la racine du mésentère, au-dessus du mésonéphros, en étroite relation avec les gonades primitives. Se différenciant du tissu gonadique, les cellules mésodermiques augmentent rapidement en nombre et se condensent en petits groupes de cellules acidophiles. Dans l'espèce humaine, les ébauches du cortex situées de part et d'autre de l'aorte, sont bien distinctes de l'épithélium coelomique et de la crête génitale, ce dès six semaines d'aménorrhées.

## **1.2 médulosurrénale**

Les cellules de la médulosurrénale ont une origine neurectodermique, s'individualisant en sympathogonies à partir de la crête neurale. Elles migrent pour envahir vers la neuvième semaine d'aménorrhée les ébauches mésodermiques. Elles développeront rapidement par la suite des propriétés tinctoriales chromaffines. De sorte qu'à dix semaines d'aménorrhées, cortex et médulla sont déjà parfaitement distincts.

## **2. Anatomie**

### **2.1 Macroscopiquement**

#### 2.1.1 dans l'espèce humaine

Organes pairs, les surrénales ont une position rétropéritonéale, entourées de la graisse périzonale. Elles se situent juste au-dessus du pôle supérieur du rein (expliquant historiquement leur dénomination) dans un fascia de soutien, le fascia de Gérota.

Les glandes surrénales fœtales sont très volumineuses, principalement du fait de leur partie corticale: elles sont ainsi plus larges que les reins aux troisième et quatrième mois de gestation en raison de la prédominance de développement de la zone interne corticale dite zone fœtale. Au sixième mois, leur volume est égal à environ la moitié de celui des reins. C'est en fin de gestation que l'on verra une croissance importante avec un doublement de taille entre vingt deux et trente deux semaines d'aménorrhées. Si la zone fœtale ne croît que de 15 %, la zone externe augmente de 700 % et la médulla de 400%.

A la naissance, leur poids est de dix grammes environ (soit 0.5 % du poids du corps) et la partie fœtale représente 80 % de la glande. Cette zone involuera progressivement.

La médullosurrénale est réduite pendant la vie fœtale représentant que 0.3 % du volume surrénalien. Ce même rapport persiste à la naissance. C'est après qu'elle subira une maturation fonctionnelle se manifestant par un développement de son volume jusque vers 8 à 13 ans.

### 2.1.2 chez le lapin

Le lapin constitue l'espèce animale que l'on étudiera dans nos travaux. Ses glandes surrénales se caractérisent par un tissu chromaffine abondant (ce qui en fait un modèle expérimental de choix) - Coupland 1968, Padbury 1981-. Il est possible d'individualiser dès le quatorzième jour de gestation deux structures surrénaliennes situées de part et d'autre de l'aorte. Elles se développeront pour constituer des formations ovoïdes blanchâtres indépendantes des reins. (voir ci-contre figure 5)

### **2.2 Histologiquement**

(voir ci après figure 6)

### 2.2.1 corticosurrénale

Le cortex surrénal est subdivisé en trois zones:

- la zone glomérulée: immédiatement sous la capsule, cette zone représente 15 à 20 % du volume du cortex. Les cellules qui la constituent synthétisent et sécrètent l'aldostérone (Quinn 1988, Hanukoglu 1992).

- la zone fasciculée: la distinction de la zone précédente n'est pas nette. Elle constitue l'essentiel du cortex et doit son nom à l'organisation des cellules en travées radiales qui s'étendent jusqu'à la zone réticulée. Ses cellules sont à l'origine de la synthèse des corticoïdes (Waterman 1990).

- la zone réticulée: Elle jouxte la médullosurrénale et est constituée de cellules compactes disposées en alvéoles séparées par des capillaires sinusoïdes. Elle serait responsable de la sécrétion des hormones sexuelles (Waterman 1990).

- la zone fœtale: Cette zone transitoire constitue une entité tout à fait remarquable par son évolution. Volumineuse pendant la vie fœtale, elle est composée de grandes cellules éosinophiles polyédriques aux noyaux peu colorés par les techniques classiques. Elles possèdent les caractéristiques ultrastructurales des cellules stéroïdogènes, avec en particulier un abondant réticulum endoplasmique lisse. A la naissance, cette zone présente une dégénérescence rapide aboutissant à une disparition au cours des premières semaines de vie.

### 2.2.2. médullosurrénale

Chez l'adulte, elle est constituée par deux grands types de cellules: les cellules chromaffines (majoritaires) et les neurones ganglionnaires.

Les cellules chromaffines sont de petites cellules ne possédant pas d'extensions dendritiques, disposées en cordons ou en petits amas entourés par des terminaisons nerveuses, du tissu conjonctif et des vaisseaux sanguins. Elles sont divisées en cellules adrénériques et noradrénériques. Elles se distinguent en microscopie électronique par une densité différente de leurs granules de sécrétion.

Les neurones sympathiques sont des cellules plus grandes avec des expansions dendritiques. Leur sécrétion principale est la noradrénaline.

Une troisième population, minoritaire, de cellules catécholaminergiques à la morphologie intermédiaire existe. Elles sont appelées SIF (Small Intensively Fluorescent). Elles possèdent de petits prolongements et des granules de sécrétions plus petits (Landis 1981, Tischler 1988). Enfin, quelques cellules de soutien ou de contact entre les autres cellules ont été décrites intimement associées au tissu chromaffine, appelées cellules sustentaculaires ou cellules de Schwann (Cooper 1990, Léon 1992).

### **3. Vascularisation**

En rapport à sa taille, la glande surrénale apparaît comme un des organes les plus vascularisés de l'organisme. Cette vascularisation s'articule autour de trois branches principales:

- l'artère surrénalienne supérieure, branche de l'artère phrénique inférieure.
- l'artère surrénalienne moyenne qui naît directement de l'aorte abdominale.
- l'artère surrénalienne inférieure provenant de l'artère rénale.

Elle dispose d'une double circulation artérielle et veineuse portale. Les artères médullaires traversent le cortex pour se rendre directement dans la médulla; les artères corticales irriguent le cortex à partir des plexus sous-capillaires.

Le drainage capillaire s'effectue par la veine centrale de la surrénale directement dans la veine cave inférieure à droite, et la veine rénale à gauche. Dans la zone réticulée, les capillaires se réunissent et forment des sinus veineux qui se drainent vers la médulla, apportant aux cellules médullaires une importante quantité d'hormones stéroïdiennes nécessaires à leur maturation enzymatique.

Les travaux avec des microsphères radio-marquées ont montré l'existence d'une régulation indépendante des flux sanguins corticaux et médullaires, permettant à ces deux régions de recevoir des flux supérieurs aux seuls besoins nutritifs. La libération des catécholamines s'accompagne d'une augmentation par sept de l'apport sanguin médullaire que le stimulus soit une hémorragie, une hypoxie ou une stimulation du nerf splanchnique.

#### **4. Innervation**

##### **4.1 de la corticosurrénale**

Longtemps méconnue, ce sont les travaux immunohistochimiques réalisés dans les années 1980, qui ont permis de conclure à l'existence d'une innervation catécholaminergique (Oomori 1989, Oomori 1991), peptidergique (Varndell 1984, Kondo 1985) et cholinergique (Charlton 1991). L'origine de ces fibres et leur véritable rôle dans la régulation de la sécrétion cortico-surrénalienne restent controversés. Elles pourraient avoir une activité potentielle sur la fonction endocrine de la surrénale.

#### 4.2 de la médullosurrénale

La médullosurrénale est richement innervée par des filets nerveux provenant du nerf splanchnique ipsilatéral D4-D9 et atteignant aussi bien les cellules chromaffines que les neurones sympathiques (Coupland 1989). Ils représentent le système d'innervation extrinsèque (Parker 1993). Cette innervation réalise des synapses principalement axo-dendritiques avec les neurones et neuro-glandulaires avec les cellules chromaffines. Dans le cas de ces dernières, les cellules noradrénergiques de la médullosurrénale de rat recevraient plus de synapses que les cellules adrénérgiques (Tomlinson 1990). La nature cholinergique de cette innervation préganglionnaire est bien établie. Les fibres cholinergiques sont considérées comme les principales fibres nerveuses retrouvées dans la médullaire. On trouve, selon les espèces a leur extrémité soit des récepteurs muscariniques (M4), soit des récepteurs nicotiniqes ayant comme ligand l'acétylcholine (Evinger 1994).

Cependant, la présence de messagers autres que l'acétylcholine a été aussi bien démontrée. La médullosurrénale reçoit un contingent de fibres comme des fibres enképhalinergiques (Kondo 1984, Lundberg 1986), et des fibres NPYergiques (Kondo 1985). De rares fibres galaninergiques ont même été observées dans la surrénale de rat (Zentel 1990). Le rôle fonctionnel de chacune de ces innervations est loin d'être entièrement élucidé.

Le système intrinsèque est représenté par des cellules ganglionnaires localisées sous la capsule ou réparties entre les cellules corticales et médullaires. Certaines cellules se projettent dans le cortex au niveau des péricytes des capillaires et d'autres dans la médulla au niveau des cellules chromaffines (Oomori 1991). Leur nombre est espèce-dépendant.

Au total, bien que leur origine embryologique et leur architecture tissulaire soient différentes, alors même qu'elles produisent des hormones de nature chimique et d'activité biologique différentes, cortico et médullo-surrénales n'en constituent pas moins une unité fonctionnelle hautement spécialisée. Elles participent à l'homéostasie de l'organisme. La glande surrénale représente le type le plus achevé d'interpénétration d'un tissu endocrinien et d'une formation nerveuse. Les fonctions surréaliennes se placent donc parmi les principales de l'organisme, en étant interdépendantes les unes des autres. Nous allons voir maintenant quelles sont ces fonctions.

## **II. Les fonctions de la Glande Surrénale**

### **1. Fonction corticosurrénalienne**

Le cortex surrénalien est chargé de la synthèse d'hormones entrant en jeu dans les mécanismes de régulation et de contrôle des grandes fonctions comme la croissance, l'adaptation au stress, le maintien du milieu intérieur...

#### **1.1 Généralités**

Plusieurs types d'hormones sont produits, provenant tous du métabolisme du cholestérol. Cette substance initiale subit un certain nombre de transformations enzymatiques qui aboutissent à la sécrétion de molécules finales actives et responsables de l'effet biologique. Parmi l'ensemble des produits, on trouve :

- Une hormone minéralocorticoïde, l'aldostérone, qui est chargée d'intervenir dans le métabolisme de l'eau et du sel (Edmons 1978, Biglieri 1978).

- Des hormones glucocorticoïdes, comme le cortisol ou la corticostérone, qui participent au métabolisme organique et à la réponse organique aux agressions et au stress (Edwards 1976).

- Des hormones de nature sexuelle, androgènes et oestrogènes, reflets de la parenté embryologique avec les gonades, et qui sont impliquées minoritairement dans les caractères sexuels secondaires. Mais elles peuvent être à l'origine de manifestations pathologiques en cas de dysfonctionnement surrénalien.

- Un ensemble assez vaste de produits intermédiaires, résultants des différentes étapes de biosynthèse et du métabolisme de ces hormones corticoïdes.

Nous avons souhaité développé exclusivement le paragraphe concernant les glucocorticoïdes compte tenu de leur place prépondérante dans l'étude expérimentale de ce travail. Il nous paraît intéressant de reprendre les notions de structure, biosynthèse, transport et catabolisme de ces hormones ; puis d'exposer les points principaux de physiologie relatifs à leurs effets et au contrôle de leur sécrétion.

## **1.2 Les Glucocorticoïdes**

Chez l'homme, le chef de file des glucocorticoïdes est le cortisol. Il est produit par le cortex surrénalien dans une proportion 6 à 8 fois supérieure à celle de la corticostérone. À l'inverse, la corticostérone est le glucocorticoïde le plus abondant chez les rongeurs, comme le rat, la souris ou le lapin (Cohen 1973).

### 1.2.1 Structure

Les glucocorticoïdes dérivent de la structure cyclo-penténophénanthrénique, caractéristique commune à tous les stéroïdes. C'est une structure constituée de trois cycles de cyclohexane et d'un cycle de cyclopentane dans un même plan. Les groupements fonctionnels se projettent sur l'un ou l'autre côté du plan de la structure principale (voir ci-contre figure 7). Le cortisol,

stéroïde en C21, possède sur le carbone 17 de sa structure, un hydroxyle qui le différencie de la corticostérone où il fait défaut.

### 1.2.2 Biogenèse (voir ci-contre figure 8)

Tous les stéroïdes dérivent d'un tronc commun partant du cholestérol. Cette substance est apportée principalement par les lipoprotéines circulantes. Elle peut cependant être élaborée *in situ* à partir de fragments acétate en C-2. Sous l'effet de plusieurs systèmes enzymatiques, la chaîne latérale du cholestérol est coupée aboutissant alors à la formation de  $\Delta 5$ -prégnénolone. Elle subira ensuite, en grande partie, une 17-hydroxylation individualisant deux chaînes de biogenèse :

- Une chaîne 17-hydroxy, majoritaire chez l'homme. Cette chaîne est inaugurée par une 17-OH- $\Delta 5$ -prégnénolone. Puis, une déshydrogénation du C-3 hydroxyle en C-3 cétone, qui sera suivie d'une transposition en  $\Delta 4$  de l'insaturation  $\Delta 5$  convertissant la molécule en 17-hydroxy-progestérone. Enfin, une 21 hydroxylation du 17-hydroxy-progestérone suivie d'une 11  $\beta$  hydroxylation la transforment respectivement en désoxycortisol et en cortisol, produit final de la synthèse.

- Une chaîne 17-desoxy, qui sera l'objet de conversions 3-OH en 3-céto et  $\Delta 5$  en  $\Delta 4$  qui conduiront de la  $\Delta 5$ -prégnénolone à la progestérone. Des 21 et 11 hydroxylations vont transformer la progestérone en désoxycorticostérone (qui a des propriétés minéralocorticoïdes), puis en corticostérone, produit final de la chaîne (Samuels 1975, Simpson 1976).

Il est indispensable de noter qu'au cours de cette biosynthèse, les cellules des zones fasciculée et réticulée (qui possèdent les systèmes enzymatiques impliqués dans ces biotransformations) ont la capacité d'accumuler le précurseur hormonal, le cholestérol estérifié. Ainsi, sous l'effet de stimulus physiologique représenté par l'ACTH hypophysaire, le cholestérol emmagasiné entre dans la voie de la biosynthèse hormonale. L'ACTH, en se fixant sur un récepteur membranaire et par l'intermédiaire de l'activation de l'adénylate cyclase, provoque une cascade de réactions qui aboutissent à l'activation des enzymes de biosynthèse des glucocorticoïdes.

### 1.2.3 Transport

Une des caractéristiques principales des glucocorticoïdes est qu'ils ne sont jamais stockés. Dès leur synthèse, ils sont déversés dans la circulation sanguine. On les retrouve fixés à 90 % sur une protéine transporteuse de type  $\alpha$ -glycoprotéine d'origine hépatique, la transcortine ou CBG (Corticosteroid Binding Globulin). La forme libre est donc minoritaire, elle représente cependant la forme biologiquement active. Lorsque la transcortine est rapidement saturée, comme dans les états d'hypercorticisme, la fixation peut se faire de façon non spécifique avec les sérumalbumines.

### 1.2.4 Catabolisme

Le foie dénature les hormones stéroïdes en opérant une série de réductions donnant lieu à des dérivés di, tétra et hexahydrogénés. Ces dérivés, devenus hydrosolubles par sulfo et glucuroconjugaisons sont essentiellement éliminés par voie urinaire. Il est à noter qu'une partie du cortisol, non dégradé est éliminée sous forme libre (bien corrélée d'ailleurs à la part libre sanguine, il a un intérêt dans le diagnostic biologique des hypercorticismes).

### 1.2.5 Contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes

Il est connu, maintenant depuis plusieurs décennies, que la fonction glucocorticoïde est sous la dépendance de l'axe hypothalamohypophysaire (Nussdorfer 1977, Haynes 1975). Lui-même est régulé par des projections hippocampiques qu'il reçoit (Jacobson 1991).

Le contrôle hypothalamique s'exerce de façon sécrétoire en libérant une neurohormone, CRF (Corticotrophin Releasing Factor), qui a pour fonction de stimuler les cellules antéhypophysaires sécrétrices de l'ACTH. Ce système est par ailleurs responsable de l'état circadien du fonctionnement de l'axe (Daly 1974), et surtout de son caractère adaptatif face aux stimulations extérieures (notamment en cas d'agressions de l'organisme).

Dérivé de la Pro-Opio-Mélano-Cortine (POMC), l'ACTH hypophysaire agit sur les cellules des zones fasciculées et réticulées des corticosurrénales. Elle met en jeu un système de récepteur membranaire de type adénylate cyclase-AMPC activant alors les enzymes impliquées dans la transformation du cholestérol en prégnénolone. Elle présente également très certainement un effet trophique direct sur la glande surrénale, puisque l'hypophysectomie est suivie d'une atrophie de la glande.

Le cortisol, ultime étape de cette voie métabolique exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. En cas d'hypercortisolémie, le système est inhibé ; en revanche une baisse le stimule. Une stimulation consécutive à un stress quelconque conduit à une sécrétion d'ACTH et de cortisol (sauf si l'axe a été inhibé par une prise médicamenteuse prolongée et à fortes doses de glucocorticoïdes).

### 1.2.6 Action générale des glucocorticoïdes

L'action des corticoïdes s'exerce de façon ubiquitaire à l'ensemble des cellules de l'organisme. Cependant, certains organes, comme le SNC ou la glande surrénale elle-même, sont considérés comme organe cible de cette action. Mais c'est au niveau des grands systèmes régissant les fonctions vitales de l'organisme que l'effet spécifique des glucocorticoïdes est le plus manifeste.

#### *a. Les effets métaboliques du cortisol.*

Cette hormone agit sur les trois métabolismes essentiels : métabolisme glucidique, protéique et lipidique. Ses effets s'exercent tant au niveau physiologique que pharmacologique. Ainsi, aux concentrations habituelles, le cortisol aura un effet anabolisant pour le foie et catabolisant en périphérie avec libération d'acides aminés.

La plupart des cellules possèdent des récepteurs au cortisol et pourront être le point d'impact des corticoïdes. Aux concentrations tissulaires normales, il semble bien que le cortisol agisse de façon permissive sur les fonctions métaboliques et enzymatiques permettant à d'autres hormones d'exercer leur effet. Par exemple, le cortisol peut entraîner la production de nouvelles protéines sur lesquelles agiront d'autres hormones (Munck, 1984).

En revanche, une trop forte concentration de cortisol ou de corticoïdes est suivie d'une hyperglycémie à jeun, d'une moindre tolérance au glucose, d'une résistance accrue à l'insuline et d'un accroissement du glycogène hépatique. Le cortisol influence également la distribution interne des électrolytes et fluides entre les compartiments intra- et extra-cellulaires, qui se trouve donc perturbée en cas d'excès de sécrétion cortisolique.

### *b. Glucocorticoïdes et système immunitaire*

Il est désormais bien établi, qu'à des taux modérés ou élevés, les glucocorticoïdes ont une action suppressive sur les mécanismes de défense immunitaire. Ils sont reconnus comme agents anti-inflammatoires et largement utilisés en thérapeutique.

Les glucocorticoïdes entraînent une diminution du nombre de leucocytes, en particulier éosinophiles. Ils diminuent les lymphocytes circulants et provoquent une fonte des organes lymphoïdes. Ils sont aussi responsables de l'augmentation des monocytes, l'activation des macrophages ou la stimulation de l'activité naturel killer par blocage de la production endogène de l'interféron (Munck 1984). De sorte que l'hyperfonctionnement corticosurrénalien verra apparaître une susceptibilité accrue aux infections.

### *c. La réponse au stress via les glucocorticoïdes*

La réponse au stress est un des domaines principaux de la physiologie hypophyso-surrénalienne. Le stress ressenti par un organisme est la résultante de l'exposition de cet organisme à des stimuli nocifs ou potentiellement nocifs. Il est constitué par l'agression elle-même et la riposte à cette agression. Ainsi l'organisme d'un individu soumis à un stimulus stressant brutal et de courte durée, réagira immédiatement par la libération de catécholamines (provoquant une réponse de défense ou de fuite). Puis à plus long terme, la réaction consistera en une libération de quantités accrues de cortisol.

Dans la théorie de Hans Selye, l'adaptation de l'organisme impliquant les glucocorticoïdes en réponse à un stress passe par trois stades : en premier lieu, une réaction d'alarme où le cortex s'hypertrophie et sécrète du cortisol, puis un stade de résistance où l'agression est jugulée. Le cortex reconstitue alors ses réserves, l'organisme s'adapte. Enfin, un stade d'épuisement s'installe au niveau surrénalien en réponse à la sollicitation hypophysaire. Selye montrait

d'ailleurs que le dénominateur commun à toute situation de stress était la déplétion surrénalienne en cholestérol et acide ascorbique. Le dosage des glucocorticoïdes sanguins et urinaires a confirmé ultérieurement cette théorie d'hyperactivité des glandes surrénales.

Il est à noter aussi que cette élévation des concentrations en glucocorticoïdes protège non seulement de la source du stress mais aussi des réactions inappropriées de l'organisme face au stress qui peuvent parfois par leur caractère trop fort menacer l'homéostasie de cet organisme (Munck 1984).

### 1.2.7 Au cours du développement fœtal

La préparation du fœtus des mammifères à la vie extra-utérine s'effectue au cours du dernier tiers de la gestation. Dans ce processus physiologique indispensable, les glandes surrénales prennent une part active qui reflète leur rôle primordial dès la période fœtale. Ainsi, les glucocorticoïdes influencent la maturation de plusieurs organes comme le poumon (Liggins 1976), mais ils participent aussi au déclenchement de la parturition.

#### *a. Activité corticosurrénalienne fœtale*

La séparation morphofonctionnelle de la corticosurrénale est présente très tôt dans la gestation chez l'embryon humain. En effet, à partir de 7 semaines, le cortex apparaît constitué de deux zones : une zone interne, dite fœtale qui regroupe les cellules stéroïdogènes ; et une zone externe, définitive qui donnera la glomérulée de la corticosurrénale adulte. Pendant la gestation, la croissance de la glande se fait différenciellement et préférentiellement sur la zone fœtale. De sorte qu'à terme, 80 % du volume de la glande correspond à la zone fœtale (qui régressera par la suite). Au sein de ces zones, les systèmes enzymatiques à l'origine de la

production hormonale sont fonctionnels précocement. On peut mettre en évidence du cortisol dans la surrénale de fœtus humain dès la 11<sup>e</sup> semaine de gestation (Murphy 1972).

Il est à noter que les sécrétions corticales fœtales sont variables dans leur nature, comme dans leur proportion selon l'espèce et l'âge gestationnel considérés. En effet, chez les primates, la sécrétion prédominante est celle de sulfate de déhydroépiandrostérone (DHAS). Alors que chez les ovins, le cortisol et la corticostérone représentent plus de 90 % des corticostéroïdes plasmatiques avec un rapport cortisol / corticostérone qui fluctuera selon l'âge du fœtus (Wintour 1975, Thomas 1976, Magyar 1980).

Il existe donc une synthèse précoce des glucocorticoïdes par les glandes surrénales fœtales. La caractéristique commune à ces synthèses est l'augmentation habituelle de la corticostéroïdémie (traduite essentiellement par une augmentation des concentrations du cortisol plasmatique) avant la parturition et qui restera haute durant les premiers jours, voire les premières semaines de vie extra-utérine.

#### *b. Mécanisme de régulation*

Le fonctionnement de la corticosurrénale fœtale met en jeu de nombreux facteurs. Leur étude a été menée simultanément sur l'animal et chez le fœtus humain (grâce notamment aux techniques de culture de cellules corticales fœtales).

Chez l'adulte, il est anciennement établi que la régulation stéroïdogène corticale fait intervenir certaines hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire comme le CRF et l'ACTH. Le fonctionnement et le développement de la corticosurrénale fœtale, comme pour l'adulte, exigent l'intégrité de l'axe, qui apparaît fonctionnel très précocement (Dupouy 1975, Dupouy 1975).

Ainsi, il a été démontré que l'hypophysectomie du fœtus ovin conduisait à la non-augmentation pondérale des surrénales en fin de gestation ; alors que la perfusion d'ACTH entraînait une croissance prématurée de la zone corticale (Liggins 1973). Les résultats de ce travail montraient une action mitogène nette sur les cellules du cortex. En plus de cette action, l'ACTH semble jouer un rôle dans la modulation de l'activité stéroïdogène de la surrénale. De plus, les cellules hypophysaires sont elles-mêmes sensibles aux stimulations hypothalamiques. L'injection de CRF 1-41 synthétique (Blumenfeld 1986) ainsi que d'Arginine-Vasopressine chez des fœtus catéthérisés *in utero* augmente la libération d'ACTH. Enfin, il a été avancé que d'autres hormones, comme la prostaglandine E2 (Louis 1976), l' $\alpha$ MSH (Llanos 1979), l'hormone de croissance (Devaskar 1981), la prolactine (Challis 1977) ou l'Epidermal Growth Factor (Thorburn 1981) pouvaient être des facteurs stimulants des glandes surrénales. Cependant, les effets observés *in vivo* et *in vitro* diffèrent, reflétant alors plutôt une action indirecte de ces hormones sur la corticosurrénale.

## **2. La fonction médullosurrénalienne**

### **2.1 Ontogenèse des cellules médullosurréaliennes**

Il est intéressant de rappeler ici l'ontogenèse du type cellulaire à l'origine des fonctions sécrétrices de la médullosurrénale. En effet, cette ontogenèse rend compte des caractéristiques très spécifiques de ces cellules, ainsi que de l'apparition de leurs propriétés sécrétoires au cours du développement. Elles constituent la base de la fonction de la partie médullaire des glandes surrénales.

La lignée des cellules sympatho-surréaliennes est issue de la crête neurale, structure transitoire mais essentielle, présente durant le développement embryonnaire. La crête neurale est à l'origine de plusieurs tissus et groupes cellulaires : le squelette, le système nerveux périphérique, le derme, les mélanocytes (Le Douarin 1993).

Les dérivés principaux de cette lignée sympatho-surréaliennne sont constitués des cellules SIF, des neurones sympathiques et des cellules chromaffines. D'après la théorie d'Anderson, publiée en 1991, toutes ces cellules seraient issues d'un précurseur commun représentant les cellules souches. Situées dans la région caudale de l'embryon, elles ont un pouvoir de migration vers différentes destinations. Dans le déterminisme de leur phénotype final, l'environnement et les facteurs de croissance auxquels elles sont soumises apparaissent capitaux.

Ainsi, le schéma de différenciation actuellement admis est celui de cellules précurseurs, qui posséderaient initialement une bipotentialité de cellules chromaffines et de neurones sympathiques. L'évolution en neurones se fait alors sous l'effet de facteurs comme le Nerve Growth Factor, alors que l'obtention de cellules chromaffines résulte de l'effet des glucocorticoïdes (Unsicker 1989, Anderson 1991, Landis 1981). La spécificité de développement des glandes surrénales est donc primordiale pour l'acquisition finale du phénotype de ses cellules médullaires.

D'après Michelson et Anderson (1992), le contrôle des glucocorticoïdes se déroule en deux étapes au cours de la différenciation en cellules chromaffines : lorsque les cellules précurseurs bipotentes (qui expriment alors des gènes spécifiques des neurones et des cellules chromaffines) sont exposées aux glucocorticoïdes, leur différenciation en neurones est inhibée (les gènes spécifiques des neurones sont réprimés). Il s'agit alors de cellules précurseurs chromaffines qui pourront, dans leur majorité, acquérir la capacité de synthétiser la

phénylethanolamine N-méthyltransférase (PNMT) et devenir des cellules adrénérgiques sous l'influence de nouveau, des glucocorticoïdes (Bohn 1983). Certaines, qui n'acquièrent pas cette compétence, demeurent des cellules chromaffines noradrénérgiques. L'induction de cette différenciation nécessite l'acquisition de récepteurs fonctionnels aux glucocorticoïdes par ces cellules. On a pu ainsi observer au stade embryonnaire E17 chez le rat et E24 chez le lapin ces récepteurs aux corticoïdes (Seidl 1989).

Cependant, l'intervention des glucocorticoïdes dans la différenciation des cellules de la lignée sympatho-surrénalienne, et notamment dans la survenue de la compétence PNMT, est très probablement plus complexe. Le facteur contiguïté au sein des glandes surrénales entre sécrétion de glucocorticoïdes et cellules chromaffines est certainement essentiel mais non exclusif. En effet, Michelson et Anderson, en 1992, ont démontré *in vitro* que même en l'absence de glucocorticoïdes, une cellule possède la capacité d'exprimer PNMT. Les glucocorticoïdes augmentent donc la probabilité d'acquérir chez les cellules précurseurs cette compétence (et ce plus volontiers à la fin de gestation), dont l'apparition initiale est probablement sous le contrôle d'un programme cellulaire propre aux cellules de nature catécholaminérgique (voir ci-contre figure 9).

## **2.2 Les hormones de la médullosurrénale**

Les fonctions des hormones issues de la médullosurrénale sont multiples, et varient selon le tissu ou l'organe cible considéré, mais surtout selon le type de récepteurs concernés. Deux caractéristiques fondamentales sont à noter :

- Sur le plan physiologique, il s'agit de molécules à double action, hormonale ou neuromédatrice selon les sites d'action et de stockage. Les anomalies de leur sécrétion ne se traduisent endocrinologiquement qu'au cours d'affections comme le phéochromocytome.
- Sur le plan biochimique et pharmacologique, les catécholamines constituent les molécules à action hormonale les plus simples de l'organisme. La corrélation structure-fonction en est bien connue. Par ailleurs, de nombreux dérivés agonistes et antagonistes ont été synthétisés et sont aujourd'hui disponibles. De sorte que leur utilisation en thérapeutique est assez large dans des domaines bien au-delà de l'endocrinologie classique, comme l'hémodynamique, la cardiologie et les techniques de réanimation.

### **2.3 Les Catécholamines**

Les CA sont des amines endogènes qui dérivent du catéchol, lui-même formé par un noyau benzénique portant 2 groupements hydroxylés en position méta. Les 3 CA majoritaires sont la noradrénaline (NA), l'adrénaline (A) et la dopamine. L'adrénaline est synthétisée presque uniquement par la médullosurrénale, alors que noradrénaline et dopamine sont retrouvées aussi au niveau cérébral et au niveau des terminaisons nerveuses où elles ont un rôle primordial dans la médiation trans-synaptique.

### 2.3.1 Métabolisme

#### *a. Biosynthèse*

La voie de biosynthèse des CA est connue depuis les années 1970 (Blaschko 1973, Axelrod 1972) (voir ci-contre figure 10). La tyrosine est le précurseur de cette voie, les différentes enzymes impliquées sont caractérisées et isolées. Cet acide aminé provient principalement de l'alimentation, mais aussi peut dériver de l'hydroxylation de la phénylalanine. Captée par les cellules chromaffines et les cellules nerveuses par un système de transport actif, elle est transformée en L-dopa (3,4 dihydroxyphénylalanine) sous l'action de la tyrosine hydroxylase (TH). C'est une réaction limitante de la synthèse des CA. Noradrénaline et dopamine exercent un mécanisme de rétrocontrôle en inhibant la TH, assurant ainsi une voie de modulation de leur propre synthèse.

Ensuite, la L-dopa est décarboxylé en L-dopamine qui subit une  $\beta$ -hydroxylation qui la transforme en noradrénaline. L'étape suivante qui se fait sous l'action de PNMT est spécifique de la médullosurrénale et donne naissance à l'adrénaline. Cette dernière étape est potentiellement régulée par les glucocorticoïdes.

#### *b. Stockage et libération*

Au sein des cellules de la médullosurrénales, les CA sont stockées dans des granules contenant également des protéines solubles, les chromogranines, une ATPase  $Mg^{2+}$  dépendante et la dopamine  $\beta$ -hydroxylase. Le stimulus cholinergique entraîne l'augmentation de la perméabilité aux ions  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  de la membrane cellulaire, induisant alors une dépolarisation membranaire qui déclenche la sécrétion par exocytose.

### *c. Inactivation*

#### - Catabolisme des catécholamines

Deux enzymes principales sont impliquées : la MAO et la COMT

La MAO (Mono-Amine Oxydase) a une répartition ubiquitaire dans l'organisme. Elle est cependant concentrée dans le foie. Elle se situe essentiellement dans la membrane extérieure des mitochondries. Elle catalyse la désamination oxydative de la chaîne aliphatique. Au niveau nerveux, elle contrôle ainsi le stockage de la noradrénaline.

La COMT (Catéchol-O-Méthyl-Transférase) est une enzyme cytoplasmique se trouvant dans tous les tissus innervés par le système sympathique. Elle catalyse la méthylation de l'hydroxyle en position 3. Elle inactive les CA extra neuronales.

Il est à noter que chacune de ces enzymes active le produit de l'autre. Ainsi de leur action isolée ou séquentielle résultent de nombreux métabolites qui sont excrétés soit sous forme libre, soit sous forme sulfoconjuguée, laquelle représente un pool latent de CA qui peut être utilisé en cas de besoin par transformation en CA libres.

#### - Captation cellulaire

Autre voie d'inactivation ou de recyclage, les CA circulantes ou libérées au niveau des synapses du système nerveux peuvent être reprises par les cellules soit pour y être stockées, soit pour y être dégradées. On peut citer comme mécanisme entrant dans ce type d'inactivation, la captation de type I, décrite en 1973 par Iversen et qui concerne les neurones adrénergiques du SNC et périphérique. Il s'agit d'un système de transport actif saturable, très sélectif sur le plan stéréochimique et qui demande de l'énergie. Ce processus de captation a une haute affinité pour la noradrénaline et a pour rôle physiologique d'interrompre la stimulation noradrénaline.

### 2.3.2 Régulation de la synthèse des CA

On décrit trois types de régulation : hormonale, nerveuse et locale. C'est cependant la régulation nerveuse qui représente le mode par excellence impliqué dans les variations de sécrétion catécholaminergique au cours de la réponse surrénalienne.

#### *a. Régulation hormonale*

Depuis Wurtman (1972), l'action de la corticosurrénale est bien connue dans la modulation de la concentration enzymatique. L'enzyme cible des glucocorticoïdes dans la voie de biosynthèse catécholaminergique est la PNMT. Sa synthèse est stimulée par la présence des glucocorticoïdes. D'ailleurs, la suppression de leur sécrétion endogène après hypophysectomie entraîne une chute de la concentration de PNMT (Wurtman 1966). Le passage direct du cortisol par le système veineux porte surrénalien assure une concentration locale suffisante. Deux autres enzymes peuvent être stimulées par l'administration de glucocorticoïdes : la TH et la dopamine  $\beta$ -hydroxylase.

#### *b. Régulation nerveuse*

L'activité de la médullosurrénale est principalement sous le contrôle du système orthosympathique. La dénervation de la glande réduit cette activité. Cependant, le système nerveux n'est pas indispensable à cette activité puisque que la biosynthèse, par exemple de l'adrénaline, peut s'effectuer dans des tissus privés de toutes connections nerveuses. De même que la médullosurrénale est capable, bien avant que cette régulation nerveuse ne soit fonctionnelle, de synthétiser, et moduler la synthèse des CA (Padbury 1981, Coulter 1988, Slotkin 1988).

En revanche, la régulation nerveuse est essentielle comme agent modulateur. La stimulation prolongée des nerfs splanchniques entraîne une augmentation de la sécrétion des CA par augmentation de la synthèse des trois enzymes de la voie métabolique des CA. Cet effet est observé, par exemple, lors des chocs émotionnels, ou tout autre type d'agression retentissant sur le système nerveux végétatif. Il y a alors augmentation réflexe de l'activité nerveuse cholinergique.

### c. *Régulation locale.*

Elle s'effectue par le biais d'intermédiaires ou de produit de synthèse des CA sur certaines enzymes. Son importance *in vivo* est délicate à apprécier. Elle implique plusieurs niveaux de la voie métabolique des CA.

Par exemple, l'inhibition de la TH par la NA n'intervient que lors d'une stimulation aiguë de la médullosurrénale, qui est suivie d'une sécrétion accrue des CA (et donc d'une diminution de leur concentration intracellulaire). D'où la levée de l'inhibition exercée sur TH par NA est suivie de l'augmentation de la synthèse hormonale.

L'adrénaline peut aussi assurer ce type de régulation sur PNMT.

Enfin, la dopamine semble pouvoir générer des boucles de rétrocontrôle positif ou négatif selon le type du récepteur concerné par le stimulus. Ce mécanisme pourrait représenter le mode principal de régulation lors de la période initiale d'activité de la médullosurrénale, avant même la mise en place de la régulation nerveuse. Elle agit plus sur la libération des CA, la stimulation du récepteur dopaminergique D1 la favorisant, celle du D2 l'inhibant.

### 2.3.3 Effet et mode d'action des catécholamines

Les effets physiologiques des CA dans l'organisme sont très nombreux et variés, de nature souvent opposée, et très liés à la dose et au tissu considéré. La découverte d'Alquist en 1948 de deux récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$  a permis de faire une avancée considérable dans la compréhension de la physiologie des CA. Secondairement, dans les années 1970, un troisième type de récepteurs adrénergiques a été mis en évidence. Il était lié à la dopamine et a donc été nommé dopaminergique. Nous avons précédemment développé dans cet exposé, les connaissances concernant ces récepteurs spécifiques.

En ce qui concerne les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ , il existe deux sous-types de chaque :  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Leurs effets tissulaires peuvent être une vasoconstriction ou une contraction utérine lors de la stimulation du récepteur  $\alpha$  par un agoniste sélectif (phényléphrine), ou une stimulation cardiaque ou une bronchodilatation lors de la stimulation du récepteur  $\beta$  par un agoniste (isoprotérénol). Le mécanisme d'action diffère selon le récepteur : la grande majorité des effets  $\beta$  adrénergiques est associée à une augmentation d'AMPc intracellulaire *via* l'activation de l'adénylate cyclase. Les effets  $\alpha$  adrénergiques peuvent être associés à l'augmentation du taux d'un autre nucléotide, le GMP, qui activerait une protéine kinase spécifique.

### **2.4 Chez le nouveau-né**

Les catécholamines sont au centre de la naissance, c'est-à-dire, de ce passage obligatoire de la vie intra-utérine à la vie extra-utérine. Un certain nombre de caractéristiques très spécifiques de cette période existe et met en exergue la place du système catécholaminergique, de la médullosurrénale, et plus globalement de la glande surrénale à cet âge du développement et de la vie.

#### 2.4.1 Décharge des catécholamines à la naissance

Au décours de la naissance, l'activation intense du système sympatho-adrénergique induit une augmentation massive du taux de CA chez le nouveau-né (Lagercrantz 1986). Les concentrations artérielles ombilicales en CA (supérieures aux concentrations veineuses prouvant leur origine fœtale) sont largement plus hautes que celles d'un individu soumis à un effort physique intense, ou porteur d'un phéochromocytome (Lagercrantz 1984).

Mais, il est intéressant à noter que le mode de naissance est lié au taux des CA (Eliot 1980). Les taux sont nettement inférieurs chez les enfants nés par césarienne avant toute mise en route du travail par rapport aux enfants nés par voie basse ou par césarienne en cours de travail (Irestedt 1982). La présentation de l'enfant influe également ; la présentation du siège qui génère plus de stress fœtal est corrélée à un taux catécholaminergique supérieur à une présentation céphalique.

Lorsque l'enfant présente une asphyxie périnatale, le taux de CA s'élève significativement. Acidose et taux de CA sont corrélés. La libération massive de CA est déclenchée par l'hypoxie.

#### 2.4.2 CA et adaptation périnatale

La synthèse accrue de CA contribue à l'adaptation cardiocirculatoire et pulmonaire néonatale. Les CA dérivent le sang vers les organes vitaux et augmentent les performances cardiaques pendant l'asphyxie. Elles stimulent l'absorption du liquide intra-alvéolaire pulmonaire et la libération du surfactant, améliorant ainsi l'aération du poumon (Walters 1978). Compliance dynamique pulmonaire et taux de CA circulantes sont corrélés positivement 2 heures après la naissance chez les nouveau-nés nés par voie basse, contrairement à ceux nés par césarienne (Faxelius 1983).

Expérimentalement, l'administration d'adrénaline ou d'isoprénaline inhibe chez le fœtus la sécrétion du liquide intra-alvéolaire. Cet effet inhibiteur est bloqué par le propranolol. Le mécanisme d'interruption de la sécrétion du liquide pulmonaire à la naissance fait appel à l'action de l'adrénaline, et qui plus est par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta$  adrénergiques.

De plus, les CA participent également à l'adaptation métabolique du nouveau-né (Hägnevik 1984). Les taux élevés de CA jouent un rôle dans la mobilisation du glucose en contribuant à la glycogénolyse hépatique par stimulation de la sécrétion du glucagon et par inhibition de la sécrétion insulinique. De même, ils favorisent l'activation de la lipolyse qui participe au maintien du métabolisme néonatal.

#### 2.4.3 Spécificité périnatale de la régulation en CA

Le contrôle de la libération des catécholamines est classiquement sous la dépendance du SNC *via* un mécanisme neurogénique qui emprunte la voie sympathique. Au niveau de la synapse terminale, l'acétylcholine libérée agit directement sur le récepteur nicotinique et déclenche la décharge catécholaminergique. Pendant la période périnatale, ce mécanisme prévaut à condition que la maturation de cette voie nerveuse soit efficiente. Elle l'est avant même la naissance chez certaines espèces animales, comme le mouton (Slotkin 1988). Mais selon l'espèce considérée, cette maturation a lieu à des âges différents de développement. Ainsi, chez le rat, ce n'est que plusieurs jours après la naissance que le mécanisme neurogénique de contrôle de la libération catécholaminergique apparaît (Seidler 1985). C'est le cas aussi de l'espèce humaine ou du lapin. Les mécanismes qui régulent alors la libération

catécholaminergique périnatale sont de nature non neurogénique. Ils font donc appel à des systèmes locaux de contrôle dans lesquels les systèmes de récepteurs participent activement. Les glandes surrénales possèdent une certaine autonomie de fonctionnement avec des propriétés de sensibilité directe aux stimuli tout à fait uniques à cette période du développement. De sorte que, par exemple concernant le système dopaminergique surrénalien, la dopamine libérée pourra activer ses propres récepteurs avec, *via* le récepteur dopaminergique D1 la constitution d'une boucle de rétrocontrôle positif sur la libération catécholaminergique (Artéléjo 1990), et *via* le récepteur dopaminergique D2, la constitution d'une boucle de rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la libération des catécholamines (Missale 1998). Tous les mécanismes impliqués ne sont pas encore parfaitement connus et compris. L'intrication de multiples voies est certaine. Elles permettent en tout cas à la glande surrénale de posséder très précocement dans le développement une machinerie qui lui confère une propriété de réaction rapide, ajustée, indispensable au maintien de l'homéostasie fœtale, périnatale et néonatale.

## **Chapitre III**

### **Réponse Surrénalienne A deux types de stimuli Au cours du développement**

La relative autonomie de la glande surrénale, ainsi que son rôle premier dans la réponse de l'organisme au stress, la place dans une logique de sensibilité particulièrement développée par rapport aux messages extérieurs. Cette sensibilité sous la dépendance principalement de la régulation nerveuse lorsque le développement est achevé est une propriété directe de la glande pendant la période durant laquelle le mécanisme non neurogénique de modulation de la réponse surrénalienne est actif.

#### **I. Exposition Anténatale à un stimulus pharmacologique**

##### **1. Généralités**

Si la pharmacologie prénatale occupe encore une place modeste dans la médecine fœtale, elle voit cependant ses domaines d'action s'élargir. Et, l'application de thérapeutique en vue d'atteindre le fœtus *via* sa mère se développe. Dans ce domaine, le traitement anténatal par les glucocorticoïdes afin d'accélérer la maturation pulmonaire fœtale (Liggins 1976) représente l'exemple type de référence.

La compréhension de l'action pharmacologique par l'étude des médicaments et de leur métabolisme pendant la gestation et au décours de la naissance est une étape essentielle pour évaluer le caractère bénéfique ou délétère de l'exposition d'un organisme immature à un stimulus pharmacologique. En effet, pendant la période fœtale, le nombre et la sensibilité des récepteurs sur lesquels peuvent agir les médicaments administrés évoluent. Les systèmes enzymatiques du métabolisme des médicaments apparaissent et se mettent en place au niveau hépatique. Les fonctions hormonales et leurs voies d'induction s'organisent. Les fonctions physiologiques qui participent activement aux phénomènes d'adaptation à la vie extra-utérine se développent. Les glandes surrénales se préparent à jouer leur rôle de "chef d'orchestre" du passage de l'état de fœtus à celui de nouveau-né.

De sorte que la réponse d'un organe immature varie selon le stade de développement atteint lors de l'exposition à l'effet pharmacologique. Cette modification de l'effet peut dépendre de chacune des étapes impliquées dans le mécanisme d'action des médicaments. Parmi celles-ci, l'interaction médicament-récepteur est primordiale ; et, sa maturation, dépendant du développement, conditionne un effet final potentiellement différent selon l'organe considéré. D'où la possibilité qu'un effet recherché sur un organe donne lieu à un impact non souhaité sur un autre organe. Il est alors nécessaire de choisir entre le bénéfice et le risque d'une thérapeutique anténatale. Il est également indispensable d'apprécier les effets à court, moyen et long terme des médicaments reçus pendant cette période critique du développement. Car, pour ce qui concerne les glandes surrénales fœtales, ils conditionnent en partie la fonction de ces organes pendant la période périnatale, mais aussi, bien au-delà.

## **2. Particularités pharmacologiques au cours de la gestation**

Pendant la gestation, l'unité foetomaternoplacentaire constitue une entité tout à fait singulière et unique sur le plan pharmacologique. Elle explique que tout traitement destiné à l'un se répercute automatiquement à l'autre. Elle justifie aussi que l'un (en l'occurrence la mère) soit utilisé pour que l'action pharmacologique atteigne l'autre (le fœtus). Entre eux, l'intermédiaire représenté par le placenta est l'agent premier de régulation de cette action.

### **2.1 Biotransformation placentaire des médicaments**

#### 2.1.1 Métabolisme général des médicaments

Tous les xénobiotiques, dont font partie les médicaments, peuvent être transformés dans les organismes vivants supérieurs selon deux étapes successives :

- les réactions de dégradation (phase I) : oxydation, réduction, hydrolyse qui sont capables de fonctionnaliser le médicament, c'est-à-dire de lui adjoindre un groupement réactif.
- Les réactions de synthèse (phase II) : glucuroconjugaison, sulfoconjugaison, acétylation, conjugaison avec les acides aminés ... .

La catalyse de ces réactions se fait à l'aide des systèmes d'oxydation à cytochromes P450, de mono-oxygénases à flavine, de monoamine-oxydases et des alcool- et aldéhyde-deshydrogénases pour les réactions de phase I, et des transférases (sulfo et glutathion-S-transférase) pour les réactions de phase II. Les réactions de phase I sont réalisées grâce à un

système d'oxydation mixte nécessitant la présence d'oxygène moléculaire et d'un système de transports d'électrons dont l'oxydase terminale comporte le cytochrome P450 qui forme un complexe avec le médicament, complexe qui réagit avec l'oxygène moléculaire. Il existe plusieurs isoformes spécifiques de certains substrats. Et, certaines isoformes sont inductibles. Les enzymes du métabolisme des médicaments régulent donc la vitesse d'élimination de ces médicaments. Elles peuvent aussi libérer la molécule active en cas de prodrogues. Enfin, il peut survenir des phénomènes d'interactions médicamenteuses.

### 2.1.2 Métabolisme placentaire des médicaments

Le placenta correspond à la zone d'échanges physiologiques entre la mère et le fœtus. Il est admis que la plupart des médicaments passent à travers le placenta de façon plus ou moins importante (Pacifici 1995). Ainsi, on préférera des molécules à faible passage lorsque l'on veut traiter une affection maternelle. A contrario, on privilégiera les médicaments à fort passage pour les traitements délivrés à visée fœtale.

Dans l'espèce humaine, le placenta possède un équipement enzymatique qui lui permet d'être le site de transformation de médicaments par oxydation, hydrolyse ou conjugaison. Il contient effectivement le cytochrome P450 et les éléments de la chaîne d'oxydation qui forme un système hautement spécialisé dans l'oxydation des stéroïdes hormonaux. De plus, l'hydroxylation des carbures polycycliques (type benzopyrène) dépend de l'aryl-hydrocarbure hydroxylase dont l'activité augmente pendant la grossesse et qui est fortement induite chez les femmes tabagiques (Juchau 1976). Le placenta dispose aussi d'enzymes du métabolisme pour les substances comme les catécholamines, l'histamine, l'acétylcholine ou les hormones polypeptidiques.

Le métabolisme placentaire peut donc être responsable d'une diminution du transfert en réduisant le gradient de concentration entre les compartiments maternel et fœtal, de la conversion d'une molécule anodine en métabolite toxique ou carcinogène ou tératogène, d'une inactivation d'une molécule toxique ou d'un substrat endogène. C'est, par exemple le cas des glucocorticoïdes endogènes qui sont dans leur grande majorité dégradés par une aromatasase placentaire. Pour obtenir un effet médicamenteux significatif des glucocorticoïdes chez le fœtus, il est nécessaire d'utiliser les dérivés fluorés des corticoïdes, qui possèdent un atome de fluor en position 9. Ce qui limite significativement chez eux, l'action enzymatique placentaire. Les molécules peuvent alors traverser le placenta et se retrouver en concentration suffisante pour avoir l'effet pharmacologique attendu chez le fœtus (Lacaze-Masmonteil 1996). C'est ainsi que Liggins avait démontré, dès les années 1970, l'effet bénéfique des corticoïdes sur le poumon fœtal (Liggins 1972).

## **2.2 Passage transplacentaire des médicaments**

Les mécanismes qui régissent les transferts transplacentaires sont extrêmement complexes. Ils dépendent de plusieurs paramètres : les caractéristiques physico-chimiques des molécules, les conditions environnementales, et les paramètres pharmacocinétiques maternels qui se trouvent modifiés par l'état de grossesse (Rey 1995).

### 2.2.1 Les caractéristiques physico-chimiques

Parmi les nombreux facteurs impliqués dans le transfert transplacentaire des molécules médicamenteuses, six apparaissent déterminants :

- *L'ionisation.* Une molécule non ionisée traverse plus rapidement le placenta. Le taux d'ionisation des médicaments est faible. Il est cependant variable selon le pH du milieu.
- *La lipophilie.* Les substances avec un coefficient de partage plus élevé, donc plus liposolubles, pénètrent plus aisément les cellules et auront alors une diffusion à travers la membrane placentaire facilitée.
- *Le poids moléculaire.* Les substances hydrosolubles passent la membrane placentaire en fonction de leur poids moléculaire. En dessous de 600 kilodaltons, la diffusion passive selon le gradient de concentration est la règle. Au-delà de 600 kDa, le produit ne traversera pas la barrière placentaire. C'est le cas de molécule comme l'insuline ou l'héparine.
- *La structure.* La forme isomérique peut intervenir faisant qu'une forme (lévogyre ou dextrogyre) a un meilleur passage que l'autre.
- *L'équilibre acido-basique.* Le pH influe sur l'ionisation. Or le pH sanguin fœtal est inférieur à celui de sa mère (d'environ 0.15). Certaines molécules (les bases faibles) se retrouvent alors en plus forte concentration dans le sang fœtal par rapport au sang maternel, en particulier en cas d'acidose fœtale.
- *La liaison aux protéines plasmatiques.* Seule la fraction libre, c'est-à-dire non liée, des médicaments a la capacité de diffuser à travers la membrane placentaire. La quantité totale de protéines plasmatiques varie peu en cours de grossesse bien que le taux d'albumine plasmatique maternel ait tendance à diminuer de l'ordre de 5 à 10 g/l en raison de l'augmentation du volume plasmatique.

### 2.2.2 Les facteurs maternels

Les grandes étapes de la pharmacocinétique médicamenteuse sont modifiées par l'état de grossesse. De ce fait, les concentrations plasmatiques médicamenteuses peuvent varier tant dans le sang maternel que foetal et être à l'origine d'effets inattendus. Ainsi, les phénomènes de résorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination sont concernés :

- La résorption médicamenteuse au niveau intestinal comme pulmonaire se modifie au cours de la grossesse. En effet, le pH gastrique s'élève favorisant alors l'ionisation des acides faibles et des bases faibles. La vitesse d'absorption est ainsi ralentie. À l'inverse, l'hyperventilation physiologique de la femme enceinte facilite l'absorption pulmonaire des anesthésiques volatiles, par exemple ou d'agent toxique comme l'oxyde de carbone.
- La distribution des médicaments est différente pendant la grossesse car le volume sanguin circulant augmente de 40 à 50 %. Le débit sanguin cardiaque, mais aussi rénal et utérin est significativement majoré. Enfin, la part de la fraction liée des médicaments est réduite.
- Le métabolisme maternel pendant la grossesse est accéléré : température corporelle, taux hormonaux sont plus élevés. L'activité métabolique est, en particulier accentuée.
- L'élimination, en particulier rénale, est augmentée car le débit sanguin lui-même est plus fort. Ceci explique que pour certaines thérapeutiques, comme le lithium, il est nécessaire de renforcer la posologie si l'on veut maintenir une thérapeutique efficace.

En somme, les processus développés au cours de la grossesse concourent à réduire l'activité des médicaments donnés à la femme enceinte. En effet, la concentration plasmatique des médicaments aura tendance à être inférieure à celle attendue en raison d'une résorption aléatoire, d'une distribution majorée, d'une fixation protéique réduite et d'une élimination accélérée. Surtout, la conjonction de ces phénomènes, dont les effets sont volontiers antagonistes, rend délicat la conduite thérapeutique pendant la grossesse. Elle explique qu'une exposition anténatale aux médicaments est d'interprétation difficile quant au retentissement sur le compartiment fœtal.

### **3. Effet pharmacologique et développement**

#### **3.1 Données générales**

La théorie sur le fait que l'action médicamenteuse est susceptible d'interférer avec les mécanismes développementaux trouve ses fondements à partir d'exemples cliniques. Le plus connu est celui du diéthylstilboestrol qui, administré chez une mère pendant la grossesse, peut provoquer des adénocarcinomes du vagin chez les filles exposées *in utero* à la molécule (Pons 1988). Donc, les effets pharmacologiques d'une exposition anténatale à un médicament donnent lieu à manifestation à court comme à plus long terme chez le fœtus, en particulier lorsque ce médicament est reçu à une période critique du développement.

Il est rapporté chez l'animal des exemples similaires (Takahashi 1998, Gupta 1981, Bignami 1992). À chaque fois, l'accent est mis sur la notion que certains médicaments donnés en anténatal à une femelle gestante sont capables d'avoir des effets immédiats sur les processus de développement fœtal et d'adaptation néonatale, mais aussi d'avoir des effets à long terme, bien au-delà de la naissance. Il est noté également que ces effets peuvent concerner non seulement l'organe cible de l'action médicamenteuse, mais aussi se manifester sur d'autres

organes, et ce de façon inattendue. Enfin, ces effets peuvent être des effets bénéfiques attendus, mais ce peut être aussi des effets délétères ou perturbateurs de la bonne mise en place des mécanismes physiologiques au cours du développement. Ainsi, pour les thérapeutiques anti-épileptiques, le risque immédiat tératogène avec anomalie de l'organe cible est connu (Tuchmann-Duplessis 1973). Mais, il a aussi été montré (Gupta 1981) que l'administration de phénobarbital pendant la gestation de rats entraînait des anomalies du déroulement des cycles de la descendance avec des troubles importants de la reproduction. Dans ce contexte, les glucocorticoïdes et leurs effets ont été déjà bien évalués. Ils représentent les molécules pharmacologiques pour lesquelles sont disponibles, dans la littérature, le plus de données concernant les effets découlant d'une exposition anténatale.

### **3.2 Effets anténataux des glucocorticoïdes**

#### **3.2.1 Sur l'organisme fœtal**

L'administration de corticoïdes exogènes (bétaméthasone ou dexaméthasone) a été proposée comme traitement préventif de la maladie des membranes hyalines du nouveau-né prématuré en raison de son effet d'accélération de la maturation des voies de synthèse du surfactant pulmonaire. Cependant, d'autres effets variés ont été décrits. Ils peuvent se manifester sur le développement fœtal général (Johnson 1981) mais aussi de façon plus spécifique sur la fonction d'un organe précis, comme l'ammoniogenèse rénale du nouveau-né (Goodyer 1981). De même, la cortisone reçue en fin de gestation chez la rate entraîne des modifications prolongées du système immunitaire des rats. Chez le singe, un traitement anténatal par bétaméthasone diminue le nombre d'alvéoles pulmonaires par unité de volume et la surface d'échanges gazeux. Il altère aussi la distribution des composantes du tissu conjonctif (Beck 1981). Ces modifications morphologiques macroscopiques vont dans le même sens que les

données biologiques montrant une réduction importante du contenu en ADN de ce poumon exposé (Sahebji 1989). La croissance cérébrale peut également être atteinte avec une réduction irréversible de la population neuronale (Johnson 1981).

Cependant, dans l'ensemble de ces études expérimentales, les doses cumulées administrées sont bien supérieures à celles reçues par voie transplacentaire dans les protocoles cliniques. Et, jusqu'à présent le suivi des cohortes traitées conclue dans l'ensemble à l'absence de retentissement délétère à long terme sur la croissance staturo-pondérale, le périmètre crânien, les fonctions respiratoires, la fréquence des infections, le développement intellectuel et les performances scolaires (Crowley 1990, Ward 1994). La réserve à énoncer concerne les enfants soumis *in utero* à plusieurs cures (alors que les études portent plus volontiers sur une cure unique) (Modi 2001). En particulier, ce pourrait être le cas pour le retentissement sur l'axe hypophyse-surrénalien et sur la croissance postnatale. D'ailleurs un cas de syndrome cushingoïde a été décrit en clinique humaine (Bradley 1994).

D'autres effets de la corticothérapie anténatale, ceux-là certainement bénéfiques, ont été mis en évidence. La diminution de l'incidence des hémorragies intraventriculaires a été avancée par plusieurs études (Crowley 1990, Kari 1994, Jobe 1993), probablement par effet direct sur la maturation de la paroi vasculaire de la matrice germinale cérébrale (Garland 1995). Globalement, l'adaptation cardiovasculaire à la vie extra-utérine est améliorée. Il a été montré que les grands prématurés avaient ainsi une pression artérielle moyenne meilleure après la naissance (Kari 1994).

### 3.2.2 sur les glandes surrénales

La glande surrénale constitue un organe cible de l'action des corticoïdes. En tout cas, elle est manifestement sensible à une action anténatale. Une dose unique de dexaméthasone reçue pendant la gestation induit l'apparition d'une atrophie surrénalienne chez les foetus du rat (Hristic 1995) qui s'intègre plus globalement à une diminution du poids de naissance des rats. Cette atteinte de la glande surrénale après exposition anténatale aux corticoïdes est la résultante d'une nécrose de la zone corticale (Johnson 1981, Mc Nulty 1981).

Cependant, les effets sur la zone de la médullosurrénale paraissent en général bénéfiques : élargissement de cette zone, meilleure trophicité de ses cellules, augmentation du contenu catécholaminergique de la surrénale, amplification de l'activité TH ou PNMT. Par exemple, il semble bien que la voie de biosynthèse des catécholamines soit renforcée par l'exposition *in utero* aux glucocorticoïdes. Ainsi, le contenu en catécholamines des glandes surrénales est augmenté après une injection de dexaméthasone. Il est connu que l'activité enzymatique de TH et PNMT est stimulée par les corticoïdes (Moftaqir-Handaj 1995). Ce qui concourt à faciliter la production, en particulier d'adrénaline. Paradoxalement, la charge catécholaminergique postnatale apparaît moins élevée chez les enfants prématurés ayant bénéficié d'un traitement anténatal par corticoïdes, contrairement à ceux qui en ont été exempts (Kallio 1998). Ceci pose la question du mécanisme à l'origine de cette différence entre synthèse et libération. Il est probable qu'interviennent les systèmes de récepteurs impliqués dans la sécrétion catécholaminergique. En effet, les récepteurs dopaminergiques participent à la physiologie de la réponse surrénalienne. Et, au même titre que d'autres récepteurs de type adrénérgiques dans d'autres tissus (Roberts 1985), leurs propres expression et synthèse peuvent être modulées par l'effet pharmacologique des corticoïdes exogènes.

Il nous paraît donc intéressant d'évaluer l'impact sur la glande surrénale, d'une exposition anténatale aux corticoïdes par le biais de la modulation de l'expression d'un récepteur, en l'occurrence le récepteur dopaminergique D1, impliqué dans son fonctionnement.

## **II. Exposition postnatale à un stimulus physiologique**

Parmi les stimuli physiologiques auxquels peut être soumis un organisme vivant supérieur, l'**hypoxie** représente celui qui donne lieu aux réponses les plus rapides, les plus sophistiquées et les plus complexes. Car, il s'agit bien de la survie immédiate de l'individu qui est en jeu. Au cours de son existence, il aura à faire face à plusieurs situations pouvant conduire à l'apparition d'une hypoxie. Cependant, il est une période critique durant laquelle tout individu est particulièrement sensible à ce stimulus : la période périnatale qui correspond à un moment de transition d'un organisme qui n'a pas achevé encore son développement mais qui est soumis au passage à la vie aérienne. Il est alors indispensable que cet organisme immature ait pu mettre en œuvre les fonctions qui pourront répondre et contrôler ce stimulus.

La glande surrénale est au centre de cette adaptation extra-utérine. Et, à ce titre, elle acquiert au cours du développement les capacités qui la rendent sensibles au stimulus hypoxique. C'est ce que nous avons souhaité analyser dans les paragraphes suivants.

### **1. Mécanismes d'adaptation à l'hypoxie**

#### **1.1 Définition**

L'hypoxie, *stricto sensu*, correspond à la diminution de l'apport d'oxygène aux tissus, conséquence de l'hypoxémie. Aujourd'hui, dans la pratique, l'emploi du terme hypoxie est

devenu synonyme d'hypoxémie. Il s'agit donc de la diminution de la teneur du sang artériel en oxygène. On parle alors d'hypoxie, ou hypoxémie, lorsque, sous respiration d'air à une pression atmosphérique de 760 mmHg, la  $Pa_{O_2}$  est inférieure à 70 mmHg.

## 1.2 Mécanismes généraux

Chez l'Homme et les mammifères, l'exposition à une hypoxie génère des réactions d'adaptation qui ont toutes pour finalité de maintenir l'homéostasie interne de leur organisme, et préserver au mieux, le métabolisme aérobie de leurs cellules. Selon le caractère aigu ou chronique, sévère ou modéré de l'hypoxie, toute une cascade d'évènements survient :

- La réponse ventilatoire représente l'élément clinique fondamental. Il y a accélération du rythme respiratoire (phénomène d'hyperventilation) afin de renforcer l'hématose sanguine. La mise en jeu de mécanismes de lutte apparaît dans les cas où une atteinte pulmonaire constitue l'origine de l'état hypoxique. Les échanges gazeux air / sang sont ainsi facilités permettant d'améliorer le passage de l'oxygène vers les hématies et d'accentuer l'élimination du gaz carbonique du sang circulant.

- La réponse hémodynamique constitue un mécanisme adaptatif hautement spécialisé. Elle permet de distribuer préférentiellement la circulation sanguine aux organes nobles, ou particulièrement sensibles à l'hypoxie et dont la fonction est capitale pour la survie de l'individu. Ainsi, le cerveau, le poumon, le cœur, les reins et les glandes surrénales sont privilégiés aux dépens d'organes comme les os, la peau...

Les modifications hémodynamiques ont aussi pour but de maintenir une perfusion des organes compatibles avec des échanges gazeux efficaces.

- La réponse hématologique survient de façon retardée et est particulièrement manifeste dans le cas d'un état hypoxique chronique ou modéré. Il s'agit de constituer une polyglobulie en renforçant la production d'hématies. Plus nombreuses, elles permettent à l'organisme de mieux transporter vers ses organes, l'oxygène dont la pression artérielle est moindre. L'organisme compense par la quantité, la diminution de la qualité.

Elle fait appel aussi de façon concomitante à une réponse rénale modifiée. L'élimination rénale est, en effet, majorée en accentuant la diurèse et la natriurèse afin de mieux contrôler les changements volémiques secondaires à la polyglobulie.

- La réponse hormonale a pour objectif de coordonner l'ensemble de ces différents mécanismes. Elle est principalement le fait de la fonction surrénalienne. La sécrétion renforcée des glucocorticoïdes endogènes permet une adaptation relativement progressive bien que rapide. Et, la libération des catécholamines contrôle, elle, de façon aiguë, les adaptations immédiates indispensables à l'organisme soumis à une hypoxie.

### 1.3 Au niveau tissulaire

#### 1.3.1 Rôle du corps carotidien

La baisse de la pression artérielle en oxygène stimule les chémorécepteurs artériels périphériques. L'entité de référence est représentée par le corps ou glomus carotidien. Il est, par excellence, l'organe de réponse rapide à une hypoxie aiguë. Il s'agit d'une formation nerveuse, individualisable située à la face externe de la bifurcation carotidienne chez l'Homme. Elle possède des cellules de la lignée chromaffine, les cellules de type I qui ont des propriétés de chémosensibilité. L'information alors décelée est acheminée par les voies afférentes nerveuses jusqu'au cerveau.

Les cellules de type I, qui constituent les cellules spécialisées sensibles à l'oxygène, contiennent plusieurs agents neurotransmetteurs, comme des catécholamines ou des neuropeptides (Chen 1995). Parmi ces molécules, la dopamine apparaît particulièrement impliquée dans la transmission du signal chémosensible entre les cellules de type I et les fibres nerveuses afférentes (Fidone 1982, Fidone 1995). En effet, Le contenu en dopamine est augmenté dans les cellules de type I du corps carotidien au cours d'une exposition prolongée à l'hypoxie (Dalmaz 1988). Mais c'est aussi son utilisation et sa libération qui se trouvent amplifiées pendant ce stimulus, qui en dépolarisant les cellules de type I entraîne la sécrétion de la dopamine (Delpiano 1989).

C'est, en fait, l'activité de la tyrosine hydroxylase (enzyme clé de la production de dopamine) qui est majorée par une baisse de la pression en oxygène. L'équipe de Milhorn et Czyzyk-Krzeska a montré que la concentration de l'ARNm de TH était augmentée jusqu'à 500 %

dans le corps carotidien de rats exposés à une concentration en O<sub>2</sub> de 10 % pendant 1 à 48 heures (Milhorn 1993). Le mécanisme de chémosensibilité du corps carotidien fait donc appel à un phénomène moléculaire d'induction du gène de la TH par l'hypoxie (Fandrey 1995).

Enfin, les expériences pharmacologiques, confirmées par les techniques de biologie moléculaire, ont prouvé la participation des récepteurs dopaminergiques dans le fonctionnement et la régulation du système de réponse à l'hypoxie du corps carotidien (Bairam 1998, Bairam 2000). Les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont présents et leurs stimulations modulent le chémoréflexe carotidien (cf. paragraphe IV,2.1.3).

En parallèle, les cellules de type I possèdent de nombreux canaux potassiques, calciques et sodiques voltage dépendants et dont la mission serait de mettre en jeu de façon encore plus rapide la réponse à l'hypoxie, nécessaire dans les cas aigus de baisse de pression en oxygène. Les courants potassiques des cellules de type I sont inhibés par l'hypoxie (Lopez-Lopez 1992). La mobilisation du calcium intracellulaire est également impliquée, en particulier dans l'induction du gène de TH par l'hypoxie (Raymond 1997).

### 1.3.2 Production d'érythropoïétine

L'augmentation de la production d'érythropoïétine (Epo) est une réponse physiologique adaptée à un état d'hypoxie. En favorisant l'érythropoïèse, elle augmente la quantité d'hémoglobine circulante et ainsi la capacité de liaison de l'oxygène dans le sang. Il s'agit du

mode électif de l'adaptation à une hypoxie modérée et prolongée comme on le rencontre en haute altitude, par exemple.

L'érythropoïétine est une hormone de nature glycoprotéique qui régule la prolifération et la différenciation des érythroblastes. Elle est principalement produite par le rein, ou le foie chez le fœtus. Sa production et sa sécrétion sont stimulées par l'hypoxie.

En effet, les cellules productrices de l'érythropoïétine ont la capacité de répondre à l'hypoxie en augmentant de plusieurs centaines de fois le taux de ARNm de l'Epo (Bondurant 1986, Fandrey 1993). C'est par l'étude des phénomènes moléculaires régissant cette spécificité du gène de l'Epo à l'hypoxie que les mécanismes cellulaires de sensibilité à l'oxygène sont mieux compris aujourd'hui. Car, il est connu que la production d'Epo est aussi stimulée par des ions métalliques comme le cobalt, ou le nickel (Zhu 1999). Il a ainsi été montré que l'amplification de l'expression de l'ARNm de l'Epo et la production de la protéine étaient dose dépendante avec des concentrations croissantes de  $\text{CoCl}_2$  et  $\text{NiCl}_2$  de façon similaire à ce qui était observé avec des degrés croissants d'hypoxie (Fandrey 1993, Goldberg 1988). Et, que le monoxyde de carbone inhibait cette induction de l'Epo par l'hypoxie, alors qu'il ne l'inhibait pas lorsque l'induction était secondaire au cobalt ou au nickel (Huang 1999). Ainsi pour Zhu, l'hypothèse que l'élément cellulaire sensible à l'oxygène est une protéine de type hème est fort séduisante, d'autant plus que le monoxyde de carbone supprime l'induction par l'hypoxie d'autres gènes et notamment dans le corps carotidien.

## 1.4 au niveau moléculaire

Les mécanismes moléculaires responsables de la sensibilité à l'oxygène sont encore imparfaitement connus, en particulier ce facteur qui agirait comme un "sensor" à l'oxygène favorisant ainsi l'induction des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie. Cependant, un certain nombre d'éléments a été défini ces dernières années.

### 1.4.1 HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1)

Facteur de transcription, il est défini comme un dimère constitué d'une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . En état de normoxie, la sous-unité  $\alpha$  est soumise à une dégradation au niveau de toutes les cellules de l'organisme. En revanche, en réponse à un état d'hypoxie, cette dégradation est inhibée. Il existe même une activation de la sous-unité qui va dimériser avec la sous-unité  $\beta$  pour former la protéine active HIF-1. Cette protéine se lie à une séquence 5'-RCGTG-3' que l'on retrouve sur les gènes cibles et sensibles à l'hypoxie. Parmi lesquels, on retrouve le gène de l'Epo, de TH, mais aussi celui de la transferrine ou du récepteur adrénergique  $\alpha_{1B}$ ...

Pour Semenza, cette protéine semble donc jouer un rôle essentiel dans le développement normal, les réponses physiologiques à l'hypoxie et aussi dans la physiopathologie de tout tissu ischémique ou de néotissus. Elle serait, en particulier, indispensable à la survie de l'embryon : en effet, les embryons de souris déficients pour HIF-1 $\alpha$  arrêtent leur développement et meurent vers le dixième jour de gestation.

#### 1.4.2 Modèles moléculaires de sensibilité à l'oxygène

Un système de sensibilité à l'oxygène a été identifié chez un procaryote, *Rhizobium meliloti*. Cette bactérie possède une hème-protéine se liant à l'oxygène et contenant un domaine de type protéine kinase. Les gènes de fixation de l'azote de cette bactérie sont sous la dépendance de la pression en oxygène. En cas de condition hypoxique, elle est capable d'induire les gènes de fixation de l'azote grâce à la phosphorylation par la protéine kinase d'une protéine qui active leur transcription. Ce domaine sensible à l'oxygène a une certaine identité avec le cytochrome P450 humain (Fandrey 1995), qui appartient à la famille des hème-protéines.

Ceci souligne le rôle probablement central des hème-protéines dans la machinerie moléculaire de sensibilité cellulaire à l'oxygène. Ce qui conduit Zhu en 1999 à proposer 2 systèmes potentiels pouvant être impliqués chez l'Homme et les mammifères dans la réponse à une hypoxie :

- Une cytochrome b-like NAD(P) H oxydase

Dans les cellules sensibles à l'oxygène se trouve une flavo-hème protéine dans la membrane plasmatique. Elle fonctionne comme une NADPH oxydase, transférant les électrons de la flavine et de l'hème vers les molécules d'oxygène. Elle génère ainsi des ions superoxydes, convertis en radical hydroxyle en présence de fer. Puis plusieurs réactions complètent le mécanisme jusqu'à l'oxydation de la sous-unité HIF-1  $\alpha$  qui est alors dégradés par les protéosomes. En cas d'hypoxie, la sous-unité HIF-1  $\alpha$  devient plus stable, elle peut alors constituer le dimère HIF-1 et aboutir à l'induction des gènes sensibles à l'oxygène (cf. paragraphe précédent).

## - Le complexe IV hème-protéine mitochondrial

La mitochondrie représente un site primitif de métabolisme de l'oxygène cellulaire. Il apparaît logique qu'elle puisse être proposée comme site de sensibilité à l'oxygène et comme lieu d'initiation d'un signal de transduction. Sur la base d'expériences montrant qu'une hypoxie est suivie d'une réduction significative de la Vmax de la cytochrome oxydase mitochondriale (qui correspond au complexe IV), Zhu évoque l'implication possible de cet organite dans les mécanismes d'oxygénosensibilité. Cependant, les réactions mises en évidence et aboutissant à l'activation de HIF-1 font appel à une élévation des ROS. Alors que dans les réactions du cytochrome b-like NAD(P)H oxydase, c'est la baisse des ROS qui active HIF-1 en état d'hypoxie. Il demeure des zones d'ombre pour comprendre comment un signal chimique peut conduire à une réaction moléculaire cellulaire en réponse.

## **2. Dopamine et récepteurs dopaminergiques**

Le système dopaminergique est logiquement impliqué dans les modifications physiologiques qui font suite à une hypoxie. En effet, la dopamine représente le neurotransmetteur préférentiel des organes régissant la réponse organique à l'hypoxie : le corps carotidien, plus accessoirement les glandes surrénales. Mais aussi, les récepteurs dopaminergiques constituent un système de neurotransmission prédominant dans les organes nobles très sensibles à l'hypoxie comme le cerveau.

Dans le Système Nerveux Central, les récepteurs dopaminergiques centraux présentent des modifications de leur quantité. Cependant, ces changements sont variables selon la zone anatomique considérée et le type de récepteurs dopaminergiques. Enfin, l'effet est, en règle, manifeste quelques heures après l'épisode hypoxique et se prolonge au-delà après que le

stimulus hypoxique a disparu. Ainsi, Araki en 1996 a conduit des études pharmacologiques de binding qui ont montré qu'il y avait une réduction significative des récepteurs D1 dans le striatum après une ischémie cérébrale de 10 minutes. Cependant, les récepteurs D2 striataux n'étaient pas affectés. Dans le cortex frontal, ni le R DA D1, ni le R DA D2 subissaient une variation de leurs capacités de binding. À l'inverse, les études d'autoradiographies montraient une diminution de la densité dans le striatum des deux types de récepteurs, dans des proportions relativement modérées (20 à 25 %) et dans des conditions expérimentales faisant appel à une hypoxie moins sévère mais plus longue (Johnson 1994). Ces variations induites par l'hypoxie sur le système des récepteurs dopaminergiques centraux sont précédées d'un formidable pic de dopamine libérées dans les minutes suivant l'hypoxie (Nakajima 1996).

En périphérie, l'augmentation du contenu en dopamine, et en particulier la majoration de la libération de dopamine par les cellules sensibles à l'oxygène sont très bien documentées après un stimulus hypoxique dans le corps carotidien (Dalmaz 1987), le ganglion supérieur (Dalmaz 1988), la médullosurrénale (Dalmaz 1988). De plus, il semble exister une réponse à l'hypoxie qui varie selon le stade de développement (Bairam 1996).

Les récepteurs dopaminergiques périphériques sont également influencés dans leur expression après une exposition à l'hypoxie. Huey, en 2000, l'a montré pour l'expression de l'ARNm du R DA D2 dans le corps carotidien. Il existe une diminution significative (60%) du taux d'ARNm dans les 48 heures suivant l'hypoxie. Cependant, une augmentation de près de 300% se manifeste 120 heures plus tard alors que l'hypoxie a été maintenue. Ceci introduit la notion de variations temps-dépendant dans les effets de modulations des récepteurs impliqués dans le chémoréflexe carotidien. Mais aussi, ce phénomène moléculaire souligne le phénomène clinique d'adaptation ventilatoire dans les cas de tableaux d'hypoxie chronique.

Quel que soit le type de récepteur dopaminergique, l'expression est potentiellement modulée par l'exposition à l'hypoxie à condition qu'il soit impliqué dans le mécanisme de réponse de l'organe considéré. Ainsi, l'expression du récepteur dopaminergique D1 périphérique se trouve augmentée dans les cellules rénales épithéliales après un stimulus hypoxique (Healy 2000).

### **3. Glande surrénale et réponse à l'hypoxie**

Les glandes surrénales, en tant qu'organes du contrôle du stress, sont impliquées dans la réponse de l'organisme lorsqu'il est soumis à un état d'hypoxie. Il est anciennement évoqué que l'hypoxie stimule la sécrétion médullosurrénalienne par un mécanisme médié par voie centrale (Snider 1974). Au même titre que d'autres stimuli comme l'hypoglycémie, l'hypoxie est à l'origine d'une stimulation neurogénique des glandes surrénales, qui est suivie d'une augmentation rapide et prononcée en catécholamines, et en particulier en dopamine (Snider 1974). Mais les deux parties de la glande sont intéressées par le stimulus. De plus, la spécificité de développement de cet organe fait que le mécanisme neurogénique n'est pas le seul responsable de la réponse surrénalienne.

#### 3.1 La corticosurrénale

Les situations de stress aigu sont accompagnées chez l'adulte comme chez le fœtus d'une élévation de la sécrétion de cortisol depuis la corticosurrénale. Elle est largement le reflet d'une élévation des concentrations en ACTH plasmatique.

Cependant, l'innervation de cette portion de la glande est reconnue depuis peu. Sa finalité est encore mal appréhendée. Mais plusieurs travaux récents évoquent une origine nerveuse dans la réponse cortisolique au cours d'une hypoxie aiguë (Giussani 1994,

Riquelme 1998). Pour Riquelme, il existerait une composante neurogénique non négligeable à la sécrétion de cortisol dans les suites d'une hypoxie. Elle impliquerait le chémoréflexe carotidien qui donnerait lieu à un influx véhiculé par les fibres nerveuses efférentes splanchniques. Ceci est suggéré par les expérimentations de section de l'innervation du sinus carotidien qui montrent une réduction de la réponse en cortisol au cours d'une hypoxie aiguë chez le fœtus de mouton, alors même que l'augmentation de l'ACTH plasmatique est bien présente (Giussani 1994). Riquelme a complété ceci chez le fœtus de lama en montrant que l'intégrité des chémorécepteurs était indispensable en raison d'une influence directe sur la réponse corticosurrénalienne.

### 3.2 la médullosurrénale

Elle constitue, par excellence, la zone de la glande surrénale concernée par la réponse à l'hypoxie. D'une part parce qu'elle possède des cellules embryologiquement voisines des cellules de type I du corps carotidien, les cellules chromaffines. D'autre part parce qu'elle synthétise les catécholamines impliquées dans le contrôle de la cascade d'évènements biologiques suite à une situation de stress. Ceci fait appel à un mécanisme neurogénique passant par l'innervation splanchnique.

En tout cas, l'hypoxie induit une augmentation franche du contenu en dopamine de la médullosurrénale (Dalmaz 1988), et une élévation de la sécrétion catécholaminergique par action sur l'activité de TH.

Mais surtout, les cellules chromaffines surrénales appartiennent au groupe des cellules chémosensibles (Mochizuki-Oda 1997). L'hypoxie *in vitro* est capable de générer directement une décharge catécholaminergique par les cellules chromaffines. Itoh en 1994 avait montré

sur des cellules chromaffines bovines que l'hypoxie majorait la libération des catécholamines grâce à une élévation du calcium intracellulaire mettant en jeu plusieurs types de canaux voltage dépendants. De plus, les canaux potassiques sensibles à l'oxygène seraient impliqués, induisant une dépolarisation de la cellule, et par conséquent la mise en route de sa machinerie apportant sa réponse (Mochizuki-Oda 1997). Ces cellules chromaffines représentent aujourd'hui un modèle cellulaire de référence pour l'étude *in vitro* de l'effet de l'hypoxie sur la réponse cellulaire. En particulier, les lignées cellulaires PC-12, issues de phéochromocytomes, sont largement usitées, notamment pour l'analyse des mécanismes régissant la sécrétion catécholaminergique post hypoxique (Kumar 1998, Taylor 1998). Ces cellules isolées de l'unité de leur organe et soustraites à l'influence neurogénique ont aussi un intérêt pour la compréhension des phénomènes présents au début du développement.

### 3.3 Spécificité de la période périnatale

La glande surrénale possède la caractéristique de fonctionner et de répondre aux influences extérieures de son environnement bien avant que la maturation de son contrôle neurogénique soit effective. Le mécanisme de contrôle est alors de nature non neurogénique (Seidler 1985). Cependant, elle présente aussi la particularité de voir son développement influencé par les stimuli dont elle a été l'objet pendant la phase où elle était immature.

L'hypoxie est un stimulus qui peut modifier à moyen ou long terme le fonctionnement surrénalien. Ainsi, l'équipe de Péquignot et Dalmaz ont mis en évidence récemment que chez le rat, l'exposition prolongée à une hypoxie prénatale conduisait en postnatal à une modification du contenu stocké de catécholamines, mais aussi de la synthèse même de ses catécholamines (Mamet 2002), et ceci semble persister chez l'adulte. Heydeck en 1994 avait

montré que c'était la sensibilité aux catécholamines des organes, en l'occurrence le cœur, qui était modifiée après une hypoxie prénatale.

Il paraît donc particulièrement crucial d'évaluer jusqu'à l'achèvement du développement, le retentissement d'un stimulus survenu sur un organisme immature. La glande surrénale possède les qualités pour des études particulièrement ciblées sur l'impact de stimuli sur son fonctionnement ou les moyens dont elle dispose pour assurer sa fonction. En s'appuyant donc sur l'équipement en système messager qu'elle possède, il est possible d'apprécier en quoi le développement influence ou sera influencé par la survenue d'évènements extérieurs à son bon déroulement. L'analyse de la modulation de l'expression du récepteur dopaminergique D1 de la glande surrénale après stimulus pharmacologique ou hypoxique est une démarche particulièrement intéressante si elle s'attache à évaluer plusieurs âges de développement. Nous avons rassemblé dans la section suivante les travaux conduits pour atteindre cet objectif.

**SECTION**  
**EXPERIMENTALE**

## CHAPITRE I

### **Exposition Anténatale à la Bétaméthasone Et Expression des Récepteurs Dopaminergiques**

#### **I. Situation du sujet**

Depuis maintenant une décennie, nous assistons à un développement intense des activités pharmacologiques thérapeutiques *in utero*. Or l'exposition anténatale à un médicament, même à dose unique peut avoir des conséquences positives ou délétères à court, moyen ou long terme chez un individu en développement. Ainsi l'efficacité d'une corticothérapie anténatale sur la stimulation de la maturation de l'organisme fœtal est reconnue (Liggins 1972). Son intérêt clinique en terme de mortalité et morbidité (essentiellement respiratoire) est régulièrement rappelé dans la littérature médicale (Crowley 1990, Crowley 1995). De sorte que le recours à ce traitement est recommandé depuis 1995 (NIH) devant toute situation pouvant conduire à une naissance anticipée avant 34 semaines d'âge gestationnel.

Les glandes surrénales, comme le Système Nerveux Central (Matthews 2000), sont des organes cibles de l'action maturante des corticoïdes endogènes sécrétés par le

foetus pendant la gestation (Slotkin 1992, Liggins 1976, Lagercrantz 1986). Ils sont donc naturellement la cible de l'action pharmacologique des corticoïdes exogènes délivrés pendant cette période.

Tous deux sont le siège de l'expression de systèmes de récepteurs impliqués dans la régulation de leur fonction. Les récepteurs dopaminergiques constituent un groupe de récepteurs répandu, ubiquitaire et largement étudié et connu (Missale 1998). Au niveau du Système Nerveux Central, ils représentent un système de neurotransmission prépondérant, en particulier dans le striatum avec les sous-types D1 et D2, qui sont présents et fonctionnels bien avant la naissance (Moody 1993). Au cours des phénomènes développementaux de maturation, l'expression de ces récepteurs dopaminergiques centraux subit une modulation âge-dépendante (Xu 1992).

Au niveau périphérique, ces mêmes récepteurs sont retrouvés dans les glandes surrénales. Ils interviennent dans les mécanismes de régulation des phénomènes sécrétoires surrénaux (en particulier catécholaminergique) (Missale 1998). La stimulation du sous-type D1 entraîne la libération des catécholamines, celle du sous-type D2 inhibe cette libération. De plus, lors des premières étapes du développement, avant que le contrôle neurogénique des surrénales *via* le système sympathique ne soit mature et efficient, ils pourraient être particulièrement impliqués dans les mécanismes du contrôle non neurogénique de la fonction surrénalienne. Or, pour la plupart des espèces, dont le lapin et l'Homme, il s'agit du mode de régulation qui régit la réponse catécholaminergique périnatale, notamment au cours du stress de la naissance (Slotkin 1988). La libération concomitante de leur agoniste naturel, la dopamine, la notion d'autorécepteur prouvée pour le récepteur dopaminergique D2 (Gauda 1996, Zhu 1997) étayent cette hypothèse.

Cependant, il faut noter que, l'évolution surrénalienne de l'expression, au moins pour le récepteur dopaminergique D1, n'est pas connue au cours du développement.

## **II. Définition des Objectifs**

L'objectif général de cette étude est de *préciser expérimentalement les conséquences d'une corticothérapie anténatale sur l'expression de l'ARN messenger du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale de lapin au cours du développement.*

Il est proposé de comparer des animaux ayant reçu *in utero* des corticoïdes dans des conditions proches de celles de la pratique clinique en vue de la prévention de la détresse respiratoire du prématuré, à des sujets témoins issus de mères ayant reçu une solution saline. Nous pouvons alors décomposer cet objectif général en objectifs plus spécifiques qui sont :

- *étudier l'effet d'une exposition anténatale à la bétaméthasone (Célestone®) sur l'expression de l'ARN messenger des récepteurs dopaminergiques centraux D1 et D2 de lapin au cours du développement dans un système référent, le striatum. Ce qui permettra ainsi de valider les techniques de biologie moléculaire développées par notre laboratoire afin de mettre en évidence les transcrits de récepteurs dopaminergiques.*
  
- *étudier l'ontogenèse de l'expression du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale, comparativement à celle dans le striatum de lapin pendant le développement.*

- *et ainsi étudier l'effet d'une exposition anténatale à la bétaméthasone (Célestone®) sur l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale de lapin au cours du développement.*

Il faut souligner que le choix du lapin comme modèle animal a été guidé par la similitude qu'il présente avec le système sympatho-adrénergique humain. De plus, il est considéré comme l'animal de référence dans l'étude des effets *in vivo* des corticoïdes sur la maturation pulmonaire (Ballard 1986).

Le choix de la bétaméthasone s'explique par le fait qu'il s'agit du corticoïde préférentiellement utilisé en clinique humaine dans la prévention de la détresse respiratoire du prématuré. Même si dans les travaux expérimentaux, la dexaméthasone a été plus fréquemment usitée, nous avons souhaité nous approcher le plus près possible de la pratique médicale. D'autant que les données bibliographiques concernant la bétaméthasone deviennent plus fournies.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé la technique de biologie moléculaire par Northern Blot. Elle a l'avantage de mettre en évidence les transcrits eux-mêmes et donc d'apprécier directement les variations d'expression. Nous avons dû procéder à la mise au point de sondes spécifiques reconnaissant les ARN messagers des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 du lapin.

### **III. Effet d'une Exposition Anténatale à la Bétaméthasone sur l'Expression de l'ARN messager des Récepteurs Dopaminergiques Centraux D1 et D2.**

#### **1. Hypothèse et but du travail**

En pratique clinique, la corticothérapie anténatale est utilisée à titre préventif au cours de la grossesse pour accélérer la maturation pulmonaire du fœtus dès lors qu'une menace d'accouchement prématuré existe. Ainsi, la morbidité respiratoire du prématuré est diminuée et le pronostic global de la prématurité nettement amélioré. Des études à long terme concernant des enfants exposés aux corticoïdes avant la naissance ont été menées dans le but de détecter les conséquences de cette exposition anténatale sur l'avenir neuropsychologique de ces enfants (Mc Arthur 1981, Mc Arthur 1982, Trautman 1995). L'impact au niveau ultra structural de ces médicaments demeure partiellement connu alors même que les corticoïdes ont un effet sur le Système Nerveux Central en développement (Matthews 2000) et donc sur les phénomènes physiologiques de maturation cérébrale. Le système des récepteurs dopaminergiques dans le striatum est un des systèmes de neurotransmission qui a été le plus étudié et qui est le mieux connu dans son évolution au cours du développement. Il représente donc un système de référence pour la mise en évidence des récepteurs dopaminergiques et la modulation de leur expression (cf. paragraphe IV.1.2 / section bibliographique).

C'est la raison pour laquelle, notre objectif a été d'évaluer l'effet possible d'un traitement anténatal par la bétaméthasone sur l'expression de l'ARN messager des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 du striatum chez le lapin en développement.

## **2. Travail réalisé**

### **2.1 Célestone Solupsan<sup>®</sup>**

Cette présentation du commerce (laboratoire Schering) comprend une association d'acétate de bétaméthasone et de phosphate sodique de bétaméthasone. Il agit par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes.

#### ***2.1.1 Structure chimique***

Ce glucocorticoïde de synthèse comporte une structure phénanthrène. Il s'agit d'un dérivé du stérol ou diméthyl-cyclopentanoperhydrophénanthrène qui se caractérise par un cycle A insaturé, une fonction cétone en 3 et une fonction cétone ou alcool secondaire en 11.

#### ***2.1.2 Pharmacocinétique et métabolisme***

Sa biodisponibilité par voie orale est bonne (> 60 %). Son absorption est cependant variable. C'est un médicament fortement lié aux protéines plasmatiques (60 %). Son affinité pour les récepteurs aux glucocorticoïdes varie en fonction du tissu et de l'espèce animale. Sa demi-vie plasmatique est de l'ordre de 5 heures, elle est bien supérieure à celle du cortisol (1 heure) plus sensible à la dégradation enzymatique.

Il est principalement métabolisé au niveau du foie. Les métabolites obtenus sont, en général, inactifs. L'élimination se fait essentiellement par voie rénale.

Administré chez la femelle gestante, il atteint le fœtus par voie transplacentaire ; la présence d'un atome Fluor minore la dégradation par les enzymes placentaires.

### ***2.1.3 Indications***

Il est principalement utilisé pour son effet anti-inflammatoire. A fortes doses, il diminue la réponse immunitaire. Une rétention hydrosodée (couplée à une fuite potassique) est habituellement observée, entraînant parfois une élévation de la pression artérielle systémique.

## **2.2 Traitement des animaux**

Les lapines gestantes ont été traitées au 25<sup>e</sup> et 26<sup>e</sup> jours de gestation pour l'étude fœtale réalisée sur des fœtus de 27 jours, ou au 27<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jours de gestation pour l'étude postnatale effectuée à 1 jour de vie, 25 jours de vie et à 6 mois de vie. Elles recevaient une fois par jour (soit au total 2 injections) par voie musculaire, soit la solution commercialisée de Célestone solupsan<sup>®</sup> à la dose de 0.1 mg/kg, soit l'équivalent en volume de NaCl 0.9 %. Administration faite en aveugle sans connaître le type de solution injectée.

La détermination de la dose administrée a été fixée afin que les conditions expérimentales se rapprochent au plus près des conditions de la pratique clinique : nombre d'administration, dose totale cumulée. La quantité délivrée était réduite pour améliorer la tolérance des lapines gestantes, animaux connus pour avoir

une sensibilité importante aux fortes doses, responsables alors d'avortement. D'autant plus que les données de la littérature montraient que l'effet maturatif des corticoïdes était présent sur le poumon de lapin dès l'injection de 0.05 mg/kg (Rider 1990). Le nombre d'administration étaient fixé à 2 (réalisée à 24 heures d'intervalle) pour être comparable aux schémas thérapeutiques humains. Nous avons donc retenu la dose de 0.1 mg/kg ramenée au maximum à 0.3 ml par injection (dose totale cumulée de 0.2 mg/kg).

Pour l'étude fœtale, les lapines étaient sacrifiées à 27 jours de gestation. Pour l'étude postnatale, la parturition survenait de façon spontanée entre 29 et 30 jours de gestation.

A 3 stades de développement, jours J1 et J25 et à 6 mois, un certain nombre de sujets de différentes portées était soustrait pour effectuer le prélèvement des striatum, ainsi que des glandes surrénales. La levée de l'aveugle était réalisée après le sacrifice des premiers sujets. Afin de diminuer les variabilités interindividuelles, plusieurs portées ont été utilisées (4 ayant reçu les corticoïdes, 3 la solution saline).

## **2.3 Méthodes**

### ***2.3.1 Prélèvement des striata***

Le prélèvement des striata a été mené après sacrifice des sujets. Dès l'extériorisation de l'utérus, les fœtus étaient décapités. Les nouveau-nés, 25 jours et

adultes étaient, au préalable, anesthésiés avec un mélange de xylazine et kétamine injecté par voie intrapéritonéale ou intramusculaire, puis décapités. Une craniotomie sagittale était alors réalisée permettant d'extérioriser le cerveau. L'encéphale était alors sectionné dans son tiers antérieur verticalement et en orientant la coupe de façon coronale. Ceci laissait apparaître les 2 striata comme des formations renflées, oblongues, de teinte d'autant plus blanchâtre que l'individu était âgé, se situant sous les planchers des ventricules latéraux. Ils étaient alors recueillis par simple clivage réalisé à l'aide d'une pince courbe. Dès le prélèvement achevé, ils étaient placés dans de la neige carbonique et rapidement congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans l'attente des analyses suivantes.

### ***2.3.2 Extraction de l'ARN***

L'ensemble des organes prélevés étaient poolés par âge et par type d'injections reçues (corticoïdes ou non). 2 extractions indépendantes étaient effectuées pour chaque condition et pour chaque âge. Après avoir extrait de chaque pool des échantillons pesés, à l'aide du kit d'extraction *Rneasy Qiagen kit* (Qiagen, Hilden, Allemagne), des extraits d'ARN total étaient recueillis. La concentration de chaque extrait était mesurée de 3 manières différentes pour obtenir un résultat le plus fiable possible : évaluation par spectrométrie avec étude de l'absorbance à 260 nm (et à 280 nm pour s'assurer d'une pureté correcte de l'échantillon), puis migration sur gel d'agarose 1 % et comparaison à une échelle étalon, enfin hybridation simultanée par Northern de 4  $\mu\text{g}$  calculés d'ARN total avec une sonde 18 S de chaque extrait obtenu.

### ***2.3.3 Fabrication des sondes***

La préparation des sondes spécifiques des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 était réalisée à partir d'un fragment correspondant d'ADNc de lapin. Le fragment était alors amplifié par technique PCR permettant d'obtenir un échantillon de sondes à une concentration donnée. (Voir détails dans la section Annexe Technique). Pour chaque analyse, il était alors prélevé une petite quantité de cet échantillon. Cette sonde, après dénaturation, était radiomarquée au phosphore P<sup>32</sup> par random priming. Il était utilisé approximativement une radioactivité de 1.10<sup>6</sup> cpm/ml dans la constitution de la solution d'hybridation.

### ***2.3.4 Analyse par technique de Northern blot***

Nous avons utilisé les méthodes décrites par Khandjian en 1986. Dans un premier temps, nous avons fait migrer une quantité de 5 µg d'ARN total recueillis sur gel d'agarose 1% dénaturant. L'étape suivante a consisté à transférer sur membrane de nylon le matériel migré. La membrane était alors exposée aux ultraviolets pendant 2 minutes et colorée afin de nous assurer de l'intégrité de l'ARN transféré.

Dans un deuxième temps, l'étape d'hybridation était réalisée après avoir mis en contact la membrane avec une solution de pré-hybridation pendant 24 heures. Il était alors rajouté la sonde spécifique radiomarquée pour , de nouveau, 24 heures.

Enfin, troisième temps, après lavage, chaque membrane était exposée sur plaque BAS 1000 de phosphorimage (Fuji Medical Systems USA, Stanford, CT) pour une durée donnée en fonction de l'intensité du signal émis. L'utilisation du logiciel Mac BAS (MacBAS V2.5 Software, Fuji Photo Filier Co.) permettait d'étudier l'abondance des

ARN messagers des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 exprimée en pixels d'intensité. Puis la membrane était exposée sur film radiographique avec plaque intensifiante placée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Cette procédure se déroulait sur une même membrane pour chaque âge étudié. Une même condition expérimentale était évaluée plusieurs fois. Au total, 2 extractions d'ARN ont été réalisées. Pour chacune d'entre elles, 3 membranes étaient constituées. En somme, 6 expériences étaient effectuées permettant d'obtenir des résultats avec une moyenne et une variance pour chaque âge.

Les mêmes membranes étaient successivement hybridées d'abord avec la sonde spécifique du R DA D1, puis avec celle du R-DA D2, et enfin avec celle du 18 S (qui permettait de s'assurer de la comparaison entre les différents blots).

Ainsi, lors de l'hybridation D1, l'exposition sur la plaque de phosphorimage était de 24 heures et de 7 jours sur film radiographique. Pour l'hybridation D2, la durée d'exposition était respectivement de 18 heures et 4 jours. Enfin, l'hybridation 18 S demandait une exposition courte, 10 minutes et 70 minutes.

### **3. Principaux résultats**

#### **3.1 Groupe témoin**

Les animaux du groupe témoin ont été placés dans les mêmes conditions expérimentales que ceux recevant une corticothérapie injectable. Le recours dans ce groupe à 2 injections de sérum salé permet de neutraliser l'effet stress lié aux manipulations et piqûres. L'expression de l'ARN messager des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le striatum de lapin constitue bien l'état de base au

cours de notre expérimentation. A chaque âge étudié, cette expression est présente. L'ARNm du R DA D1 apparaissait sous la forme d'un spot de radioactivité se situant aux alentours de 4.4 kDa. L'ARNm du R-DA D2 se situait, quant à lui, aux environs de 2.5 kDa. Afin de comparer chaque niveau d'expression à celui des animaux traités, nous l'avons arbitrairement fixé à un niveau coté 1. Ce qui représente le niveau de référence pour chaque âge.

### **3.2 Effet de la bétaméthasone**

#### ***3.2.1 Sur l'expression du R DA D1***

La bétaméthasone reçue en anténatal a induit une augmentation significative de l'expression de l'ARN messager du R DA D1 dans le striatum. Cette surexpression apparaît précocement après la thérapeutique, puisqu'elle est déjà manifeste chez le fœtus 24 heures plus tard. Cependant, après la naissance, l'expression de l'ARN messager du R DA D1 est diminuée dans le groupe traité par rapport au groupe témoin chez les lapins de 1 et 25 jours. Et, finalement nous constatons une expression équivalente chez les adultes des 2 groupes (voir ci-contre figure 11).

#### ***3.2.2 Sur l'expression du R-DA D2***

L'évolution de l'expression de l'ARN messager du R-DA D2 dans le striatum de lapin après corticothérapie anténatale est identique à celle du R DA D1. Les fœtus traités exprime plus fortement l'ARN messager du R-DA D2 que les fœtus témoins ; alors que les lapins de 1 et 25 jours l'expriment plus faiblement, et que les adultes présentent une expression équivalente (voir ci-contre figure 11).

#### 4. Conclusion

Cette étude met en évidence qu'une corticothérapie anténatale représente un stimulus pharmacologique puissant et d'action prolongée pour les transcrits des récepteurs dopaminergiques centraux D1 et D2 présents dans le striatum de lapins. L'augmentation précoce anténatale d'expression est suivie d'une réduction postnatale de cette expression. Cependant, à l'âge adulte, il n'existe plus de différence d'expression entre les groupes témoin et traité. Physiologiquement, les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont exprimés très tôt dans le striatum au cours du développement. La maturation de ce système se manifeste notamment par une modulation âge-dépendante de l'expression des récepteurs avec un pic au 30<sup>ième</sup> jour de vie environ. L'évolution de leur expression après corticothérapie anténatale pourrait correspondre à un délai de ce phénomène de maturation secondaire à la surexpression initiale. Il n'est pas connu si les changements dans l'expression sont suivis de modifications dans la densité des récepteurs et, par conséquent de retentissements cliniques sur les acquisitions neuromotrices pendant le développement.

Même si le retour à une expression équivalente chez les adultes amène à conclure à un effet prolongé mais transitoire, il n'est pas suffisant pour éliminer tout risque de conséquences sur le développement cérébral après une corticothérapie anténatale.

Enfin, cette étude préliminaire nous a permis d'affirmer que les sondes spécifiques mises au point au sein du laboratoire révélaient bien les transcrits des R DA D1 et R DA D2 . Nous avons alors validé notre méthodologie pour la poursuite ultérieure de nos expérimentations.

#### 5. Publication : Article 1 (cf. page suivante)

## Antenatal Treatment with Corticosteroids Affects mRNA Expression of Dopamine D1 and D2 Receptors in the Striatum of Developing Rabbit

Jean-Marc Labaune<sup>a,b</sup> Marie-Jeanne Boutroy<sup>a</sup> Aida Bairam<sup>b</sup>

<sup>a</sup>JE 2164, Adaptation Néonatale et Développement, Université Henri-Poincaré Nancy 1, Nancy, France et

<sup>b</sup>Unité de Recherche en Périnatalogie, Centre de Recherche HSA, Université Laval, Québec, Canada

### Key Words

Dopaminergic receptors · Antenatal treatment with corticosteroids · Development · Striatum

### Abstract

The expression levels of dopamine D1 and D2 receptor mRNA have been investigated using Northern blot analysis in developing rabbit striatum after antenatal exposure to betamethasone. Pregnant rabbits were given either 0.1 mg/kg betamethasone or 0.1 mg/kg saline doses twice within 24 h. Dopamine D1 receptor mRNA levels were found significantly higher in the fetuses exposed to antenatal betamethasone than in the saline-treated controls. After birth, dopamine D1 and D2 receptor mRNA levels were both significantly lower in 1- and 25-day-old treated pups but recovered to normal levels in adulthood. These data suggest that antenatal exposure to betamethasone can lead to lasting abnormalities.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Antenatal treatment with corticosteroids is now well admitted as an efficient therapy to prevent the respiratory distress syndrome in premature neonates and to decrease the neonatal morbidity and mortality of prematurity. The

NIH Consensus Development Conference [1] recognized its usefulness on fetal lung maturation when the risk of premature labor exists. However, corticoids interfere with multiple physiological mechanisms, particularly in terms of cellular growth. Endogenous corticoids are known to promote the development of central catecholaminergic activity during the fetal life [2] but exposure in late gestation to high doses of exogenous corticoids could lead to adverse effects on brain structures [3]. One can question the putative deleterious consequences of corticoids on their specific targets as neurons, neurotransmitters such as dopamine and neurotransmitter receptors. In fact, dopamine receptors D1 and D2 are largely present in striatum in different animal species. They are involved in multiple functions as cognition and motor activity [4]. Dysfunction of the dopaminergic striatal system can lead to different diseases like Parkinson syndrome. We have shown that a short antenatal exposure to 0.1 mg/kg betamethasone can lead to an overexpression of dopamine D1 receptor in the adrenals of developing rabbits [5]. In this report, we describe the influence of this antenatal exposure to betamethasone on striatal dopamine D1 and D2 receptor (DA D1-R and DA D2-R) mRNA expression in the fetus and developing rabbit.

### KARGER

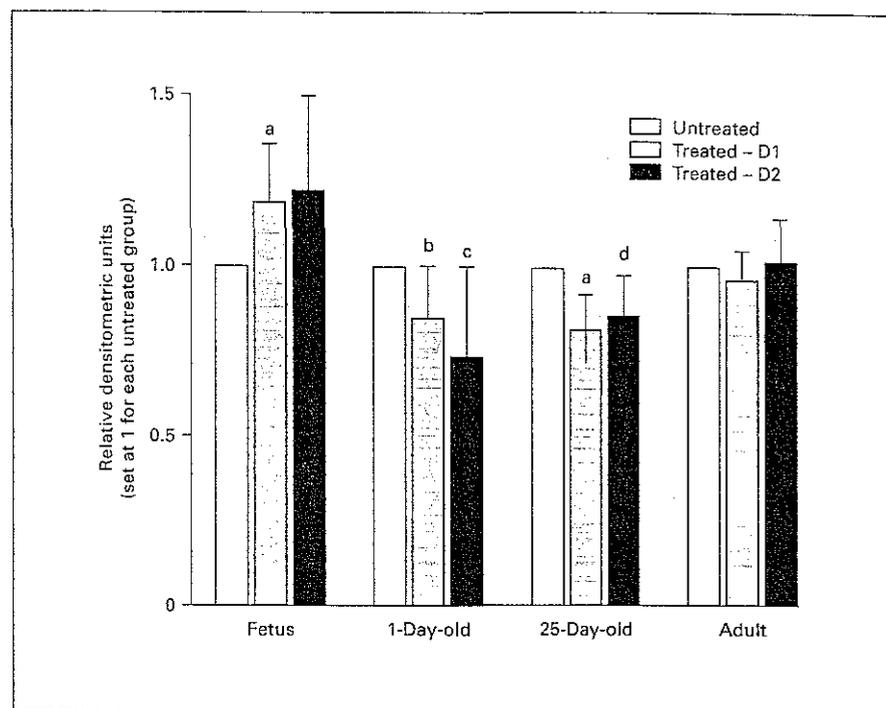
Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2002 S. Karger AG, Basel  
0006-3126/02/0822-0142\$18.50/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/journals/bon](http://www.karger.com/journals/bon)

Dr. M.J. Boutroy  
Maternité Régionale Universitaire  
rue de Dr Heydenreich, F-54042 Nancy (France)  
Tel. +33 3 83343645, Fax +33 3 83344411  
E-Mail [mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr](mailto:mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr)

**Fig. 1.** Dopamine D1 receptor (DA D1-R) and dopamine D2 receptor (DA D2-R) mRNA expression levels in the striatum of developing rabbits after antenatal betamethasone therapy. Data are displayed as histogram describing the ratios treated group/untreated groups. The untreated groups were set at 1 (white bar) for each age. The ratio of mRNA expression level is given as mean  $\pm$  SD for dopamine D1 receptor (D1) in the treated group (gray bar) and for dopamine D2 receptor (D2) in the treated group (black bar) at the different ages studied. Dopamine D1-R mRNA expression levels are higher in treated than in untreated fetuses. Dopamine D1- and D2-R mRNA levels are lower in antenatally treated than in untreated 1- and 25-day-old pups. Statistically significant changes: <sup>a</sup>  $p = 0.007$ ; <sup>b</sup>  $p = 0.037$ ; <sup>c</sup>  $p = 0.041$ ; <sup>d</sup>  $p = 0.044$ .



## Animals and Methods

New Zealand white pregnant rabbits were given either 0.1 mg/kg betamethasone or 0.1 ml/kg saline 0.9% at days 25 and 26 of gestation for fetal analysis and days 27 and 28 for the postnatal analysis. The spontaneous delivery took place on 30 or 31 days of gestation. The study was performed on fetuses (delivered by cesarean section at 27 days of gestation), 1-day-old, 25-day-old and adult (6-month-old) rabbits. After anesthesia, fetuses and pups were decapitated, adults were sacrificed with a supplementary dose of anesthesia. The striata were quickly removed, immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. They were pooled by age into 8 pools according to the maternal treatment: treated groups (born to mothers given betamethasone), fetuses ( $n = 12$ ), 1-day-old ( $n = 12$ ), 25-day-old ( $n = 4$ ), adults ( $n = 3$ ) and untreated groups (born to mothers given saline), fetuses ( $n = 11$ ), 1-day-old ( $n = 15$ ), 25-day-old ( $n = 5$ ), adults ( $n = 2$ ).

Total RNA was extracted from each pool using the Rneasy Qia-gen kits (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitation of the purified RNA was performed by UV spectrophotometry, by staining with ethidium bromide and by hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled 18S probe. Detection of each DA D1- and D2-R mRNA was carried out using Northern blot analysis as previously described [6]. This analysis used 5  $\mu\text{g}$  of total RNA and was repeated 6 times for each adrenal pool. The preparation of labeled probe to detect the D1- and D2-R mRNA was as previously described [7, 8].

After a first hybridization and washing with DA D1-R probe, the membranes were exposed to a BAS 1000 phosphor-imager plate for 24 h, then exposed to a Kodak X-OMAT AR film at  $-80^{\circ}\text{C}$  with an intensifying screen for 7 days. The second stage of the work consisted of a second hybridization and washing according to the same proce-

dures but using DA D2-R probe. Membranes were again exposed for 18 h to a phosphor-imager plate, then for 4 days to a radiographic film. This procedure allowed assessing the relative mRNA modulation by antenatal treatment with corticosteroids of DA D1-R and DA D2-R using the same membrane issued from one Northern blot analysis. Afterwards, an 18S rRNA-labeled probe was used to confirm equal loading and transfer. Abundance of DA D1-R, DA D2-R mRNA and 18S rRNA was expressed in pixel intensities per  $\text{mm}^2$  as after subtracting background count for each membrane (MacBAS V2.5 Software, Fuji Photo Filter Co.).

Data were expressed as a ratio to the level of the untreated rabbits set at 1 for each age and analyzed using two-way ANOVA. Post-hoc testing was done by *t* test. Statistical significance is defined as  $p < 0.05$ . Results are given as mean  $\pm$  SD.

## Results

Dopamine D1-R mRNA expression level was significantly higher ( $p = 0.007$ ) in the treated fetuses ( $1.19 \pm 0.13$ ) than in the untreated fetuses set at 1 (fig. 1). After birth, the expression levels were significantly lower in 1-day-old ( $0.85 \pm 0.17$ ) and 25-day-old ( $0.83 \pm 0.06$ ) treated groups compared with the untreated groups ( $p = 0.037$  and  $0.007$  respectively). This difference was not found in adults ( $0.97 \pm 0.10$ ). DA D2-R mRNA showed a similar pattern of modulation after birth but not in the fetuses. In the 1- and 25-day-old treated groups, its expres-

sion level was decreased to  $0.74 \pm 0.31$  ( $p = 0.041$ ) and  $0.86 \pm 0.10$  ( $p = 0.044$ ) compared with the untreated group. In the treated adults, its level was in the same range ( $1.02 \pm 0.17$ ) as in the untreated group.

## Discussion

The present study provides evidence that an antenatal treatment with corticosteroids, using only 0.1 mg/kg/day for 48 h, is a powerful and long-lasting pharmacological stimulus for DA R transcripts in the rabbit striatum. It induced an early increase in the fetuses for both striatal DA D1- and D2-R transcripts followed by a postnatal reduction when compared with the levels observed in the untreated pups. In the fetuses, the mRNA expression of both receptors is increased of about 20% in the treated group within 24 h after the last injection. After birth, this up-regulation is followed by a down-modulation. On the first day of life, i.e. 2 or 3 days after the last injection to the mother, mRNA level is decreased in neonates by about 15% for DA D1-R and 25% for DA D2-R. This decrease appears to be sustained up to 25 days of life. One may question about its clinical significance. Dopaminergic regulation plays multiple and sometimes antagonist roles in neuronal development. Dopamine D1-R inhibits neurite outgrowth in retinal neurons [9], DA D2-R stimulates neurite outgrowth in cortical and mesencephalic neurons [4]. Striatal DA D1 and DA D2 receptor mRNAs are expressed early in the fetal life. Their expression levels

increase progressively in the postnatal life, as do the receptors themselves, to reach their highest level at about 30 postnatal days in rat [4, 10]. In rabbit, the highest level of striatal DA D2-R mRNA was found at 25 postnatal days compared to 1- and 10-day-old pups and adults [8]. These dopamine receptors are involved in the maturation of the main brain neurophysiological functions as motor activity. Dopamine D1- and D2-R mRNAs are precursors for dopamine receptor synthesis. However, it is not known whether an increase or a decrease in DA D1 and D2 receptors will follow the observed increase or decrease in their related mRNA and whether the changes in dopaminergic material might have clinical concerns for neuro-motor acquisitions during development.

In conclusion, we have shown in the developing rabbit that antenatal betamethasone treatment alters maturation of dopaminergic receptors, which may have adverse consequences on brain growth and function. If similar effects occur in humans, it may be prudent to exercise caution when using antenatal corticosteroid treatment.

## Acknowledgments

To Prof. E.W. Khandjian (Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire, Centre de Recherche SFA, Université Laval, Québec) for helpful scientific discussion. Jean-Marc Labaune was a recipient of Research Grants from the French Society of Perinatal Medicine and Association de Recherche en Biologie et Médecine du Développement Humain.

## References

- 1 NIH Consensus Development Conference Statement: The effects of antenatal steroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH consensus statement online. *JAMA* 1995;273:413-418.
- 2 Slotkin TA, Lappi EC, McCook EC, Tayeb MI, Eylers JP, Seidler FJ: Glucocorticoids and the development of neuronal function: Effects of prenatal dexamethasone exposure on central noradrenergic activity. *Biol Neonate* 1992;61:326-336.
- 3 Matthews SG: Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res* 2000;47:291-300.
- 4 Jung AB, Bennett JP Jr: Development of striatal dopaminergic function. I. Pre- and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D<sub>1</sub> (D<sub>1A</sub>) and D<sub>2</sub> (D<sub>2A</sub>) receptors. *Dev Brain Res* 1996;94:109-120.
- 5 Labaune JM, Boutroy MJ, Bairam A: Expression du récepteur dopaminergique D<sub>1</sub> dans la surrénale de lapin en développement: ontogenèse et effet d'une corticothérapie anténatale; in Collet M, Treisser A (eds): *Médecine Périnatale*. Paris, Arnette, 1999, pp 35-38.
- 6 Khandjian E.W: UV cross-linking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Mol Biol Rep* 1986;11:107-115.
- 7 Bairam A, Frenette J, Dauphin C, Carroll JL, Khandjian EW: Expression of dopamine D<sub>1</sub>-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. *Neurosci Res* 1998;31:147-154.
- 8 Bairam A, Dauphin C, Rousseau F, Khandjian EW: Expression of dopamine D<sub>2</sub>-Receptor mRNA isoforms at the peripheral chemoreflex afferent pathway in developing rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:374-381.
- 9 Landford KL, DeMello FG, Klein WL: D<sub>1</sub>-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retinal neurons: Evidence that neurotransmitters act as morphogenetic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2839-2843.
- 10 Xu S, Monsma FJ Jr, Sibley DR, Creese I: Regulation of D<sub>1A</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor mRNA during ontogenesis, lesion and chronic antagonist treatment. *Life Sci* 1992;50:383-396.

## **IV. Effet d'une Exposition Anténatale à la Bétaméthasone sur l'Expression de l'ARN messager du Récepteur Dopaminergique périphérique D1.**

### **1. Hypothèse et but du travail**

La glande surrénale joue un rôle primordial lors de la naissance. Elle assure une réponse adaptée de l'organisme à la nécessaire préparation à la vie extra-utérine et au stress périnatal qui entoure la naissance (Lagercrantz 1984, Slotkin 1988). La libération des produits surrénaliens corticoïdes et catécholaminergiques permet de contrôler ces événements. Mais, la maturation fonctionnelle de l'innervation splanchnique, qui est impliquée, entre-autre, dans la commande de l'exocytose des catécholamines, n'est pas complètement achevée lors de cette naissance dans l'espèce humaine, comme chez le lapin (Lagercrantz 1986). Elle ne le sera que plusieurs jours plus tard.

Durant toute cette période (qui englobe la vie fœtale et le début de la vie postnatale), le contrôle de l'activité de la glande surrénale emprunte donc des voies non neurogéniques (Slotkin 1988). Les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont retrouvés au niveau périphérique, et, en particulier, leur présence a été démontrée au sein de la glande surrénale (Artéléjo 1990, Barili 1996, Amenta 1994). La libération concomitante de dopamine avec la noradrénaline et l'adrénaline par la surrénale laisse suspecter que les récepteurs dopaminergiques surrénaliens sont stimulés lors de ses phénomènes sécrétoires. Or, il est connu que le R DA D1 favorise la libération des catécholamines, alors que le R-DA D2 l'inhibe (Missale 1998). Leur rôle serait alors capital dans la régulation de la fonction surrénalienne pendant la période de contrôle non neurogénique.

De plus, au même titre que le Système Nerveux Central, la glande surrénale est un organe cible de l'action des corticoïdes (Liggins 1976). Ainsi, les effets de l'exposition anténatale de la surrénale à des corticoïdes exogènes ont été évalués. Ils apparaissent divers : à un niveau macroscopique, il a été montré qu'une dose anténatale de dexaméthasone entraînait une atrophie de la glande (Hristic 1995). Cependant, à un niveau ultra structural, une faible dose de dexaméthasone augmentait le contenu catécholaminergique surrénalien (Moftaqir-Handaj 1999).

Nous avons donc souhaité analyser l'effet que pouvait engendrer une corticothérapie anténatale sur l'expression des récepteurs dopaminergiques de la glande surrénale ; puisque, au niveau central, une modulation cortico-dépendante existe. Nous avons concentré notre travail sur le R DA D1 dans la mesure où l'ontogenèse de son expression n'est pas encore connue dans la glande surrénale de lapin. De plus, le R DA D1 demeure peu étudié dans cet organe. La première étape de l'étude a donc consisté à mettre en évidence cette ontogenèse en la comparant à celle du R DA D1 dans le striatum. Puis, dans un second temps, l'effet pharmacologique d'une corticothérapie anténatale était évalué.

## **2. Travail réalisé**

Ce travail a comporté 2 sections :

### **2.1 L'ontogenèse**

#### ***2.1.1 But du travail***

En raison de l'absence de données exploitables dans la littérature scientifique concernant la présence du R DA D1 dans la surrénale de lapin au cours du développement, l'objectif premier du travail était de démontrer que ce récepteur était

exprimé en périphérie par la surrénale de cette espèce animale de la période fœtale à l'âge adulte.

### ***2.1.2 Etapes du travail***

A l'aide des outils de biologie moléculaire développés pour les récepteurs dopaminergiques centraux, nous avons étudié 4 âges différents du développement. Nous avons retenu comme organe de référence, le striatum, car c'est un organe riche en R DA D1 et dont l'ontogenèse est tout à fait connue (Xu 1992). Il exprime précocement ce récepteur, bien avant la naissance. De plus, les sondes spécifiques en notre possession mettaient en évidence aisément les transcrits centraux du R DA D1. Ainsi, à chaque âge étudié, une comparaison entre les 2 organes est possible. L'analyse a porté sur les fœtus de 27 jours de gestation (2 portées distinctes avec un total de 11 sujets), les nouveau-nés de 1 jour (2 portées et 7 sujets), les jeunes de 25 jours (2 portées et 4 sujets) et les adultes de 6 mois environ (2 portées et 2 sujets).

### ***2.1.3 Méthodes***

Les prélèvements des striata et des surrénales étaient effectués dans le même temps sur les mêmes animaux. Le mode anesthésique et la manière de sacrifice étaient identiques aux techniques décrites précédemment. Le repérage et le recueil chirurgical du striatum se sont faits de façon comparable au premier travail réalisé. Pour les glandes surrénales du lapin, elles étaient aisément mises en évidence après laparotomie, puisqu'elles sont indépendantes du rein et parfaitement pédiculées derrière le péritoine, de part et d'autre de l'aorte abdominale. Elles apparaissent

comme une formation ovoïde de couleur blanchâtre. Après extraction, les deux tissus étaient rapidement placés à  $- 80^{\circ} \text{C}$  pour conservation. L'ensemble des organes prélevés était poolé par tissu et par âge.

L'extraction d'ARN, la fabrication de la sonde spécifique du R DA D1 radio-active marquée au  $\text{P}^{32}$  et l'analyse par Northern Blot se sont déroulées de manière strictement similaire aux méthodes employées depuis le début de nos expérimentations. Cependant, l'exposition sur phosphorimage des membranes contenant l'ARN surrénalien demandait un temps supérieur que l'on a fixé à 36 heures afin d'obtenir des images exploitables. De même, l'exposition sur film radiographique était maintenue 7 jours. Un temps d'exposition de 18 heures et 4 jours était suffisant pour l'ARN striatal. Et après hybridation au 18S, 10 et 70 minutes étaient nécessaires.

## **2.2 Effet pharmacologique**

### ***2.2.1 But du travail***

La glande surrénale est un organe cible de l'action des corticoïdes. C'est la raison pour laquelle notre objectif a été de préciser l'effet éventuel d'un traitement anténatal par la bétaméthasone sur le niveau d'expression du récepteur dopaminergique D1 dans la glande surrénale du lapin à 4 âges différents du développement.

### ***2.2.2 Etapes du travail***

Lors de l'expérimentation concernant l'étude sur le striatum, les surrénales ont été prélevées dans le même temps. Le protocole thérapeutique appliqué donc pour l'étude surrénalienne est identique à celui décrit plus haut (cf. paragraphe

III.3.2 / section expérimentale). La constitution des groupes témoins et des groupes traités est similaire.

### **2.2.3 Méthodes**

Sur le plan méthodologique, nous avons suivi la procédure développée au cours des premières expériences.

## **3. Principaux résultats**

### **3.1 Ontogenèse**

Chez le lapin, dès la fin de la période fœtale, une expression de l'ARN messenger du récepteur dopaminergique D1 est mise en évidence dans la surrénale. Cette expression est présente tout au long du développement puisque cet ARN messenger est aussi bien retrouvé chez le nouveau-né de 1 jour, que chez le jeune de 25 jours ou l'adulte. Cependant, lorsque l'on compare cette expression périphérique à l'expression centrale du R DA D1 dans le striatum, nous retenons que l'évolution au cours du développement est différente. En effet, nous mettons en évidence (comme cela a déjà été décrit par plusieurs auteurs [Weiner 1991, Xu 1992, Brana 1997]) une modulation âge-dépendante de l'expression de l'ARN messenger du R DA D1 dans le striatum. *A contrario*, il n'est pas montré cette même modulation dans la surrénale, puisque l'expression de l'ARN messenger du R DA D1 demeure équivalente quel que soit l'âge étudié.

### 3.2 Effet de la bétaméthasone

La bétaméthasone reçue en anténatal a induit une augmentation significative de l'expression du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale. Cet effet est précoce puisqu'il est vu dès le stade fœtal ; 24 heures après la fin du protocole thérapeutique. Mais cet effet s'estompe progressivement au cours du développement. A l'âge adulte, les expressions dans le groupe témoin et le groupe traité sont redevenues équivalentes. Ce qui souligne le caractère transitoire de la modulation cortico-dépendante.

## 4. Conclusion

Cette étude a montré que la glande surrénale du lapin exprimait tôt dans le développement l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1, dès le stade fœtal et donc bien avant le contrôle neurogénique de son activité. Elle a permis également de mettre en évidence, que contrairement au striatum, la glande surrénale ne présentait pas une modulation âge-dépendante de cette expression. Comme si ce système dopaminergique périphérique n'était pas sujet à maturation au cours du développement.

Le second volet de cette étude a mis en évidence qu'une exposition anténatale à la bétaméthasone dans des conditions proches de celles de la pratique clinique, induit une augmentation de l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1 de la surrénale, précoce, se prolongeant mais, en fin de compte transitoire. Cet effet révélé semble bien se manifester comme un *effet printing*. Son caractère réversible pose la question du retentissement clinique potentiel. Tout en

sachant que ce travail ne permet pas d'évaluer la densité du récepteur mais seulement son expression qui n'est pas obligatoirement suivie de synthèse.

**5. Publication :** Article 2 (cf. page suivante)

**BETAMETHASONE AFFECTS THE EXPRESSION OF**

**DOPAMINE D1-RECEPTOR mRNA**

**IN THE DEVELOPING RABBIT ADRENAL GLAND**

**JEAN-MARC LABAUNE<sup>2</sup>, MD, MARIE-JEANNE BOUTROY<sup>1</sup>, MD, PhD,**

**AIDA BAIRAM<sup>2</sup>, MD, PhD.**

1. Adaptation Néonatale et Développement. J E 2164 – Université Henri Poincaré - Nancy 1. Maternité Régionale Universitaire, 54042 NANCY, France.
2. Unité de Recherche en Périnatalogie, Centre de Recherche HSA, Université Laval, QUÉBEC, G1L 3L5, Canada.

Correspondance and reprint requests should be addressed to:

Dr M.J. BOUTROY, Maternité Régionale Universitaire, 10, rue du Dr Heydenreich, 54042 Nancy Cedex , France.

Tel: +33-3.83.34.36.45; Fax: +33-3.83.34.44.11; e-mail: [mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr](mailto:mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr)

*Work supported* in part by grants from Société française de Médecine Périnatale et Association de Recherche pour le Développement humain.

## ABSTRACT

Antenatal corticotherapy is widely used in order to enhance pulmonary fetal maturation in case of threatened premature birth. The adrenal gland, which plays a key role in controlling fetal and neonatal adaptation, appears to be a target organ of glucocorticoids. We used a rabbit model to determine the effect of an antenatal corticoid treatment on the expression level of dopamine D1 receptor (DA D1-R) mRNA expression in adrenal gland during development. Pregnant rabbits were given 2 injections of either 0.1mg/kg betamethasone or 0.1 ml/kg saline. DA D1-R mRNA expression was determined at 4 developmental ages: fetus (27 days of gestation), 1-day old, 25-day old and adult. Rabbits were allocated to their respective groups (treated or untreated) according to the maternal treatment (betamethasone or saline respectively). Using Northern blot analysis, we have shown first that DA D1-R mRNA was expressed in rabbit adrenals from the fetal period to adulthood and this expression was not age-dependent. Moreover, antenatal corticotherapy induced a significant increase in DA D1-R mRNA levels of 20%, 15% and 8% in fetuses, 1-day old and 25-day old rabbits compared to the untreated groups ( $p = 0.003$ ,  $0.037$  and  $0.007$  respectively). This increase was not observed in adulthood. These findings suggest that an antenatal treatment with corticoids induced an over-expression of DA D1-R mRNA levels in the rabbit adrenal gland, over-expression sustained like a printing effect but disappearing at long term.

**Key words:** Dopamine receptor D1, antenatal corticotherapy, development, adrenal gland.

**Abbreviations:** DA D1-R: dopamine D1 receptor

An active pharmaco-therapeutic management of the fetus has been developed during the last two decades in the aim to enhance the maturation of the fetal immature physiologic functions when the risk of premature delivery was suspected. For instance using antenatal corticotherapy to accelerate the fetal pulmonary maturation became widespread<sup>1</sup> with a beneficial effect on pulmonary morbidity<sup>2,3</sup>. Although safety is usually admitted<sup>4</sup>, it remains to be verified in corticoid natural targets like the adrenal gland.

Adrenal gland plays an essential role at birth in controlling the adaptive response to the perinatal stress and to the switchover between intra- and extra-uterine life mainly by the way of catecholamine release. The cellular machinery for secretion is present in adrenal gland early in gestation. Maturation of the catecholamine biosynthesis pathway is tightly dependent on endogenous cortisol<sup>5, 6</sup>. However the functional maturity of splanchnic innervation controlling catecholamine exocytosis is not completely achieved at birth in many species including man<sup>6</sup>. The phenomena of local regulation of the adrenal endocrine response are of vital importance toward the term of gestation and later in the first weeks of life.

The effects of exposure to exogenous corticoids on the adrenal gland have been diversely evaluated. In animals several studies have shown contradictory data. A single dose of dexamethasone induced a severe adrenal atrophy and decreased the birth weight in rat pups<sup>7</sup>. This significant reduction in the fetal weight has been also observed in rabbit so that a reduction in the weight of placenta, fetal brain, lungs and liver.<sup>8</sup> No information was given about adrenal growth. Other authors have shown an increase of adrenal catecholamine content in the newborn rabbit after 0.01 mg/kg dexamethasone injection considered as a very low dose.<sup>9</sup> The catecholamine biosynthesis cascade might have been stimulated by induction of enzymatic activity by corticoids as it is the case for tyrosine-hydroxylase key enzyme for catecholamine synthesis and rate limiting for this synthesis.<sup>9</sup>

In human beings, severe side effects of antenatal corticoid exposure have not been observed on fetal growth. A transient suppression of adreno-cortical activity may be observed without suppression of "stress of birth"-induced activation<sup>10</sup>. However in preterm infants, the birth-related increase in plasma catecholamine levels seems less pronounced in treated than in non-treated infants<sup>11</sup>. On the opposite, a case of cushingoid syndrome has been described when the corticotherapy was repeated seven times until delivery at 34.5 weeks post-conception age<sup>12</sup>.

Dopamine is one of the three catecholamines synthesized and released by the adrenal gland. It was first known as a neurotransmitter at central and peripheral levels but also as a regulating factor at the adrenal level. This regulating action is mediated by activation of specific receptors<sup>13</sup> among which dopamine D1 receptor (DA D1-R), found in adrenal medulla<sup>14-17</sup> and in cortex<sup>18,19</sup> in different animal species. However, its presence remains uncertain for some authors<sup>20-22</sup>.

Therefore, we focused on DA D1-R and we tried to indirectly test its presence in the adrenal gland by analyzing its mRNA. Taking rabbit as a model, this study determined first the ontogenesis profile of DA D1-R mRNA as it has never been described in the adrenal gland in rabbit. Then, the effects of the antenatal exposure to exogenous corticoids on adrenal DA D1-R mRNA expression levels were studied.

## METHODS

**Animals.** New Zealand white rabbits, obtained from our local breeding, were used. Experimental procedures were performed according to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and approved by the local Animal Care Ethical Committee.

**Protocols.** The ontogenic changes in DA D1-R mRNA expression were investigated in adrenal gland and striatum at the following ages: fetuses (n = 11), 1-day old (n = 7), 25-day

old pups (n = 4) and adults (n = 2). Fetuses were delivered by cesarean section at 27 days of gestation. Spontaneous delivery took place at 30 or 31 days of gestation. The striatum was used as a positive control for validation of our analysis technique for Northern Blot, since this organ contains high levels of DA D1-R mRNA<sup>23</sup>. The effect of an antenatal exposure to corticoids on the expression level of DA D1-R mRNA in adrenals was investigated in two groups of pregnant rabbits given either 0.1 mg/kg betamethasone (n = 6) or 0.1 ml/kg saline 0.9 % (n = 6) at days 25 and 26 of gestation for the fetal analysis and at days 27 and 28 of gestation for the postnatal analysis. Litters were reared in our animals house and allocated to their respective group (treated or untreated) according to the maternal treatment: treated groups (born to mothers given betamethasone), fetuses (n=12), 1-day old (n=12), 25-day old (n=4), adults (n=3) and untreated groups (born to mothers given saline), fetuses (n=12), 1-day old (n=15), 25-day old (n=5), adults (n=3). The number of adults was reduced according to recommendations of the Ethical Committee, as the size of the adrenals was sufficient to perform the analytical procedures with a minimal risk of error, and as Northern Blot data were obtained from 6 experiments with total RNA from 2 independent extractions for each animal.

**Organ collections.** Pregnant rabbits were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) injected intramuscularly, fetuses were removed by cesarean section and decapitated immediately. Pups and adults were sacrificed with a lethal dose of anesthesia. The adrenals and the striatum of each animal were quickly removed, immediately frozen on dry ice, and stored at - 80°C for subsequent analysis.

**RNA studies.** Total RNA was extracted from frozen organs using the Rneasy Qiagen kits (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitation of the purified RNA was made by UV spectrophotometry (absorbency at 260 nm), by staining with ethidium bromide after 1%

agarose gel migration and comparing with known quantities of standard 28S and 18S ribosomal RNA (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

The probe preparation for rabbit DA D1-R was similar to that described previously<sup>24</sup>. Briefly, we first generated a fragment using as template rabbit cDNA. This fragment was amplified by PCR using as primers nucleotides 151-175 and 738-761 as described<sup>24</sup>. The PCR reaction was purified on a 1 % agarose gel, and the band at approximately 600 BP was excised from the gel, the DNA extracted using the Prep-A-Gene kit (BioRad, Richmond, CA, USA), <sup>32</sup>P-labeled by random priming<sup>25</sup> and used at approximately 1x10<sup>6</sup> cpm/ml of hybridization solution.

Northern blot analysis was performed essentially as previously described<sup>26</sup> using 5µg of total RNA. After hybridization and washing of the membranes, these were exposed to a BAS 1000 phosphorimager plate (Fuji Medical Systems USA, Stamford, CT) for 36 h and then exposed to Kodak X-OMAT AR film at ~ 80 °C with an intensifying screen for 7 days.

**mRNA studies.** Northern blots were done 6 times with total RNA obtained from 2 independent extraction. The tissue samples were analyzed together on a single DA D1-R mRNA Northern blot hybridization. Afterwards, an 18S rRNA hybridization was used on the same membranes to confirm equal loading and transfer of RNA. The relative abundance of the DA D1-R mRNA during development was determined for each age by the evaluation of the phosphorimage signal intensity using Mac BAS V2.5 software. Abundance of DA D1-R mRNA and 18S rRNA was expressed in pixel intensities per mm<sup>2</sup> (psi/mm<sup>2</sup>) as after subtracting background count for each membrane and DA D1-R <sup>32</sup>P counts were normalized by the 18S rRNA net count. We used the same procedure with adrenal samples for assessment of relative mRNA modulation by antenatal corticotherapy

**Statistical analysis.** Data are presented as means ± SD. Changes in DA D1-R mRNA were given as a ratio to the fetuses for ontogenesis data and to the untreated animals for the

corticotherapy data. The expression level has been arbitrary set at 1 for the reference groups (fetus and untreated). Differences in DA D1-R mRNA abundance were compared using two-way ANOVA followed Fisher's post hoc test or Student's *t*-test as appropriate (Statview, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) with a significance level at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**DA D1-R transcripts during development.** Visual examination of the autoradiographic films revealed that low levels of DA D1-R mRNA were already detected in the fetus in both the adrenal gland and the striatum. The levels were increasing from the fetal to the adult stage only in the striatum (Figure 1A). Densitometric analysis performed on phosphorimager signals (Figure 1B) showed a 1.2 fold increase in DA D1-R transcripts levels from day 1 after birth to the adult stage, reaching the highest increase at day 25 (2.1 fold). Mean values were significantly higher in 1-day old, 25-day old and adults than in fetuses ( $p < 0.01$ , 0.001, 0.001 respectively). By contrast, in the adrenal gland, DA D1-R mRNA did not show any major change (Figure 1A et B). These patterns of expression suggest that expression of DA D1-R mRNA level is age-modulated in the striatum but not in the adrenal gland.

**DA D1-R transcripts after antenatal corticotherapy.** Visual examination of the autoradiographic films of adrenal samples showed higher levels in treated fetuses and 1-day old animals (Figure 2A). Densitometric analysis performed on phosphorimager signals showed that mean values of adrenal mRNA levels were statistically significantly higher in treated fetuses, 1-day and 25-day old rabbits than in untreated rabbits ( $p < 0.003$ , 0.003, 0.005 respectively). The increase was 1.20 fold in fetuses, 1.15 fold in 1-day old rabbits and 1.08 fold in 25-day old rabbits. No difference was found between treated and untreated adults (Figure 2B). These data exhibit an up-regulation of DA D1-R mRNA in the adrenal gland following antenatal exposure to betamethasone.

## DISCUSSION

Using Northern blot analyzes, our data show that the presence of DA D1-R mRNA is expressed in the rabbit adrenal from the fetal stage to adulthood and that its expression level may be affected by antenatal corticotherapy. To-date the expression of DA D1-R mRNA in the adrenal gland has not yet been described in rabbit.

Dopamine D1-R is localized to brain and to peripheral tissues as blood vessels, postganglionic sympathetic nerve terminals and adrenal gland. In the brain, it is expressed at higher levels than any other catecholamine receptor<sup>27, 28</sup> and its functional role has been extensively reviewed<sup>29, 30</sup>. Alternatively, only a first step has been get over in the knowledge of its physiological interest in the adrenals. The adrenals are responsible for an intranatal catecholamine surge long since described<sup>6</sup>. Dopamine D1-R seems to be the basis of a positive feedback for catecholamine release. Its stimulation in bovine chromaffin cells facilitates  $Ca^{2+}$  channel currents by involving adenylate cyclase and protein kinase A<sup>17</sup>. This increase in  $Ca^{2+}$  currents stimulates the rapid catecholamine secretion in response to stress<sup>17</sup>. The loop is therefore closed: plasma dopamine, coreleased from the adrenals with other catecholamines, stimulates DA D1-R --> adenylate cyclase --> protein kinase A --> facilitation of  $Ca^{2+}$  channels in adrenal chromaffin cells --> catecholamine release in plasma<sup>31</sup>. Circulating chemical signals like hypoxemia or hypoglycemia can also request directly adrenal catecholamine receptor and namely dopamine receptors until sympathetic innervation reaches complete maturity, several days and even weeks after birth<sup>32, 33</sup>.

One must underline the difference in developmental patterns observed in striatum and adrenal gland. In striatum, DA-R mRNA expression increases from birth to 25-day stage where it is at its highest level measured in this study. These changes are consistent with those reported by Xu *et al* in rat striatum in which the highest levels were observed at day 30 after

birth<sup>34</sup>. This developmental pattern in striatum follows the same time-course as the central nervous system, which grows and multiplies with age. In adrenals, DA D1-R mRNA expression did not seem to be age-dependant and has been found at its highest level at birth. This may be related to the fact that sympatho-adrenal activity observed at birth is at the largest level is higher than observed under any other physiological circumstance throughout development or adult life<sup>6</sup>.

The second stage of our study has assessed the effect of a pharmacological stimulus induced by an exogenous glucocorticoid on DA D1-R mRNA expression in the developing adrenal gland. Antenatal corticotherapy induced changes in DA D1-R mRNA expression in adrenals with an early increase followed by a sustained over-modulation until 25-day of age. An opposite pattern has been described in the rabbit striatum,<sup>35</sup> in which, after a transient over-modulation in the fetus, a long-lasting under-modulation has been observed leading to suggest that the effects of antenatal exposure to betamethasone might be tissue-specific. For the adrenal gland, endogenous glucocorticoids are closely involved in growth and differentiation. During the fetal development and until the early neonatal period, the cortex projects cords into the medulla making impossible to reliably distinguish the cortex from the medulla<sup>36</sup>. The close relationship between cortical and chromaffin cells should lead to consider the medulla as the first target for the corticoids. Antenatal exposure to exogenous glucocorticoids often leads experimentally to adrenal atrophy<sup>7, 8, 37</sup> due to the necrosis of the cortical zone.<sup>7</sup> However the effects on the medulla zone are generally beneficial: enlargement of the layer and the trophicity of the cells,<sup>36</sup> increase of adrenal catecholamine content<sup>9</sup> and enhancement of the enzyme gene transcription among which tyrosine hydroxylase,<sup>38</sup> the key enzyme for dopamine synthesis. In the current study, we observed an increase in DA D1-R mRNA levels following antenatal corticoid treatment. As DA D1-R is involved in the autoregulation of the sympatho-adrenal functions linked to the postnatal adaptation, the

observation of an increase in the transcript levels might be a positive point or at least should not raise concerns for the neonate vital abilities facing perinatal difficulties. However the enhancement of transcription of gene encoding for DA D1-R mRNA is not necessarily followed by an increase in receptor density. For other catecholamine receptors like beta-adrenergic receptors, corticosteroids have significant effects on maturation<sup>39</sup> but the effects are species specific. Rabbit and rat fetuses in utero exposed to corticosteroids increase pulmonary beta-receptor density<sup>40</sup> but not in the fetal sheep<sup>41</sup>. If the increase in DA D1-R mRNA was followed by an increase in receptor density, one might speculate about a positive effect of corticotherapy. This increased receptor density should be indeed in regard to some of the main pathophysiological mechanisms in the perinatal period, namely the catecholamine surge at birth and the response to hypoxia. Recent data should respond to the question of transcription of dopamine receptor D1 and hypoxia.<sup>42</sup>

Three points have to be underscored before concluding: 1) the early feature of this up-regulation in the fetus within 24 hours after the second injection of betamethasone, 2) the very low amounts of drug used, low but comparable to those given in perinatal practice and known to be sufficient to induce pulmonary maturation, 3) the long-term enhancement of DA D1-R mRNA expression, which may be considered as a printing-like effect of the maternal treatment on the offspring. This printing has been formerly shown for glucocorticoids<sup>43</sup> as it has been also for other drugs like phenobarbital or benzodiazepines.<sup>44,45</sup>

In conclusion, we showed that DA D1-R mRNA was expressed in the rabbit adrenal gland from the fetal life. Its expression was not age-dependent but was rapidly modified by antenatal exposure to betamethasone. These corticoid-induced changes, observed until late in infancy, disappeared in adulthood.

*Acknowledgments:* the authors are grateful to Dr. E.W. Khandjian for helpful assistance in preparing Northern blot figures and for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

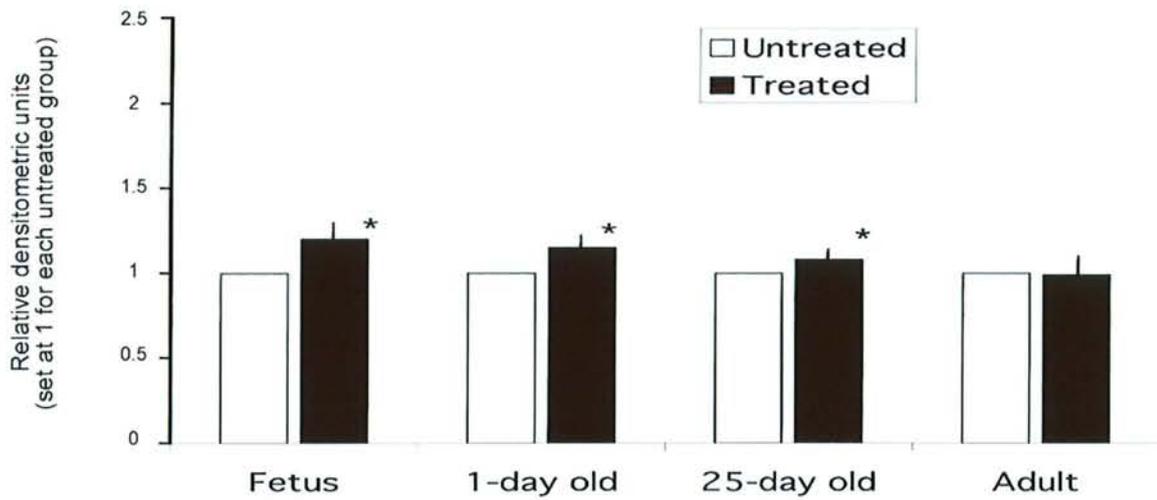
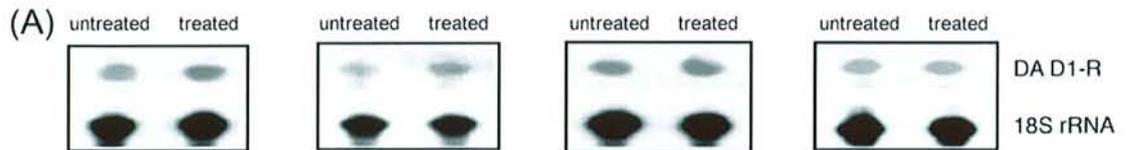
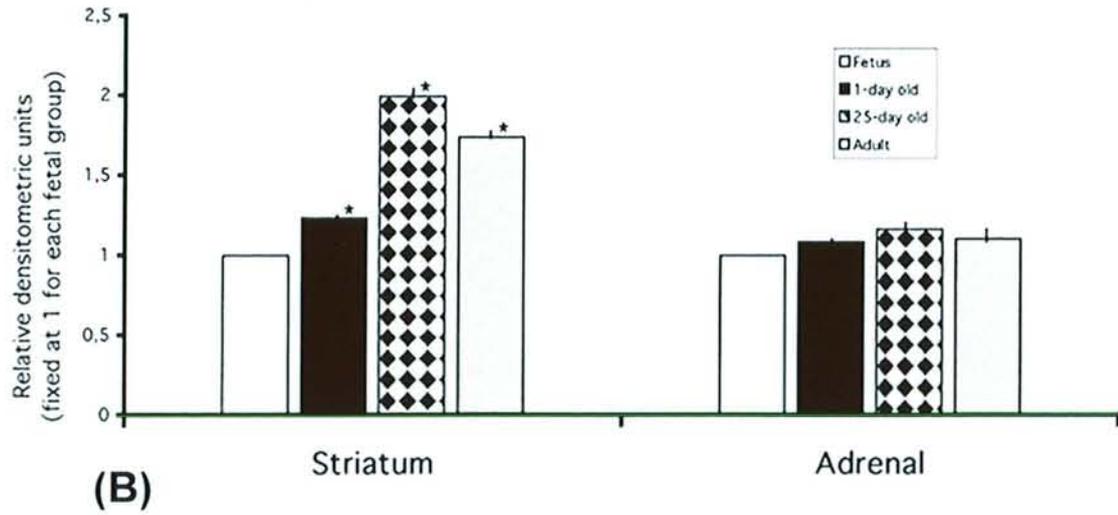
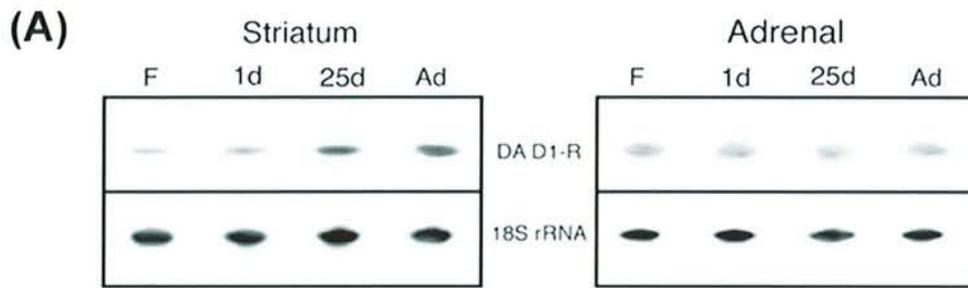
1. NIH consensus development conference statement. The effects of antenatal steroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH consensus statement online. JAMA. 1995;273:413-418.
2. Crowley PA, Chalmers I, Keirse MJNC. The effect of corticosteroid administration before preterm delivery : an overview of the evidence from controlled trial. Br J Obstet Gynecol. 1990;97:11-25.
3. Crowley PA, MRCOG, FRCPI. Antenatal corticosteroid therapy : a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. Am J Obstet Gynecol. 1995;173:322-335.
4. Ballard PL, Liggins GC, Kaplan SL, Grumbach MM. Steroid and growth hormone levels in premature infants after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. Pediatr Res. 1980;14:122-127.
5. Liggins GC. Adrenocortical-related maturational events in the fetus. Am J Obstet Gynecol. 1976;126:931-941.
6. Lagercrantz H, Slotkin TA. The "stress" of being born. Sci Am. 1986;254:100-112.
7. Hristic M, Kalafatic D, Plecas B, Jovanovic V. The effect of dexamethasone on the adrenal gland in fetal and neonatal rats. J Exp Zool. 1995;272:281-290.
8. Barrada MI, Blomquist CH, Kotts C. The effects of betamethasone on fetal development in the rabbit. Am J Obstet Gynecol. 1980;136:234-238.
9. Moftaquir-Handaj A, Jafari S, Boutroy MJ. Neonatal catecholamine content of adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue after prenatal exposure to dexamethasone. Pediatr Res. 1999;45:60-65.
10. Padbury JF, Ervin MG, Polk DH. Extrapulmonary effects of antenatally administered steroids. J Pediatr. 1996;128:167-172.

11. Kallio J, Karlsson R, Toppari J, Helminen T, Scheinin M, Kero P. Antenatal Dexamethasone treatment decreases plasma catecholamine levels in preterm infants. *Pediatr Res.* 1998;43:801-807.
12. Bradley BS, Kumar SP, Metha PN, Ezhuthachan SG. Neonatal cushingoid syndrome resulting from serial courses of antenatal betamethasone. *Obstet Gynecol.* 1994;83:869-872.
13. Brodde OE. Subclassification of peripheral dopamine receptors. *J Auton Pharmacol.* 1990;10 (Suppl 1):S5-10.
14. Bigornia L, Suozzo M, Ryan KA, Napp D, Schneider AS. Dopamine receptors on adrenal chromaffin cells modulate calcium uptake and catecholamine release. *J Neurochem.* 1988;51:999-1006.
15. Huettl P, Gerhardt GA, Browning MD, Masserano JM. Effects of dopamine receptor agonists and antagonists on catecholamine release in bovine chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257:567-574.
16. Barili P, Zaccheo D, Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the adrenal medulla. *Eur J Pharmacol.* 1996;310:129-135.
17. Artalejo CR, Ariano MA, Perlman RL, Fox AP. Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature.* 1990;348:239-242.
18. Gallo-Payet N, Chouinard L, Balestre MN, Guillon G. Dual effects of dopamine in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem Biophys Res Com.* 1990;172:1100-1108.
19. Fraser R, Connell MC, Inglis G, Kenyon CJ, Tree M. The role of dopamine in the control of corticosteroid secretion and metabolism. *J Steroid Biochem.* 1989;32:217-222.

20. Amenta F, Chiandussi L, Mancini M, Ricci A, Schena M, Veglio F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the human adrenal cortex. *Eur J Endocrinol.* 1994;131:91-96.
21. Maroto R, Lopez MG, Del Valle M, Naranjo JR, Mellström B, Garcia AG. Expression of the bovine striatal D2 receptor, but not the D1 receptor, in bovine adrenal medulla. *Mol Pharmacol.* 1995;47:40-50.
22. Albillos A, Abad F, Garcia AG. Cross-talk between M2 muscarinic and D1 dopamine receptors in the cat adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;183:1019-1024.
23. Sibley, DR. Monsma FJ Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:61-69.
24. Bairam A, Frenette J, Dauphin C, Carroll JL, Khandjian EW. Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. *Neurosci Res.* 1998;31:147-154.
25. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983;132:6-13.
26. Khandjian EW. UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Mol Biol Rep.* 1986;11:107-115.
27. Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature.* 1990;347:72-76.
28. Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:1859-1863.

29. Moody CA, Robinson SR, Spear LP, Smotherman WP. Fetal behavior and the dopamine system: activity effects of D1 and D2 receptor manipulations. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;44:843–850.
30. Yung KKL, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neurosci.* 1995;65:709–730.
31. Missale C, Nash RS, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors : from structure to function. *Physiol Review.* 1998;78:189-225.
32. Slotkin TA, Seidler FJ. Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn : secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J Dev Physiol.* 1988;10:1-16.
33. Seidler FJ, Slotkin TA. Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol.* 1985;358:1–16.
34. Xu S, Monsma FJ, Sibley DR, Creese I. Regulation of D1A and D2 dopamine receptor mRNA during ontogenesis, lesion and chronic antagonist treatment. *Life Sci.* 1992;50:383-396.
35. Labaune JM, Boutroy MJ, Bairam A. Antenatal treatment with corticosteroids affects mRNA expression of dopamine D1 and D2 receptors in the striatum of developing rabbit. *Biol Neonate.* 2002;82:142-144.
36. Monkhouse WS, Coupland RE. The effect of in vivo hydrocortisone administration on the labelling index and size of the intra- and extra-adrenal chromaffin tissue of the fetal and perinatal mouse. *J Anat.* 1985;140:679-696.
37. Johnson JW, Mitzner W, Beck JC, London WT, Sly DL, Lee PA, Khouzami VA, Cavalieri RL. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141:1053-1064.

38. Lewis EJ, Harrington CA, Chikaraishi DM. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84:3550–3554.
39. Roberts JM, Jacobs MM, Cheng JB, Barnes PJ, O'Brien AT, Ballard PJ. Fetal pulmonary beta-adrenergic receptors: characterization in the human and in vitro modulation by glucocorticoids in the rabbit. *Pediatr Pulmonol.* 1985;1:S69-79.
40. Cheng JB, Goldfien A, Ballard PL, Roberts JM. Glucocorticoids increase pulmonary beta-adrenergic receptors in fetal rabbit. *Endocrinology.* 1980;107:1646-1648.
41. Mano K, Akbarzadeh A, Townley RG. Effects of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. *Life Sci.* 1979;25:1925-1930.
42. Takahashi LK. Prenatal stress : consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:199-207.
43. Lobaune JM, Boutroy MJ, Bairam A. Age-related modulation of dopamine D1 receptor mRNA level by hypoxia in rabbit adrenal gland. *Biol Neonate.* 2002;in press.
44. Gupta C, Yaffe S J. Reproductive dysfunction in female offspring after prenatal exposure to phenobarbital: critical period of action. *Pediatr Res.* 1981;15:1488–1491.
45. Bignami G, Alleva E, Chiarotti F, Laviola G. Selective changes in mouse behavioral development after prenatal benzodiazepine exposure: a progress report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1992;16:587–604.



**(B)**

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dopamine D1-receptor (DA D1-R) mRNA expression in adrenal gland and striatum. (A) Representative Northern blot of DA D1-R showing an age-dependent modulation in striatum but not in adrenal gland. (B) Relative phosphorimager densitometric mean values ( $\pm$  SD) increased significantly in striatum, but not in adrenal gland, from the fetus (F) to the adult (Ad); (1-day old: 1d; 25-day old: 25d); significance: \*  $p < 0.05$ .

Figure 2. DA D1-R mRNA expression in adrenal gland after antenatal corticotherapy. (A) Representative Northern blot of DA D1-R showing an over-modulation in the treated fetuses and 1-day old rabbits versus the untreated rabbits. (B) Relative phosphorimager densitometric mean values ( $\pm$  SD) were significantly higher in the treated group than in the untreated group in fetus, 1-day and 25-day old, but not in adult; (fetus: F; 1-day old: 1d; 25-day old: 25d; adult: A); significance: \*  $p < 0.05$ .

**Pour la thèse de Jean-Marc LABAUNE,**

**Il n'y a pas de page 18-21.**

**Table 1: Relative ratio of DA D1-R mRNA expression level  
in developing rabbits as compared to 27-day fetal group**

	STRIATUM			ADRENAL		
	1d	25d	Ad	1d	25d	Ad
<i>Mean</i>	1.23	1.99	1.74	1.08	1.16	1.10
<i>SEM</i>	0.05	0.09	0.06	0.03	0.02	0.07
<i>p</i>	0.017	< 0.0001	< 0.0001	0.309	0.056	0.213

**Table 1:** For each tissue, it expresses the ratio in reference to DA D1-R transcripts level in the fetus adrenals or striatum which was arbitrary fixed at 1. Values are presented for 1-day old groups (1d), 25-day old groups (25d) and adult groups (Ad) as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was done by *t* test and statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

**Table 2: Relative ratio of DA D1-R mRNA expression level  
after an antenatally corticotherapy in adrenal glands of developing rabbits  
as compared to an untreated group**

	<b>F</b>	<b>1d</b>	<b>25d</b>	<b>Ad</b>
<i>Mean</i>	1.20	1.15	1.08	0.99
<i>SEM</i>	0.03	0.02	0.01	0.04
<i>p</i>	0.003	0.003	0.005	0.799

**Table 2:** The antenatally treated group received 0.1mg/kg betamethasone, and the untreated group 0.1ml/kg 0.9% saline for 2 days. These results are expressed in reference to DA D1-R transcripts level in the untreated group (arbitrary fixed at 1) for each studied age. Values are presented for 27-day fetuses group (F), 1-day old group (1d), 25-day old group (25d), and adult groups (Ad) as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was done by *t* test and statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## **CHAPITRE II**

### **Exposition Postnatale à l'hypoxie Et Expression du Récepteur Dopaminergique Surrénalien D1**

#### **I. Situation du sujet**

La glande surrénale est un organe fondamental des organismes vivants supérieurs. Sa spécificité d'action la place dans une position stratégique. Elle se trouve ainsi à la croisée de voies lui apportant les informations nécessaires à son fonctionnement : innervation en lien étroit avec le système nerveux central, vascularisation riche ; et qui lui permettent d'agir de façon adéquate afin d'assurer la survie de l'individu. Elle représente l'organe responsable du contrôle et de l'adaptation de l'organisme à toute situation de stress ; ou de détresse vitale (Scheuermann 1993).

C'est la raison pour laquelle elle possède la propriété de répondre à un stimulus hypoxique. Au décours d'un état de stress asphyxique, en réponse à un influx nerveux, elle libèrera une charge catécholaminergique dans la circulation générale (Seidler 1985). Mais de façon encore plus directe, les travaux de Rychkov en 1998 ont montré qu'un type de cellules retrouvé dans la médullosurrénale, les cellules chromaffines, sont elles-mêmes directement sensibles à l'hypoxie. Elles dérivent embryologiquement de la crête neurale et ont des propriétés de chémosensibilité au même titre que d'autres cellules dérivant de la même structure comme les cellules de type I du corps carotidien (Rychkov 1998).

C'est pendant le stress généré par la naissance que le rôle de ces cellules apparaît crucial. En effet, l'adaptation à la vie extra-utérine exige de la glande surrénale une réponse appropriée alors même que le contrôle neurogénique n'est pas mature (Slotkin 1988). Malgré cela, la surrénale est fonctionnelle précocement au cours de la gestation, gérant déjà les situations de stress fœtal et périnatal. Mojet, en 1997, a d'ailleurs montré qu'un stimulus hypoxique pouvait induire directement la libération catécholaminergique chez le rat nouveau-né. Cette propriété semble plus spécifique de la période périnatale puisque la même année Thompson démontrait que cette chémosensibilité à l'hypoxie disparaissait avec le développement alors que le contrôle neurogénique de la glande devenait efficient.

Les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont présents au sein de la glande surrénale dès la période fœtale (Missale 1998). Ils sont impliqués dans les phénomènes de libération catécholaminergique. Et ils sont potentiellement stimulés par leur agoniste naturel, la dopamine libérée de façon concomitante avec la noradrénaline et l'adrénaline par la surrénale. Ils semblent donc pouvoir jouer un rôle non négligeable dans la régulation de l'activité surrénalienne, en particulier lors de la phase de contrôle non neurogénique.

## **II. Définition des objectifs**

L'objectif général de cette étude est *de préciser expérimentalement les effets d'une exposition à l'hypoxie sur l'expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1 dans la glande surrénale de lapins au cours du développement postnatal.*

Le travail expérimental fera appel à plusieurs catégories d'expérimentation :

- L'analyse de 3 âges clés du développement chez le lapin (nouveau-né de 1 jour, jeunes de 25 jours, adultes de 6 mois) permet d'évaluer le facteur maturation dans les phénomènes de réponse à l'hypoxie.
- Le recours à différentes conditions d'hypoxie soumises aux animaux a pour but de pouvoir apprécier l'effet de la durée de l'hypoxie (6 heures ou 24 heures) sur la modulation induite, et aussi l'effet de l'intensité de l'hypoxie ( $F_iO_2$  à 0.08 ou 0.15).
- La constitution de groupes témoins placés dans les mêmes conditions expérimentales mais sans exposition à l'hypoxie permet de dégager uniquement le facteur *hypoxie* dans la modulation d'expression de l'ARN messager du R DA D1.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé une chambre d'hypoxie adaptée à nos conditions expérimentales. Et, le travail de biologie moléculaire, correspondant au temps d'analyse du travail, a fait appel aux techniques de Northern blot que nous avons spécifiquement développées dans la première partie de notre recherche scientifique.

### **III. Effet de l'exposition postnatale à l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm des récepteurs dopaminergiques D1 dans la glande surrénale de lapins au cours du développement.**

#### **1. Hypothèse et but du travail.**

Toute situation de stress hypoxique entraîne une réponse adaptée de l'organisme. Sous l'influence de voies nerveuses efférentes, la glande surrénale participe à la cascade biologique de ces réactions en libérant, notamment, son contenu en catécholamines (Seidler 1985). Toutefois, au début du développement, alors même que la voie nerveuse est encore immature (Slotkin 1988), elle possède la capacité d'être stimulée directement par l'hypoxie par l'intermédiaire des propriétés chémosensibles de cellules comme les cellules chromaffines de la médullosurrénale (Adams 1996). Les mécanismes non neurogéniques de contrôle régissant alors cette fonction surrénalienne, reste encore peu connu. Cependant, il semblerait que les récepteurs dopaminergiques soient impliqués dans les phénomènes de stimulation ou inhibition de la libération catécholaminergique (Missale 1998).

Nous avons pu mettre en évidence par des techniques de biologie moléculaire de type Northern Blot, la présence d'une expression de l'ARN messager du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale dès la fin de la gestation chez le lapin. Cette expression est modulable par un stimulus pharmacologique appliqué en anténatal. Notre objectif présent a donc été d'évaluer si l'application d'une hypoxie survenant dès après la naissance modulait également cette expression. Nous avons voulu aussi préciser si un même effet se manifestait à d'autres stades du développement. L'analyse

s'est donc faite chez le lapin nouveau-né, le jeune de 25 jours de vie et l'adulte âgé de 6 mois.

## **2. Travail réalisé**

### **2.1 L'hypoxie**

L'état d'hypoxie d'un organisme vivant se définit comme un état au cours duquel il est soumis à une diminution de l'apport en oxygène. Chez les êtres vivants supérieurs, il est directement la conséquence de la diminution de la teneur du sang artériel en oxygène. Plusieurs conditions peuvent provoquer cet état : une altitude élevée, une maladie pulmonaire, une malformation cardiaque, un collapsus cardiovasculaire de toute nature... Expérimentalement, plusieurs méthodes peuvent artificiellement provoquer une hypoxie chez les animaux étudiés : techniques chirurgicales de ligature de vaisseaux artériels, environnement pauvre en oxygène... Le recours à une chambre d'élevage où il est possible de diminuer la concentration en oxygène de l'air (communément appelée chambre d'hypoxie) nous est apparu comme la méthode la plus simple. Elle respecte, de plus, les conditions nécessaires pour les soins indispensables à délivrer aux animaux en cours d'étude.

#### ***2.1.1 Niveaux d'hypoxie***

La profondeur de l'hypoxie est un paramètre à prendre en compte pour la puissance physiologique du stimulus. Il faut alors pouvoir entraîner chez l'animal une pression artérielle en oxygène suffisamment basse pour induire l'état d'hypoxie. Nous avons retenu pour nos expériences 2 niveaux : l'un représentant une hypoxie modérée créée

par un mélange gazeux avec une  $F_{iO_2}$  fixée à 0.15, le second constituant une hypoxie plus sévère avec un air constitué d'une  $F_{iO_2}$  fixée à 0.08.

### ***2.1.2 La chambre d'hypoxie***

Pour la réalisation de nos expérimentations, nous avons construit une chambre d'hypoxie pouvant constituer un lieu de vie pour nos animaux étudiés. Nous nous sommes inspirés de celle décrite par Prestwich en 1984 en y apportant quelques modifications essentiellement d'ordre technique. (Voir chapitre Annexe Technique pour le descriptif détaillé de cette chambre d'hypoxie). Cette chambre a donc été conçue afin de pouvoir recevoir jusqu'à 2 lapins adultes, ou une femelle avec l'ensemble de sa portée. L'alimentation et la boisson sont délivrées sans restriction et sans besoin d'intervention extérieure. La concentration en oxygène dans cette chambre est obtenue par l'adjonction d'azote en flux continu fixé par un débitmètre. La pression ambiante en oxygène et en gaz carbonique dans la chambre est maintenue par un mécanisme de servocontrôle permettant de maîtriser les flux en  $O_2$  et  $CO_2$ . Les concentrations en  $O_2$  et  $CO_2$  sont également monitorées en continu. Enfin la chambre est équipée d'indicateurs de température et humidité et du matériel nécessaire pour absorber les excès de vapeur d'eau et de  $CO_2$ . Ainsi confectionnée, la chambre d'hypoxie est placée dans une pièce à température constante et contrôlée et avec un cycle nyctéméral de 12 heures.

## **2.2 Méthodologie d'étude**

Afin d'atteindre nos objectifs d'étude, nous avons analysé 3 moments du développement postnatal du lapin. Les âges retenus correspondent à des stades

maturatifs précis : le nouveau-né (lapin de 1 jour), l'individu pré-pubère (lapin de 25 jours) et l'adulte (lapin de 6 mois). Pour chaque niveau d'âge, 5 groupes étaient constitués : 1 groupe témoin vivant dans les mêmes conditions expérimentales mais dans une ambiance normoxique et 4 groupes soumis à une atmosphère hypoxique. Selon l'âge, le protocole de conditionnement dans la chambre d'hypoxie variait : pour l'étude des nouveau-nés, la femelle gestante était transportée dans la chambre 2 à 3 jours avant la mise bas. L'atmosphère était maintenue en normoxie jusqu'à la fin de la naissance des petits. Puis, en fonction du groupe en cours d'étude, l'hypoxie était réalisée pour une durée et une intensité prédéfinies. Pour l'étude des lapins de 25 jours (qui ne sont pas encore complètement sevrés), toute la portée était transportée avec la mère dans la chambre d'hypoxie et soumise aux conditions correspondant au type de groupe étudié. Pour les adultes, 2 individus au maximum étaient placés dans la chambre d'hypoxie. Les animaux étaient sacrifiés à la fin de la période prédéfinie d'hypoxie ou 24 heures après être entrés dans la chambre.

### **2.3 Méthodes expérimentales**

Il s'est agi d'une étude prospective qui a comparé un groupe contrôle *versus* des groupes exposés à différentes conditions d'hypoxie.

#### **2.3.1 Exposition**

4 conditions d'hypoxies ont été définies et donc 4 groupes constitués en plus du groupe témoin (qui représente le groupe contrôle de l'étude) :

**G<sub>c</sub>** groupe contrôle soumis à une normoxie pendant 24 heures.

**G<sub>1</sub>** groupe soumis à une hypoxie de 6 heures avec une  $F_i O_2$  de 0.15

G<sub>2</sub> groupe soumis à une hypoxie de 24 heures avec une F<sub>i</sub> O<sub>2</sub> de 0.15

G<sub>3</sub> groupe soumis à une hypoxie de 6 heures avec une F<sub>i</sub> O<sub>2</sub> de 0.08

G<sub>4</sub> groupe soumis à une hypoxie de 24 heures avec une F<sub>i</sub> O<sub>2</sub> de 0.08

### ***2.3.2 Prélèvements des organes***

Le protocole de recueil des surrénales était le même que celui appliqué lors de l'étude sur l'effet d'une corticothérapie anténatale. Après le sacrifice des animaux, à la suite d'une laparotomie, les 2 glandes surrénales sont rapidement extraites et congelées à -80 ° C.

### ***2.3.3 Analyse de type Northern Blot***

Les différentes étapes de l'étude par biologie moléculaire ont été réalisées pour chaque groupe et à chaque âge soit pour 15 conditions différentes. Pour chacune d'entre elles, le déroulement de l'analyse s'est faite de manière identique à la description développée dans le paragraphe III.2.3 du chapitre I : l'extraction de l'ARN a été effectuée à 2 reprises, la fabrication de sondes radio-actives spécifiques pour l'ARNm du R DA D1 a été réalisée selon une méthodologie identique à celle que nous employons depuis le début de nos expérimentations. Enfin, l'hybridation, l'exposition et l'analyse informatique et radiographique étaient réalisées en moyenne à partir de 6 membranes distinctes (provenant pour moitié de la première extraction d'ARN et pour moitié de la seconde). Nous avons appliqué les mêmes techniques de contrôle de qualité interne (hybridation avec sonde 18S en fin d'expérience) pour nous assurer du caractère comparable de chaque échantillon.

### **3 Principaux résultats**

#### **3.1 Groupes témoin**

Pour ces animaux placés pendant 24 heures dans la chambre d'hypoxie mais soumis à des conditions de normoxie, nous avons mis en évidence, pour chaque âge étudié, une expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale. Elle constitue, pour nos expériences, le niveau d'expression de base compte tenu des conditions particulières d'analyse. A chaque âge, nous l'avons alors fixé à 1, constituant ainsi le niveau référence d'expression.

#### **3.2 Groupes nouveau-nés de 1 jour**

Nés dans la chambre d'hypoxie, ils sont placés en condition d'hypoxie dès la fin de la mise bas. Les 4 groupes hypoxiques présentent une expression inférieure au niveau de référence du groupe témoin du même âge. Cette hypoxie a donc induit une diminution significative de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale quelle que soit son intensité ou sa durée. Toutefois, on note qu'il existe une tendance à une baisse plus marquée lorsque que l'hypoxie est poursuivie 24 heures.

#### **3.3 Groupes jeunes de 25 jours**

Les résultats de ce groupe d'âge montrent une grande variabilité. Il existe une tendance à une accentuation de l'expression de l'ARNm du R DA D1 quand les lapins de 25 jours sont soumis à une hypoxie. Mais aucune différence significative n'est prouvée. L'hypoxie n'induit pas de modification de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale.

### 3.4 Groupes adultes de 6 mois

Le groupe soumis à une  $F_1O_2$  de 0,15 pour une durée de 6 heures présente une expression de l'ARNm du R DA D1 significativement augmentée par rapport au groupe témoin. Alors que les 3 autres groupes ont une expression qui demeure équivalente. Seule, la condition d'hypoxie modérée et de courte durée apparaît donc induire une amplification de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapins adultes.

## 4 Conclusion

Cette étude a montré qu'une exposition postnatale à l'hypoxie dans des conditions variables en termes d'intensité et de durée, peut induire une modification de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin. Mais selon le stade de développement auquel se trouve l'animal, ce changement dans l'expression est présent ou non. Ainsi, l'effet de l'hypoxie apparaît âge-dépendant. Il concerne de façon beaucoup plus significative le nouveau-né de 1 jour. La diminution d'expression de l'ARNm du R DA D1 montrée dans cette catégorie d'âge s'oppose à l'absence d'effet constaté chez le lapin plus âgé (hormis pour une seule condition chez l'adulte, ce qui reste alors à interpréter avec justesse). Cette différence pourrait être expliquée par la fonction très spécifique de la glande surrénale pendant la période périnatale. Un contrôle pharmacologique principalement représenté par les récepteurs dopaminergiques paraît pouvoir être impliqué dans la régulation de l'activité surrénalienne puisque que son mécanisme de contrôle est alors non neurogénique. Après cette période, l'effet direct de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du R DA D1 et globalement sur la glande surrénale semble disparaître avec le développement

du contrôle neurogénique. Reste à savoir, si la modification de l'expression de ce récepteur est suivie d'une modification de sa densité au niveau cellulaire. Et, il faut également se poser les questions sur la signification et le retentissement clinique d'un tel effet de l'hypoxie pendant le stress périnatal inhérent à toute naissance.

**5 Publication :** Article 3 (cf. page suivante)

**Age-related Modulation of Dopamine D1 Receptor mRNA Level**  
**by Hypoxia in Rabbit Adrenal Gland**

Jean-Marc Labaune<sup>1,2</sup>, MD, Marie-Jeanne Boutroy<sup>1</sup>, MD, PhD,

Aida Bairam<sup>2</sup>, MD, PhD.

1. Adaptation Néonatale et Développement. J E 2164 – Université Henri Poincaré - Nancy 1.  
France.
2. Unité de Recherche en Périnatalogie, Centre de Recherche HSA, Université Laval,  
Québec, Canada.

**Short title:** Hypoxia and adrenal dopamine D1 receptor

Work supported in part by grants from Société française de Médecine Périnatale et  
Association Développement humain.

**Correspondance should be addressed to:**

Dr M.J. BOUTROY, Maternité Régionale Universitaire, 10, rue du Dr Heydenreich, 54042  
Nancy Cedex , France.

Phone: (39) 3.83.34.43.77; Fax: (39) 3.83.34.44.11;

e-mail: [mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr](mailto:mj.boutroy@maternite.chu-nancy.fr)

## ABSTRACT

In the perinatal period, the fetus and the neonate may be exposed to hypoxic conditions. The adrenal gland responds to systemic hypoxia by releasing catecholamines. Dopamine and dopamine D1 receptor are present in the adrenal medulla and are liable to be affected by exposure to hypoxia. We used a rabbit model to determine whether hypoxia modulates the dopamine D1 receptor (DA D1-R) mRNA expression in adrenal glands during development. Rabbits were investigated according to four different hypoxic conditions: 15% O<sub>2</sub> for 6h, 15% O<sub>2</sub> for 24h, 8% O<sub>2</sub> for 6h, 8% O<sub>2</sub> for 24h. Control groups were maintained in normoxic conditions (21% O<sub>2</sub>). For each O<sub>2</sub> condition, animals were studied at three different ages: 1-day old newborns, 25-day old pups, and 6-month old adults. We compared the hypoxic groups to their respective age normoxic group. We have shown that hypoxia decreases DA D1-R mRNA expression level, evaluated using Northern blot analysis, in newborn rabbits, whatever the duration and severity of hypoxia. This down modulation was not observed in 25-day old and in adult rabbits. This age-related modulation of adrenal DA D1-R mRNA could be linked to the age-related transition from the non-neurogenic to the neurogenic regulation of the adrenal function.

**Key words:** Hypoxia, Dopamine D1 receptor, development, adrenal gland.

## INTRODUCTION

In mammals, the adrenal gland is a fundamental organ located between neurologic, neuroendocrine and endocrine pathways in controlling adaptive mechanisms to stress [1]. It responds to a hypoxic stimulus via a neurogenic influx by releasing catecholamines into blood vessels [2]. Furthermore, the medulla chromaffin cells, derived from neural crest, are directly sensitive to hypoxia [3].

The adrenal gland appears to have a highly vital role when the fetus undergoes from the intra-uterine to the aerial life [4]. The stress of birth requires an appropriate adaptive response from the adrenal gland whereas the neurogenic control of the adrenal function is still immature [5]. In spite of that, the adrenal gland is functional early in gestation. The control of fetal and perinatal stresses [4,6] is efficient via a non-neurogenic mechanism of catecholamine release [2,7]. A hypoxic stimulus can directly induce this surge in the newborn rat [8]. But this ability will disappear in older stages of development [9].

Dopamine is one of the three catecholamines synthesized and released by the adrenal medulla. The dopamine levels are much lower in the adrenal gland than norepinephrine and epinephrine levels, and remain constant from the fetal period to the postnatal life [10] unlike the other two catecholamines. Dopamine is considered as a hormonal regulating factor of catecholamine synthesis and release in the adrenal gland [11] via the activation of adrenal dopamine D1 and D2 receptors (DA D1- and D2-R). The DA D1- and D2-R make up a dual system in the striatum, functioning before birth [12]. The same neuron may coexpress both DA D1- and D2-R [13] supporting the interaction theory of these receptors. At a peripheral level, these two receptors are met ubiquitous and appear to be implicated, via dopamine as neurotransmitter, in the chemosensitive function of the carotid body [14] and of sympathetic

structures like the superior cervical ganglia [15]. Hypoxia modulates DA D1-R and/or DA D2-R mRNA expression at a central level in striatum [16] and at a peripheral level in kidney [17] and in carotid body [18].

Several studies have shown that DA D1-R and DA D2-R are present in the adrenal cortex and medulla of animal species and human [19-20]. It seems that activation of DA D1-R by DA or DA agonists enhances the catecholamine release [21] while activation of DA D2-R inhibits the synthesis and secretion of catecholamines, DA D2-R acting as an autoreceptor [20]. If the DA D2-R has been identified in the adrenal gland of the developing rabbit [22], DA D1-R was still quite unknown in this animal specie as were the effects of a hypoxic stress on mRNA expression of this receptor.

The aims of the present study were to determine if the newborn adrenal gland expresses DA D1-R mRNA and if hypoxia modulates its expression level. Hence, the effects of two hypoxic intensities of 15 and 8 % O<sub>2</sub> and the impact of two lengths of exposure of 6 and 24h on the expression level of adrenal D1-R mRNA were studied in developing rabbits using Northern blot analysis.

## METHODS

**Animals.** New Zealand white rabbits obtained from our local breeding were used. Experimental procedures were performed according to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and approved by the local Animal Care Ethical Committee, CHUQ.

**Exposure to hypoxia.** Rabbits were subjected to four different hypoxic conditions: 15% O<sub>2</sub> for 6h, 15% O<sub>2</sub> for 24h, 8% O<sub>2</sub> for 6h, 8% O<sub>2</sub> for 24h. The experimental conditions were selected on the basis of published data showing evident effects of severe hypoxia on catecholamine content or synthesis, in adrenals or other chromaffin organs, and at different ages of development. In 4-day old rats, a 30-minute exposure to 6 % O<sub>2</sub> increases both the dopamine content of adrenals and the TH activity, TH being the key-enzyme of catecholamine biosynthesis [23]. Long-term hypoxia (3-22 days at 10 % O<sub>2</sub>) increases also both the dopamine synthesis and the TH protein content in adrenals and in carotid bodies of adult rats [24]. A 6-hour exposure to 10 % O<sub>2</sub> is sufficient for achieving the maximal increase in TH mRNA levels in carotid bodies of adult rats. At 48-hours, the level remains higher than in controls [25]. For moderate hypoxia, we chose 15 % O<sub>2</sub> arbitrarily. Control groups were maintained in normoxic conditions (21% O<sub>2</sub> for 24h). Animals were studied at three different ages for each hypoxic or normoxic condition, day 0 being day of birth: 1-day old newborns (n = 20 from 3-4 dams), 25-day old pups (n = 10 from 2 dams), and 6-month old adults (n = 4). The number of adult animals was reduced according to recommendations of the Ethical Committee, as the size of the adrenals was sufficient to perform the analytical procedures with a minimal risk of error. A hypoxic chamber has been designed in our laboratory and built on specific needs for rabbits [26]. This environmental chamber was sufficiently wide to receive 2

adults or one female with her pups with food and water being given *ad libitum*. Oxygen concentration in the chamber was obtained by adding N<sub>2</sub>, flowing continuously and controlled by a flow meter. Both O<sub>2</sub> (15 or 8%) and CO<sub>2</sub> (< 0.3%) concentrations within the chamber were continuously monitored and maintained constant by a servo-control mechanism operating valves controlling air delivery to the chamber. A fan was placed on the top of the chamber allowing gas circulation. The chamber was equipped with temperature and humidity indicators and materials necessary to absorb excess CO<sub>2</sub> and water vapors. Chamber temperature was maintained at 22 ± 1°C and a 12h light-dark cycle was respected. All the animals were acclimatized to the hypoxic chamber, and in order to minimize animals' stress, a protocol of exposure to hypoxia was defined according to the age. For the 1-day old newborns, the pregnant rabbit was put into the chamber 2–3 days before the expected delivery to allow a sufficient adaptation before exposure to hypoxia. For the 25-day old pups, the mother with her litters was put into the chamber 24h before exposure. For the adults, the rabbits were put into the chamber 24h before the exposure.

**Animal preparation and surgical procedures.** At the end of experiences, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) injected intraperitoneally in pups and intramuscularly in adults. Then pups were rapidly decapitated and the adults were sacrificed with a supplementary dose of anesthesia. The adrenals were quickly removed, immediately frozen on dry ice, and stored at -80°C for subsequent analysis. At day 1, the adrenals were tiny and often too small for individual measurements using hybridization analysis and Northern blot procedures. So, they were pooled by age, tissue and oxygenation conditions. The total procedure lasted less than 5 min. Adult striata were collected to be used for probe preparation.

**RNA isolation and probe preparation.** Total RNA was extracted from frozen organs using the Rneasy Qiagen kits (Qiagen, Hilden, Germany) following the procedure described by the manufacturer. The quantification of purified RNA was performed by UV spectrophotometry (absorbency at 260 nm) and by staining with ethidium bromide after 1% agarose gel migration in comparing with different concentrations of standard 28S and 18S ribosomal RNA (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Finally, aliquots of total mRNA were transferred onto nylon membrane in order to estimate RNA concentration by hybridization with <sup>32</sup>P-labeled 18S probe, using as standard known quantities of rRNA. Northern blot analysis and probe preparation were as described previously in details [27,28]. A fragment of rabbit 611 pb DA D1-R DNA was used as a probe to detect its corresponding transcript. It was generated from a fragment using as template rabbit striatum DNA. It was amplified by PCR using primers chosen from the rat DA D1-R gene (nucleotides 151-175 and 738-761, gb M 36831), sequences highly conserved between rabbit (gb Y 10662) and rat (gb M 35077). The PCR reaction was run on a 1% agarose gel; the band at approximately 600 bp was detected after staining with ethidium bromide. This band was excised from the gel, extracted using the Prep-A-Gene kit (BioRad, Richmond, CA, USA), <sup>32</sup>P-labeled by random priming and used as hybridization probes at approximately 1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml of hybridization solution. Hybridization to 18S rRNA was made in order to evaluate an equal loading and allowed to obtain relative densitometric values.

**Northern blot analysis.** Northern blot analysis was performed as previously described [27]. Aliquots of 5µg of RNA were denatured by heating 10 min at 65°C in 40mM MOPS, 10mM sodium acetate, 2ml EDTA, pH 7.0 with 6% formaldehyde, and fractionated by 1% formaldehyde-agarose gel electrophoresis. Afterwards, RNA was transferred onto nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) by capillary blotting using 10X sodium-saline citrate

(SSC), cross-linked to the membranes by UV irradiation at 254 nm for 2 min. and stained with methylene blue to assess equal loading and transfer. Blots were hybridized with a specific <sup>32</sup>P labeled probe. Membranes were washed twice in 2XSSC, 0.5%SDS at 42°C for 15 min and at 65°C for 15 min. Then, they were exposed to a BAS 1000 phosphor-imager plate (Fuji Medical Systems USA, Stamford, CT) for 36h, then exposed to Kodak X-OMAT AR film at -80°C with an intensifying screen for 7 days.

**Data analysis.** For assessment of relative mRNA modulation by hypoxic conditions in each studied age, the samples of the different hypoxic groups were analyzed together on a single membrane done in triplicate, obtained from 2 independent RNA extraction, so that this analysis with total RNA was repeated six times for each pool. Abundance of DA D1-R mRNA and 18S rRNA was expressed in pixel intensities per mm<sup>2</sup> (psi/mm<sup>2</sup>) after subtracting background count for each membrane (MacBAS V2.5 Software, Fuji Photo Filier Co.). DA D1-R <sup>32</sup>P counts were normalized by the 18S rRNA net count. Then it was evaluated by difference with normoxic controls arbitrary set at unit.

**Statistical analysis.** Expression levels were given as a ratio to the normoxic group for each studied age, assuming the expression level in the corresponding normoxic group was equal to 1. Differences in adrenal DA D1-R mRNA abundance were compared using two-way ANOVA with Dunett's or Bonferroni's multiple comparison of means test with a significance level at p< 0.05. Results are presented as mean ± SEM.

## RESULTS

No changes in maternal appearance or behaviour were observed during the stay in the experimental hypoxic chamber. The pups appeared healthy as well as the adults, just like the other control animals.

**Effects of hypoxia on DA D1-R transcription in newborn rabbit (1-day old).** Fig. 1A shows a representative Northern blot for DA D1-R mRNA in 1-day old rabbit. After 36h exposure to phosphor-imager plate, a positive hybridization signal was observed in control indicating that 1 day old adrenal rabbits expresses the DA D1 R mRNA. The visual estimation of signals intensities obtained under hypoxic conditions showed that they were less than control. In Fig. 1B, data of densitometric analysis demonstrate a down-regulation of DA D1-R mRNA in all the studied hypoxic conditions: short (6h) or long (24h), mild (15% O<sub>2</sub>) or severe (8% O<sub>2</sub>) hypoxia. Hypoxia down-regulated DA D1-R mRNA in the adrenal of newborn rabbit whatever intensity and/or duration of hypoxia.

**Effects of hypoxia on DA D1-R transcription in young rabbit (25-day old).** Fig. 2A shows a representative Northern blot for DA D1-R mRNA in young rabbit. The expression levels in the hypoxic groups seemed to be in the same range as in the normoxic group. In Fig. 2B, data of densitometric analysis seemed to corroborate the observations made with Northern blot analysis. Comparison of mRNA expression levels in hypoxic groups did not show any difference between hypoxic and normoxic groups. In the 25-day old pups, hypoxia did not seem to modulate DA D1-R mRNA expression.

**Effects of hypoxia on DA D1-R transcription in adult rabbit.** Fig. 3A shows a representative Northern blot for DA D1-R mRNA in adult rabbit. Expression of this transcript seemed to be up regulated in hypoxic conditions at levels different according to the different conditions of hypoxia. Densitometric analysis (Fig. 3B) did not confirm these visual observations except for the short mild hypoxia for which the expression levels were significantly higher than in the hypoxic group. No other difference was found in adult rabbit. Hypoxia did not seem to modulate DA D1-R mRNA expression in adult rabbit.

## DISCUSSION

We have demonstrated that DA D1-R mRNA is present in the rabbit adrenal gland and that its expression is gene-related modulated by hypoxia. The decrease in the relative expression of DA D1-R mRNA was observed, on the first day of life only, for any given intensity and duration of postnatal hypoxia.

The physiological interest of DA D1-R in the adrenal gland remains to be documented while the role of this receptor in the brain and in the peripheral nervous system has been extensively studied [12,13,19]. However, the adrenal gland, that we have been studying for years [29,30], plays a key role in the perinatal period in releasing catecholamines necessary to the extra-uterine life. In humans, after normal vaginal deliveries, the average plasma level in the umbilical artery is  $1.0 \pm 2.0 \times 10^{-8}$  M, with some values as high as  $6.1 \times 10^{-8}$  M [4,29,31]. This physiological surge in circulating catecholamines may be enhanced by asphyxia and hypoglycemia and even by variations in ambient air breathing [32]. Among the factors acting in releasing catecholamines from the adrenal gland, DA D1-R seems to be the basis of a positive feedback. Its stimulation in bovine chromaffin cells facilitates  $Ca^{2+}$  channel currents by involving adenylate cyclase and protein kinase A [21]. The increase in intracellular  $Ca^{2+}$  stimulates the rapid secretion of catecholamines in response to stressful situation [20]. By contrast, this rapid secretion is counteracted by stimulating DA D2-R and by inhibiting a voltage dependent  $Ca^{2+}$  current [20] itself responsible for a decrease in catecholamine release [19]. DA D1-R and protein expression are down regulated by prolonged (> 4h) exposure to dopamine itself [33]. As during hypoxia, dopamine levels are high, that might be one of the factors acting in decreasing DA D1-R mRNA. Other factors are liable to interfere with gene expression in a specific way during the immediate post-natal period, as it has been shown for levels of oxygenation [34].

The adrenal gland is a neuroendocrine structure, it receives afferent sympathetic influx issued from central nervous system, and it releases catecholamines directly into the blood stream by the opening of the chromaffin vesicles. Adrenal catecholamine receptors, and namely dopamine receptors, can be requested by the afferent sympathetic innervation. This innervation becomes mature at different ages during development according to species [5]: before birth in sheep, much later, several days or weeks after birth, in rat, rabbit and man [6]. The cellular machinery for catecholamine secretion is present early in development but neural signals cannot trigger the release until achievement of complete maturation of the splanchnic nerve. In neonatal rats, direct stimulation with nicotine is effective, indicating that the receptors and the receptor-mediated responses are present [5]; alternatively, the reflex stimulation of catecholamine release by insulin is ineffective. It is likely that splanchnic connections are lacking inside the adrenal gland at this stage of development. This hypothesis is supported by the fact that ultrastructural studies have shown a few nerve terminals present in the adrenal at birth and their proliferation during the first week of life [35]. Despite this deficiency of neural connections, the immature adrenal medulla may release catecholamines by a non-neurogenic mechanism, first demonstrated by Comline and Silver in asphyxic foetal and neonatal calves [36]. At birth, the release by hypoxia cannot be blocked by a nicotinic antagonist as it can in 8-day old rats [2]. Moreover, this release is not preferential for adrenaline or noradrenaline, as it is for adrenaline when the secretion becomes neurogenic.

Our data show that hypoxia affects the DA D1-R mRNA transcripts only when the adrenal sympathetic control is not yet acquired and when the medulla chromaffin cells are still under the direct control of chemical signals. Adrenal catecholamine receptors can be requested directly by a circulating chemical signal such as oxygen [7,31]. During the period of non-neurogenic control, the role of adrenal DA D1-R should be particularly important with regards

to catecholamine release. But, when the adrenal sympathetic innervation is entirely acquired, the chemosensitivity will be lost [9].

In the current study, reactivity to hypoxia seems clearly different according to the different studied stages of development. Hypoxia leads to cellular chain reactions resulting in alterations of gene expression. These alterations may be dependent on age, tissue and duration of hypoxia. In the adrenal gland, a negative or positive modulation related to stages of development and to effectiveness or not of innervation has been described for the catecholamine synthesizing enzymes and for catecholamines themselves. Adams [37] observed a decrease in the relative expression of adrenal TH mRNA at 20 h after exposure to hypoxia in sheep fetuses aged 96-105 days, *i.e.* before the development of adrenal innervation. This modulation occurred more rapidly (3-5 h post hypoxia) at 129-144 days, after the development of adrenal innervation, but recovered to control levels by 20 h post hypoxia [37]. In neonatal rats prenatally exposed to hypoxia, TH and PNMT mRNA levels, dopamine and epinephrine content of the adrenal medulla, were reduced on postnatal day 7 [38].

One may question about a specific age-related response of adrenal cells during hypoxia. For a better understanding of the induced-hypoxia mechanisms originating gene alterations, possibly age-related, cultured chemosensitive cells have been used as a model system. In isolated cells from fetal medulla, the decrease in the amplitude of  $K^+$  currents in presence of hypoxia produced an activation of  $Ca^{2+}$  channels, an influx of  $Ca^{2+}$  and the subsequent secretion of catecholamines [3]. This response to hypoxia seems specific to fetal and neonatal stages [8], however the same observation has been made in pheochromocytoma cell lines (PC-12) [39], suggesting that this way of response of the adrenal medulla might be common to all stages of development, including adulthood. The intracellular free  $Ca^{2+}$  influx might be a primary mechanism for gene regulation by hypoxia [20]. On the same experimental model PC-12, disturbances in gene expression in catecholamine synthesizing enzymes have been

observed: the reduction in O<sub>2</sub> concentration produced an increase in the rate of transcription and stability of TH mRNA [40]. At the level of peripheral innervation, some structures contain substantial amounts of dopamine and are O<sub>2</sub> sensing. Their response to hypoxic situations seems very similar to the observations made on chromaffin cultured cells. These alterations in gene expression do not require sympathetic innervation [41,42]. Our observation of an age-related modulation of DA D1-R mRNA is akin to the published observations of a developmental expression of genes during hypoxia. It is not known whether the decrease in DA D1 receptor itself will follow the observed decrease in its mRNA, precursor of receptor synthesis. If it was the case, it may be of clinical concern for the neonatal adaptation to hypoxic events. As a matter of the fact, catecholamine release promotes transitional events at birth, namely the increase of left ventricular contractile state. This increase contributes for a large amount to the increase in pulmonary blood flow, the decrease in pulmonary vascular resistances, and the shift to left ventricular dominant of the ventricular output. Adrenal catecholamine release is also responsible for neonatal physiologic setting of hypoxia: adrenalectomy or blockade of the effects of circulating catecholamines leads to the loss of the neonate's capability to survive hypoxia [2]. As DA D1-R activation enhances the catecholamine release, namely for noradrenaline, the negative modulation of encoding mRNA DA D1-R might be deleterious to the neonate if this down-modulation was followed by a down-regulation of the receptor itself, assumption which remains to be verified.

In conclusion, we have shown that DA D1-R mRNA is expressed in the rabbit adrenal gland from birth to adulthood. This expression is down modulated by hypoxia, whatever the duration and the severity of the hypoxic exposure. This down-modulation is age-related, and has been found only in neonates. We suggest therefore that this specific sensitivity to hypoxia may be linked to the chemosensitivity of adrenal medulla in the life-period when the neurogenic regulation of the adrenal function is not yet completely achieved.

*Acknowledgments:* the authors are grateful to Dr. E.W. Khandjian for helpful assistance in preparing Northern blot figures and for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

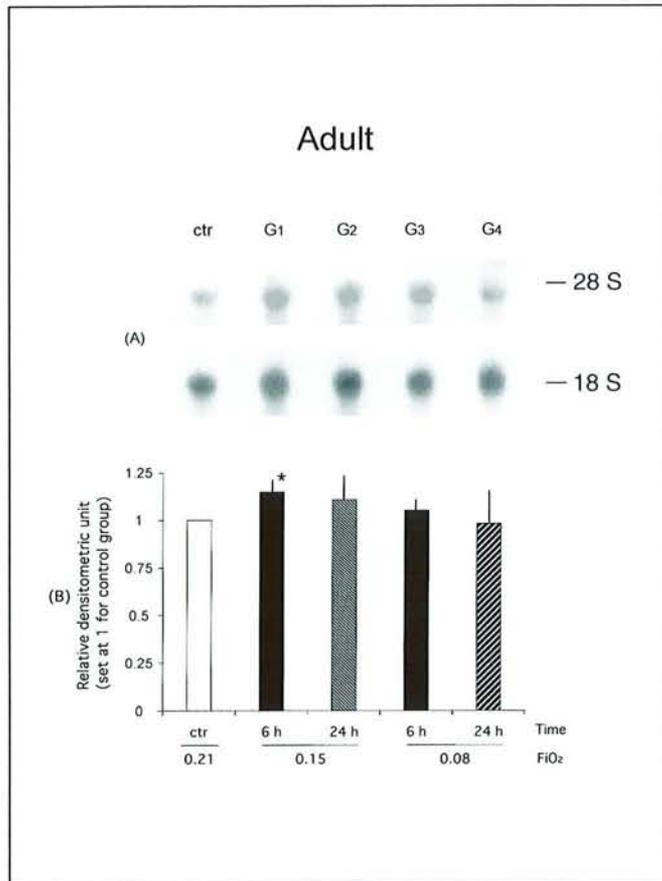
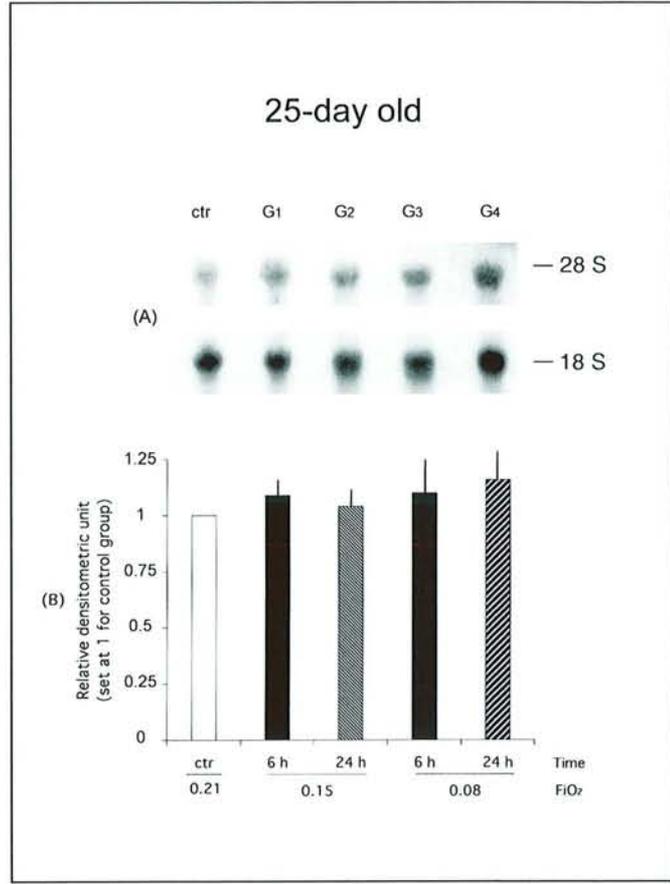
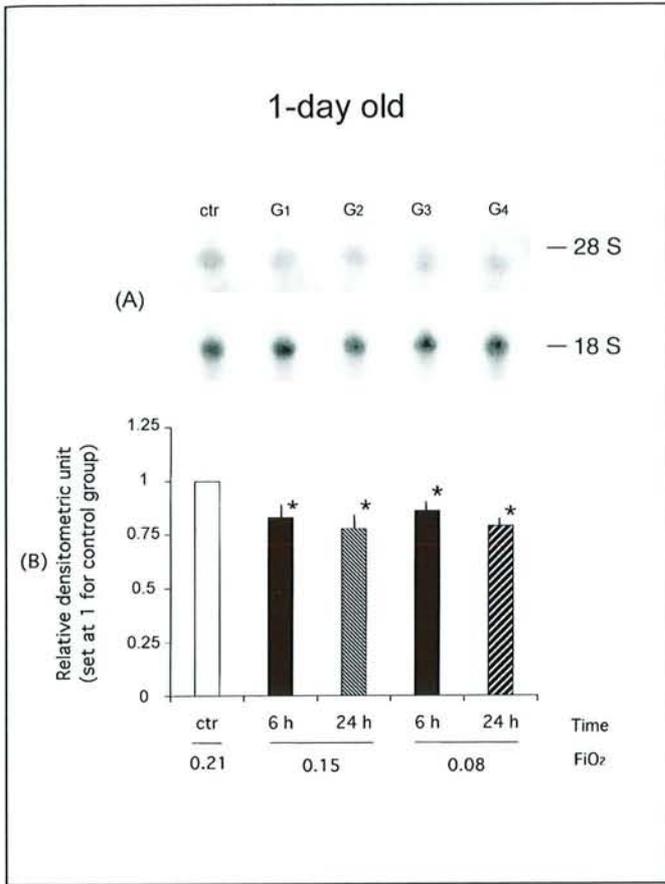
1. Scheuermann DW: Comparative morphology, cytochemistry and innervation of chromaffin tissue in vertebrates. *J Anat* 1993;183:327-42
2. Seidler FJ, Slotkin TA: Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* 1985;358:1-16
3. Rychkov GY, Adams MB, McMillen IC, Roberts ML: Oxygen-sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth. *J Physiol* 1998;509:887-93
4. Padbury JF, Martinez AM: Sympathoadrenal system activity at birth: integration of postnatal adaptation. *Seminars Perinatol* 1988;12:163-72
5. Slotkin TA, Seidler FJ: Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J Dev Physiol* 1988;10:1-16
6. Lagercrantz H, Slotkin TA: The "stress" of being born. *Sci Am* 1986;254:100-12
7. Adams MB, Simonetta G, McMillen IC: The non-neurogenic catecholamine response of the fetal adrenal to hypoxia is dependent on activation of voltage sensitive  $Ca^{2+}$  channels. *Dev Brain Res* 1996;94:182-89
8. Mojjet MH, Mills E, Duchon MR: Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration. *J Physiol* 1997;504:175-89
9. Thompson RJ, Jackson A, Nurse CA: Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol* 1997;498:503-10
10. Coulter CL, McMillen IC, Browne CA: The catecholamine content of the perinatal rat adrenal gland. *Gen Pharmacol* 1988;19:825-828

11. Brodde OE: Subclassification of peripheral dopamine receptors. *J Auton Pharmacol* 1990;10 (Suppl 1):S5-10
12. Moody CA, Robinson SR, Spear LP, Smotherman WP: Fetal behavior and the dopamine system: activity effects of D1 and D2 receptor manipulations. *Pharmacol Biochem Behavior* 1993;44:843-50
13. Lester J, Fink S, Aronin N, DiFiglia M: Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Res* 1993;621:106-10
14. Janssen PL, O'Halloran KD, Pizarro J, Dwinell MR, Bisgard GE: Carotid body dopaminergic mechanisms are functional after acclimatization to hypoxia in goats. *Respir Physiol* 1998;111:25-32
15. Damase-Michel C, Montastruc JL, Tran MA: Effects of dopaminergic drugs on the sympathoadrenal system. *Hypertension Res* 1995;18(suppl 1):S119-S124
16. Filloux FM, Adair J, Narang N: The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Dev Brain Res* 1996;94:81-91
17. Healy DP, Jayaraman G, Ashirova O: Chemical hypoxia-induced increases in dopamine D<sub>1A</sub> receptor mRNA in renal epithelial cells are mediated by nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 2000;168:233-8
18. Gauda EB, Bamford O, Gerfen CR: Developmental expression of tyrosine hydroxylase, D<sub>2</sub>-dopamine receptor and substance P genes in the carotid body of the rat. *Neuroscience* 1996;75:969-977
19. Missale C, Nash RS, Robinson SW, Jaber M, Caron MG: Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189-225

20. Zhu WH, Conforti L, Millhorn DE: Expression of dopamine D2 receptor in PC-12 cells and regulation of membrane conductances by dopamine. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997;C1143-50
21. Artalejo CR, Ariano MA, Perlman RL, Fox AP: Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature* 1990;348:239-42
22. Bulet G, Boutroy MJ, Pichette J, Dauphin C, Khandjian EW, Bairam A: Expression of dopamine D2 short (D2S) and D2 long (D2L) mRNA in the adrenal gland of developing rabbits. *Clin Invest Med* 1996;19: S40
23. Hedner T, Bergman B, Holmgren M: Adrenal catecholamines during and following hypoxia in neonatal rats. *Med Biol* 1980;58:228-231
24. Schmitt P, Garcia C, Soulier V, Pujol JF, Pequignot JM: Influence of long-term hypoxia on tyrosine hydroxylase in the rat carotid body and adrenal gland. *J Auton Nerv Syst* 1992;40:13-9
25. Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE, Millhorn DE: Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem* 1992;58:1538-46
26. Prestwich KN, Buss DD, Posner P: A new method for raising neonatal rabbits in a hypoxic environment. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 1984;57:1913-6
27. Bairam A, Frenette J, Dauphin C, Carroll JL, Khandjian EW: Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. *Neurosci Res* 1998;31:147-54
28. Khandjian EW UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Mol Biol Rep* 1986;11:107-15

29. Moftaquir-Handaj A, Barbé f, Barbarino-Monnier P, Aunis D, Boutroy MJ: Circulating chromogranin A and catecholamines in human fetuses at uneventful birth. *Pediatr Res* 1995;37:101-105
30. Moftaquir-Handaj A, Jafari S, Boutroy MJ: Neonatal catecholamine content of adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue after prenatal exposure to dexamethasone. *Pediatr Res* 1999;45:60-65
31. Paulick R, Kastendieck E, Wernze H: Catecholamines in venous and arterial umbilical blood: Placental extraction, correlation with fetal hypoxia, and transcutaneous partial oxygen tension. *J Perinatol Med* 1985;13:31-42
32. Lagercrantz H: Stress, arousal and gene activation at birth. *News Physiol Sci* 1996;11:214-218
33. Sidhu A, Olde B, Humblot N, Kimura K, Gardner N: Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience* 1999;91:937-947
34. Holgert H, Pequignot JM, Lagercrantz H, Hokfelt T: Birth-related up-regulation of mRNA encoding tyrosine hydroxylase, dopamine beta-hydroxylase, neuropeptide tyrosine, and prepro-enkephaline in rat adrenal medulla is dependent on postnatal oxygenation. *Pediatr Res* 1995;37:701-6
35. Mikhail Y, Mahran Z: Innervation of the cortical and medullary portions of the adrenal gland of the rat during postnatal life. *Anat Rec* 1965; 152:431-7
36. Comline RS and Silver M: The development of the fetal and new-born calf. *J Physiol* 1966;183:305-40
37. Adams MB, McMillen IC: Actions of hypoxia on catecholamine synthetic enzyme mRNA expression before and after development of adrenal innervation in the sheep fetus. *J Physiol* 2000;529:519-531

38. Mamet J, Peyronnet J, Roux JC, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Lagercrantz H, Dalmaz Y: Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat. *Pediatr Res* 2002;51:207-214
39. Taylor S, Peers C: Hypoxia evokes catecholamine secretion from rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Biochem Biophys Res* 1998;248:13-17
40. Czyzyk-Krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE, Millhorn DE: Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC-12) cells. *J Biol Chem* 1994;269:760-764
41. Millhorn DE, Czyzyk-Krzeska M, Bayliss DA, Lawson EE: Regulation of gene expression by hypoxia. *Sleep* 1993;16:S44-S48
42. Conforti L, Kobayashi S, Beitner-Johnson D, Conrad PW, Freeman T, Millhorn DE: Regulation of gene expression and secretory functions in oxygen-sensing pheochromocytoma cells. *Resp Physiol* 1999;115:249-60



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** DA D1-R mRNA expression in adrenal glands of 1-day old rabbits after exposure to four different hypoxic conditions: 15 %<sub>2</sub> O<sub>2</sub> for 6 (G1) and 24 hours (G2), 8 % O<sub>2</sub> for 6 (G3) and 24 hours (G4). The control group (ctr) was submitted to normoxic environment (21 % O<sub>2</sub>).

(A) Representative Northern Blot of DA D1-R. Positive hybridization signals at 4.4 kb, corresponding to DA D1-R mRNA molecular weight, were observed in all samples with decreased modulation for all hypoxic groups in comparison to normoxic group. Hybridization to 18S rRNA is shown in the lower panel for each analysis.

(B) Relative densitometric mean values. Down-modulation of DA D1-R mRNA expression levels by hypoxia in 1-day old rabbits appears statistically significant (\*p< 0.01) whatever the duration and the intensity of hypoxia: about 20% of decrease for G2 and G4 and 15% for G1 and G3 when compared to the control group.

**Figure 2:** DA D1-R mRNA expression in adrenal glands of 25-day old rabbits after exposure to four different hypoxic conditions: 15 %<sub>2</sub> O<sub>2</sub> for 6 (G1) and 24 hours (G2), 8 % O<sub>2</sub> for 6 (G3) and 24 hours (G4). The control group (ctr) was submitted to normoxic environment (21 % O<sub>2</sub>).

(A) Representative Northern Blot of DA D1-R. Positive hybridization signals at 4.4 kb, corresponding to DA D1-R mRNA molecular weight, were observed in all samples in the same range of intensities for all hypoxic groups in comparison to normoxic group. Hybridization to 18S rRNA is shown in the lower panel for each analysis.

(B) Relative densitometric mean values. The mean values of DA D1-R mRNA expression levels in 25-day old rabbits appear to be in the same range whatever the duration and the intensity of hypoxia. The differences are not statistically significant when compared to the control group.

**Figure 3:** DA D1-R mRNA expression in adrenal glands of adult rabbits after exposure to four different hypoxic conditions: 15 %<sub>2</sub> O<sub>2</sub> for 6 (G1) and 24 hours (G2), 8 % O<sub>2</sub> for 6 (G3) and 24 hours (G4). The control group (ctr) was submitted to normoxic environment (21 % O<sub>2</sub>).

(A) Representative Northern Blot of DA D1-R. Positive hybridization signals at 4.4 kb, corresponding to DA D1-R mRNA molecular weight, were observed in all samples in the same range of intensities for all hypoxic groups in comparison to the normoxic group. Hybridization to 18S rRNA is shown in the lower panel for each analysis.

(B) Relative densitometric mean values. The mean values of DA D1-R mRNA expression levels in adult rabbits appears to be in the same range whatever the duration and the intensity of hypoxia. The differences are not statistically significant in comparison to the control group, except for G1 (\*p< 0.01).

Table 1: Relative DA D1-R mRNA expression level during four hypoxic conditions

In adrenal glands of developing rabbits

(compared to a same age normoxic group)

	<u>1-day old groups</u>			
	0.15/6h	0.15/24h	0.08/6h	0.08/24h
<i>Mean</i>	0.83	0.79	0.86	0.79
<i>SEM</i>	0.03	0.03	0.02	0.02
<i>p</i>	0.005	0.001	0.003	0.0003
	<u>25-day old groups</u>			
	0.15/6h	0.15/24h	0.08/6h	0.08/24h
<i>Mean</i>	1.09	1.04	1.10	1.16
<i>SEM</i>	0.03	0.04	0.08	0.07
<i>p</i>	0.045	0.365	0.307	0.097
	<u>Adult groups</u>			
	0.15/6h	0.15/24h	0.08/6h	0.08/24h
<i>Mean</i>	1.15	1.11	1.05	0.98
<i>SEM</i>	0.02	0.05	0.02	0.06
<i>p</i>	0.002	0.119	0.042	0.791

**DISCUSSION**

**GÉNÉRALE**

Dans ce travail orienté vers l'évaluation des effets de stimuli sur l'expression de l'ARNm du R DA D1, nous avons plus particulièrement étudié les effets d'un stimulus pharmacologique représenté par l'administration anténatale de corticoïdes et les effets d'un stimulus physiologique, l'hypoxie. En prenant comme organe d'étude la surrénale, nous nous sommes intéressés à l'organe clé de la régulation des mécanismes d'adaptation aux situations de stress chez les organismes vivants supérieurs. Il s'agit, en effet, d'un organe qui, de par sa position et son fonctionnement au carrefour des voies nerveuses et vasculaires, a la propriété d'intervenir directement dans le maintien de l'homéostasie des grandes fonctions vitales. La glande surrénale est donc la cible privilégiée de multiples stimuli qui lui permettent de donner à chaque situation physiologique ou pathologique une réponse neurohormonale adaptée.

Son rôle évolue au cours du développement de l'individu ; il apparaît particulièrement crucial lors de l'adaptation au stress de la naissance et à la vie extra-utérine. Notre démarche a été de préciser en premier lieu **le caractère modulable au cours du temps de l'expression de l'ARNm du R DA D1 après la réalisation d'une thérapeutique anténatale par des corticoïdes.** Pour ce faire, nous avons initialement exploré le **R DA D1 central**, ainsi que le **R-DA D2, les deux éléments du système dopaminergique dans le striatum.** Puis nous nous sommes attachés à mettre en évidence **les transcrits du R DA D1 périphérique et leur modulation post-thérapeutique dans la glande surrénale.** Dans une seconde étape, nous avons poursuivi les investigations en s'intéressant aux **conséquences de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm de ce même R DA D1 périphérique dans la surrénale.** Pour chaque étude, plusieurs âges de développement étaient évalués. Les résultats de ce travail suscitent plusieurs commentaires.

En premier lieu, la notion d'âge paraît capitale dans ce travail en raison des particularités développementales de la glande surrénale. Fonctionnelle avant la naissance (Padbury 1988), la glande surrénale a une place primordiale dans les phénomènes de maturation fœtale et de contrôle du stress fœtal (Lagercrantz 1986, Lagercrantz 1996). Cependant, l'immaturation des voies nerveuses fait que les mécanismes de régulation de la fonction surrénalienne sont, au début du développement, non neurogéniques, et ce jusqu'à un âge donné, différent selon les espèces animales (Slotkin 1988). Ainsi, ce n'est que plusieurs jours après la naissance que les voies de contrôle neurogénique deviennent efficaces chez le rat, le lapin et l'Homme (Padbury 1988). Auparavant, la glande surrénale fonctionne selon un mode d'autonomie relative.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes attachés dans nos expériences à couvrir la totalité de la phase de maturation du contrôle neurogénique surrénalien : analyse pendant la période périnatale (chez le fœtus en fin de gestation et chez le tout jeune nouveau-né), pendant la période d'installation du contrôle neurogénique (chez le jeune pré pubère), et une fois que le développement est achevé (chez l'adulte). En utilisant comme modèle animal le lapin, nous avons voulu étudier une espèce animale dont le système sympatho-adrénergique est proche de celui de l'homme dans sa maturation et son fonctionnement (Coupland 1970, Padbury 1981). Son fœtus possède également une chronologie de croissance comparable à celle du fœtus humain, en particulier pour les processus de développement, maturation et croissance cérébraux (Barrada 1980).

De plus, l'expérience de nos laboratoires dans l'élevage de cette espèce animale, les conditions matérielles qui nous étaient offertes ont facilité le bon déroulement des expérimentations. Enfin, nous avons souhaité constituer des groupes très homogènes sur le plan des conditions de prise en charge des femelles gestantes et de conditions ultérieures

d'élevage afin d'obtenir des comparaisons fiables entre les groupes traités et les groupes témoins. De sorte que, même si les effectifs de chaque groupe peuvent paraître réduits (5 à 10 individus en moyenne), la rigueur de leur sélection et leur homogénéité, mais aussi la répétition des tests expérimentaux de biologie moléculaire (jusqu'à 6 analyses différentes par groupes d'animaux) permettent de dégager des différences intergroupes significatives.

En faisant précéder notre travail expérimental par une étude initiale sur l'expression de l'ARNm du R DA D1 et D2 au niveau du système nerveux central, nous avons pour but de recueillir des données afin de valider nos techniques biologiques à partir d'un organe considéré comme référent dans la connaissance des récepteurs dopaminergiques (Chen 1991, Choi 1995). En effet, l'expression du R DA D1 a particulièrement été bien étudiée dans ce tissu. Sa présence au sein du striatum est connue depuis plusieurs décennies. Dans cette structure, le R DA D1 constitue avec le sous-type D2 un système de neurotransmission essentiel dans les phénomènes moteurs et comportementaux de l'organisme. Le dysfonctionnement de ce système entraîne l'apparition de pathologie s'inscrivant, entre autre, dans le cadre des syndromes parkinsoniens. Il s'agit d'un système très précocement exprimé et fonctionnel chez l'individu et, ce bien avant la naissance (Jung 1996). Il subira alors une maturation avec une modulation âge-dépendante de son expression, comme cela a été largement montré par plusieurs auteurs (Xu 1992, Jung 1996, Brana 1997). Cette expression pourra également subir des variations sous l'influence pharmacologique de molécules comme l'halopéridol (Jaber 1994) ou la 6 hydroxydopamine (Frohna 1995). De la même façon, notre travail apporte la preuve que la corticothérapie anténatale a la capacité de moduler, au niveau du SNC, l'expression des R DA D1 et D2 chez le fœtus de lapin dès les premières heures suivant son administration. L'étude à 3 stades postnatals de développement nous permet de

démontrer que ce stimulus pharmacologique a un effet de modulation rapide, mais aussi prolongé. Après une majoration d'expression d'environ 20 % de l'ARNm de D1 et D2 chez les fœtus traités par rapport au groupe des fœtus témoins, il est constaté une diminution de 15 à 20 % de cette même expression à 1 et 25 jours de vie. L'équivalence d'expression dans les 2 groupes n'est recouvrée qu'une fois le développement achevé, chez l'adulte. Le recours aux techniques de biologie moléculaire de type Northern Blot a l'avantage de mettre en évidence directement les transcrits recherchés par nos sondes spécifiques. Elles nous ont permis de retenir le striatum, très riche en R DA D1, comme le modèle d'organe de référence dans la suite de nos expériences. Les mêmes méthodes de recherche pour les glandes surrénales ont pu alors être appliquées.

La présence de R DA D1 dans la glande surrénale est restée un sujet de controverse pendant plusieurs années. Jusque dans les années 90, les études pharmacologiques utilisant divers agonistes marqués n'ont pas permis de mettre en évidence le R DA D1 et laissaient supposer l'absence d'expression du sous-type D1 dans la surrénale de plusieurs espèces animales (Albillos 1992, Amenta 1994, Maroto 1995). Cependant, le recours aux techniques d'immunofluorescence ou de biologie moléculaire a affirmé le contraire (Bigornia 1988, Artéléjo 1990, Huettl 1991, Barili 1996). Aujourd'hui, il est admis que le R DA D1 est exprimé en périphérie dans la glande surrénale. Ainsi, Missale rappelle dans la mise au point publiée en 1998 que le R DA D1 est capable, au niveau de la médullosurrénale, de stimuler la libération des catécholamines. Il agirait, d'après Artéléjo, comme un élément essentiel d'une boucle de "retrofeedback" *via* les canaux calciques pour assurer une mobilisation rapide des stocks catécholaminergiques en cas de situation de stress. Le R DA D2 aurait une fonction inverse, inhibitrice. Au niveau de la corticosurrénale, le R DA D1 a également été mis en

évidence par méthode pharmacologique ou d'hybridation *in situ* chez plusieurs espèces, dont le bœuf ou le rat (Fraser 1989, Gallo-Payet 1990). Mais son rôle paraît plus obscure et n'est pas encore connu de façon certaine.

Cependant, la mise en évidence directe des transcrits du R DA D1 restait encore à faire, en particulier chez le lapin. De plus, l'ontogenèse de ce récepteur dans la glande surrénale n'est pas connue. Il n'est donc pas possible d'apprécier l'implication du système dopaminergique dans le fonctionnement surrénalien au cours du développement. Nous souhaitons appréhender les mécanismes de réponse surrénalienne et de contrôle de cette réponse pendant la période périnatale.

Nous sommes en mesure d'affirmer que les **transcrits du R DA D1 sont exprimés dans la surrénale dès le stade fœtal (fin de gestation à 27 jours) chez le lapin**. La machinerie nucléaire fournit donc à la cellule surrénalienne précocement au cours du développement le matériel nécessaire à la synthèse du R DA D1. **Cette expression précoce ne subira pas de modulation au cours de la maturation de l'individu**. De sorte que le niveau d'expression du R DA D1 dans la surrénale de lapin demeure approximativement équivalente jusqu'à l'âge adulte. Cet état de fait, comparé au système dopaminergique central du striatum (Xu 1992), apparaît singulier. **La modulation âge-dépendante est donc tissu-dépendante**. Si l'on demeure dans l'hypothèse du R DA D1 intervenant comme élément actif de contrôle de la fonction surrénalienne pendant la phase où les voies neurogéniques sont immatures, on peut admettre que l'expression de ce R DA D1 périphérique se situe d'emblée au cours du développement à un niveau maximal. Son rôle se limitera avec la maturation et la mise en place alors du contrôle neurogénique de l'activité de la glande surrénale. Dès lors, l'apparition d'une amplification d'expression contemporaine de la maturation du système

dopaminergique, comme c'est le cas dans le striatum, ne semble pas nécessaire. L'expression est donc déjà à son plus haut dès le stade fœtal de développement.

Néanmoins, il convient de souligner ici qu'expression ne signifie pas synthèse. La densité des récepteurs qui représente réellement le contingent actif, peut être différente au cours du développement même si l'expression varie peu pendant cette période. Il serait donc intéressant de compléter l'évaluation de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin au cours du temps par l'analyse directe des récepteurs et de leur intensité. L'outil de l'hybridation *in situ* devrait permettre d'atteindre cet objectif.

En médecine humaine, le recours à une corticothérapie anténatale, pour prévenir la détresse respiratoire du prématuré, s'est imposé au cours de la dernière décennie au vue des excellents résultats cliniques obtenus chez les nouveau-nés prématurés (de moins de 34 SA) (NIH consensus 1995). L'amélioration du pronostic de ces enfants, en terme de mortalité et de morbidité (essentiellement pulmonaire), est manifeste (Crowley 1995). Toutefois, l'exposition de l'organisme fœtal à cette influence pharmacologique pose logiquement question, notamment vis à vis d'organes connus pour être des cibles de l'action pharmacologique des corticoïdes. La glande surrénale appartient à cette catégorie d'organes avec la spécificité supplémentaire d'être productrice de corticoïdes endogènes (Liggins 1976). Pendant le développement, les corticoïdes accélèrent les phénomènes maturatifs, ce qui a été largement étudié dans le parenchyme pulmonaire (Engle 1996). Le problème alors soulevé est celui de l'impact d'une telle thérapeutique sur le tissu surrénalien. Il est su, que la glande surrénale subit une maturation du contrôle de ses mécanismes sécrétoires. Le caractère neurogénique du contrôle est acquis au cours du développement. La survenue anticipée de ce phénomène maturatif peut-elle modifier la fonction de la glande surrénale ?

Poursuivant l'hypothèse de la place prépondérante des récepteurs dopaminergiques pendant la période précédant l'apparition du contrôle neurogénique, nous nous sommes donc intéressés à évaluer l'effet d'une corticothérapie anténatale sur l'expression du R DA D1 dans la surrénale de lapin. De façon comparable à ce que nous avons mis en évidence dans le striatum, nous avons constaté une augmentation de l'expression de l'ARNm du R DA D1 chez le fœtus dès 24 heures après la fin de la cure de corticoïdes. Cette élévation du niveau d'expression est maintenue bien au-delà de la période faisant suite à l'administration du traitement. En comparaison au groupe témoin, à un jour et 25 jours de vie, cette augmentation persiste. Le retour à un niveau équivalent d'expression entre groupe traité et groupe témoin est noté à la fin du développement, chez le sujet adulte. **La modulation corticodépendante de l'expression de l'ARNm du R DA D1 est également présente au niveau du système dopaminergique périphérique dans la glande surrénale.** L'influence de cette modulation pharmacologique se poursuit après la fin du traitement comme s'il existait un effet printing. L'impact pharmacologique est donc présent pour un temps bien supérieur à la seule action médicamenteuse. Qu'en est-il des conséquences sur le fonctionnement surrénalien à cette période cruciale de son activité ? Même si, en fin de compte, il y a restitution *ad integrum*, la question se pose du caractère bénin ou non de cette perturbation des mécanismes cellulaires surrénaliens. Bien évidemment, les mêmes réserves sont à énoncer au niveau de la glande surrénale quant à la densité des récepteurs qui seule reflète le potentiel d'action du système. Cependant, il est intéressant de souligner que, pour des conditions proches de la pratique clinique (les doses de corticoïdes utilisées sont comparables à celles appliquées en thérapeutique humaine, et donc faibles), nous avons déjà un effet de modulation de l'expression de l'ARNm du R DA D1. L'impact des corticoïdes exogènes, même à dose faible, est présent sur la glande surrénale en développement.

Il reste à déterminer si de telles modifications biologiques peuvent entraîner un retentissement clinique, favorable ou délétère. Il s'agit bien ici d'une interrogation fondamentale. Car, en clinique humaine, l'utilisation d'une corticothérapie en période anténatale est une pratique de nature préventive. L'indication d'un tel traitement s'entend dès qu'un risque de naissance anticipée bien avant le terme prévu apparaît. Il n'est par conséquent pas rare que ce risque passé, une grossesse se poursuive finalement jusqu'à son terme. Dès lors, le fœtus soumis ne retirera plus les bénéfices attendus sur sa maturation. Il est essentiel qu'il n'en conserve pas les effets secondaires. Le challenge serait tout autre si le traitement, au lieu de préventif, était curatif. Nos travaux apportent une réponse sur l'expression d'un système de neurotransmission mettant en évidence un retour à une expression équivalente à la fin du développement que le sujet a été ou non traité. Ceci paraît rassurant quant à l'impact à long terme. A court et moyen terme, l'évaluation clinique depuis maintenant une décennie semble également favorable. Une restriction peut être apportée en cas de doses répétées (ce qui n'a pas été analysé dans notre étude) puisqu'un cas de syndrome de Cushing thérapeutique a été décrit chez un nouveau-né qui avait reçu pendant sa gestation plusieurs traitements corticoïdes (Bradley 1994). Toutefois, il serait souhaitable dans ce contexte de corticothérapie anténatale multiple de pouvoir donner des réponses en terme de synthèse de récepteurs ou de fonctionnalité du système.

**Il est donc possible, au décours d'une gestation, d'induire par un stimulus pharmacologique une modification de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin.**

Au cours de l'adaptation extra-utérine, la glande surrénale est sollicitée de façon intense afin de contrôler les phénomènes de stress provoqués par la naissance. Elle est alors le point

d'impact de stimuli qui vont produire une réponse surrénalienne représentée principalement par une libération catécholaminergique massive. L'hypoxie est fréquente et constitue un stimulus physiologique classique de cette période de la vie. Les organes cibles sont nombreux : Système Nerveux Central, corps carotidien, glande surrénale. Chez le lapin, comme chez l'Homme, le contrôle de l'activité surrénalienne pendant cette période périnatale est encore de type non neurogénique. De sorte que les propriétés de chémosensibilité des cellules chromaffines de la médullosurrénale sont particulièrement utiles (Rychkov 1998). La capacité de la glande surrénale à répondre directement à l'hypoxie existe (Mojet 1997) ; cependant cette propriété disparaîtra au cours du développement, avec la maturation et l'apparition du contrôle neurogénique de la fonction surrénalienne (Thompson 1997).

**L'hypoxie est connue pour son caractère inductible de l'expression des gènes** (Fandrey 1995, Millhorn 1993). Toutefois, cette induction est variable selon le gène concerné : sous des conditions hypoxiques, nous ne retrouvons pas l'amplification physiologique postnatale de l'expression de la Tyrosine Hydroxylase surrénalienne (Lagercrantz 1996, Holgert 1995) ; alors que, dans des conditions similaires d'hypoxie, l'expression de PNMT est, elle, augmentée (Adams 2000). Mais aussi, selon l'organe cible, et pour un même gène, le caractère inductible peut être différent : dans le SNC, l'hypoxie génère une augmentation de l'expression de TH au niveau de la portion ventrale de la medulla oblongata, alors que cette même expression est diminuée dans la portion dorsale de cette structure (White 1997). Le moment du développement est aussi un élément à considérer dans la réponse à l'hypoxie : dans la glande surrénale du fœtus de mouton, la modulation de l'expression de TH par l'hypoxie est différente selon qu'elle est appliquée avant ou après l'apparition du contrôle

neurogénique de l'activité surrénalienne (Adams 2000). Au total, **l'induction par l'hypoxie de l'expression des gènes est gène-dépendante, organe-dépendante et âge-dépendante.**

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale à différents âges du développement du lapin. Ce récepteur est impliqué dans les phénomènes de libération catécholaminergique (Missale 1998), très probablement de façon prépondérante pendant la période de contrôle non neurogénique de la fonction surrénalienne. En étudiant 3 âges postnatals de développement, nous avons souhaité répondre à la question du caractère maturatif de l'effet de l'hypoxie sur l'expression. Le recours à un groupe témoin placé dans les mêmes conditions expérimentales et dont seul l'état normoxique de leur environnement variait a pour but de neutraliser les biais d'étude, très facile à créer par le stress généré chez cette espèce animale par les conditions d'élevage, d'alimentation, d'éclairage ou d'ambiance sonore. La comparaison âge par âge de chaque groupe soumis à l'hypoxie *versus* le groupe témoin rend alors possible l'interprétation par catégories d'âge. Plusieurs conditions d'hypoxie (soit 6 heures ou 24 heures, soit  $F_iO_2$  à 0.15 ou 0.08) ont été évaluées afin d'apprécier les facteurs temps d'exposition et intensité d'exposition dans l'effet de modulation.

Notre laboratoire possède une expérience ancienne dans les soins adaptés au lapin. Nous disposons donc de moyens humains et matériels qui rendaient facile la prise en charge de ces animaux fragiles, favorisant ainsi la reproduction et une croissance harmonieuse des petits. Nous avons adapté la chambre d'hypoxie décrite en 1984 par Prestwitch, en renforçant les mécanismes d'autocontrôle de gaz et de l'humidité. Nous étions particulièrement vigilants à l'environnement lumineux, sonore et thermique de la pièce d'étude. Ce qui nous a permis de réunir des conditions expérimentales optimales pour évaluer l'effet propre de l'hypoxie sur l'organisme des animaux étudiés.

Ainsi, nous avons mis en évidence que la réalisation d'une hypoxie chez le lapin nouveau-né était suivie d'une modulation de l'expression de l'ARNm du R DA D1. En effet, l'analyse par Northern Blot des transcrits du R DA D1 montre une diminution statistiquement significative de leur expression dans les groupes soumis à l'hypoxie comparativement au groupe maintenu en normoxie. Cette baisse d'environ 20 % est présente quelque soit le niveau d'hypoxie ( $F_iO_2$  à 0.15 ou 0.08) et quelque soit la durée d'exposition (6 ou 24 heures). Lorsque l'on étudie à un âge plus avancé du développement, l'effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du R DA D1, nous avons constaté qu'aussi bien chez le jeune comme chez l'adulte, nous ne retrouvons plus la modulation notée chez le nouveau-né. Il existe donc une différence de réponse selon le moment du développement. Ceci peut être rapproché des travaux de Mojet en 1997 qui ont montré le caractère chémosensible des cellules chromaffines chez le rat nouveau-né alors que Thompson et collaborateurs, cette même année 1997, ont poursuivi l'analyse en démontrant que cette propriété disparaissait avec l'apparition du contrôle neurogénique de la fonction surrénalienne au cours du développement. Cette spécificité de l'effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du R DA D1 à la période néonatale peut s'inscrire au sein de l'hypothèse où le système dopaminergique périphérique retrouvé dans la glande surrénale serait impliqué dans le contrôle non neurogénique de la fonction surrénalienne. En s'articulant avec l'action inhibitrice du R DA D2, le R DA D1 pourrait compléter son rôle. Ce R DA D2 est considéré, notamment dans le SNC comme un « auto récepteur » potentiel. Or dans d'autres tissus de l'organisme, comme le SNC, le corps carotidien, l'expression de son ARNm est augmentée dans un contexte hypoxique (Gross 2000, Huey 2000). Si l'on admet que le profil est identique dans la glande surrénale, nous aurions en corollaire de cette amplification d'expression de l'ARNm du R DA D2, une baisse de l'expression de l'ARNm du R DA D1. L'ensemble conduirait à un contrôle de la

décharge catécholaminergique en réponse à un stress hypoxique avec moindre stimulation de la sécrétion des catécholamines par le récepteur dopaminergique D1 et renforcement de l'action inhibitrice du récepteur dopaminergique D2. Il éviterait ainsi un phénomène d'emballement de la réponse surrénalienne qui à ce stade de développement possède une autonomie relative. Par la suite, la mise en place du contrôle neurogénique de l'activité surrénalienne voit disparaître ce caractère « autonome » et explique alors la mise en évidence de l'absence d'effet ou plutôt d'un effet différent de l'hypoxie sur la modulation de l'expression de l'ARNm du R DA D1 au cours du développement.

Il ne nous est pas possible, au vu des résultats, d'affirmer une influence de la durée ou de l'intensité de l'hypoxie sur l'importance de la modulation induite. Cependant, chez le nouveau-né, nous constatons que la diminution de l'expression de l'ARNm du R DA D1 semble plus marquée pour une exposition de 24 heures à l'hypoxie en comparaison à une exposition de 6 heures. Alors même que l'intensité plus profonde de l'hypoxie n'est pas suivie d'une modulation à la baisse plus marquée pour un temps d'exposition équivalent.

Enfin, il faut noter que le niveau de modulation peut paraître modeste ( $\pm 20\%$ ). Toutefois, nous avons étudié les variations d'expression de l'ARNm de récepteur, produit cellulaire dont le cycle de synthèse est plus lent que d'autres éléments comme les enzymes, comme c'est le cas de la Tyrosine Hydroxylase dont le renouvellement est rapide et dont les modulations varient jusqu'à 200 ou 300 % selon les conditions expérimentales (Millhorn 1993, Czyzyk-Krzeska 1992). Une autre explication à cette modulation modérée est à mettre au compte de l'organe étudié. En effet, la glande surrénale impose des contraintes anatomiques, en particulier à la période néonatale où médullosurrénale et corticosurrénale sont intimement liées. Ce qui rend impossible une séparation rigoureuse des 2 parties de la glande. Nous avons donc utilisé la glande surrénale dans sa globalité pour l'étude ultra structurale chez les

nouveau-nés. Afin de maintenir une logique d'analyse, nous avons poursuivi pour les 2 autres âges d'étude le recueil des glandes surrénales dans leur totalité. Nous pouvons imaginer qu'en raison de l'évaluation conjointe de la médullosurrénale et de la corticosurrénale, nous avons un phénomène de dilution de la modulation par l'hypoxie de l'expression de l'ARNm du R DA D1 qui logiquement semble spécifique de la part médullaire de la glande surrénale. Malgré tout, la significativité statistique retrouvée dans le groupe d'âge nouveau-né, alors que la modulation mise en évidence apparaît limitée, s'explique par une variabilité inter-expérimentation très faible dans cette catégorie d'âge. De sorte que lors de la réalisation des 6 différentes expériences par Northern Blot, le matériel ARN analysé donnait toujours les mêmes tendances de résultats dans les groupes hypoxiques comparativement au groupe normoxique. Ceci n'était pas vu avec les 2 autres groupes d'âges pour lesquels la variabilité inter-expérimentation apparaissait nettement supérieure. **Donc, l'absence de modulation par l'hypoxie de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin dans les groupes plus âgés suggère que le stade de développement intervient dans le mécanisme qui conditionne la réponse surrénalienne au stress.** Les travaux de Padbury et Seidler ont largement démontré cette caractéristique fondamentale du fonctionnement de la glande surrénale. Ils reflètent aussi le rôle essentiel, dès le début du développement, de cet organe aux fonctions neuro-endocriniennes.

Finalement, nous sommes en droit de nous poser des questions concernant la signification physiologique de cette modulation de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin après une stimulation pharmacologique ou hypoxique. Une des réponses qu'il serait utile d'apporter concerne la notion de la densité des récepteurs. Car expression et

variation de cette expression ne signifient pas automatiquement synthèse de récepteurs et variation de la quantité des récepteurs présents et fonctionnels.

Pour conclure, il faut souligner que peu d'auteurs se sont intéressés aux effets d'un traitement comme les corticoïdes ou d'une hypoxie sur la glande surrénale en y intégrant le paramètre développemental. Le caractère primordial de cet organe, notamment pendant la période périnatale (Lagercrantz 1986, Padbury 1988, Slotkin 1988) représente pourtant un point essentiel de la compréhension physiopathologique des phénomènes d'adaptation extra-utérine. L'analyse du R DA D1 périphérique dans cet organe est encore parcellaire (Missale 1998) ; dans ce travail seule son expression est étudiée. Mais, la preuve de sa présence, dès un stade précoce de développement est apportée, et renforce l'hypothèse d'un rôle prépondérant de ce type de récepteur dans la régulation autonome (pour un temps) de la glande surrénale aux fonctions neuro-endocriniennes complexes et indispensables à la survie de l'individu dès le début de sa vie.

## **CONCLUSION**

Nous avons tout d'abord mis en évidence l'expression de l'ARNm du récepteur dopaminergique D1 dans la glande surrénale de lapin. Nous avons décrit l'ontogenèse de cet ARNm, du stade fœtal au stade adulte, et ceci pour la première fois chez le lapin. Cette ontogenèse n'est pas âge-dépendante, contrairement à ce qu'il est connu pour le striatum et que nous avons nous-même vérifié. L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation des techniques de biologie moléculaire de type Northern Blot pour mettre en évidence les transcrits du récepteur dopaminergique D1 surrénalien.

Puis nous avons testé l'effet d'un corticoïde, la bétaméthasone, administré en anténatal, sur l'expression de l'ARNm de ce même récepteur. Deux organes cibles des corticoïdes, le striatum et la surrénale, ont été évalués. Au niveau central, nous avons montré dans le striatum une sur-modulation au stade fœtal, puis une sous-modulation à moyen terme pour finalement recouvrer un niveau normal chez l'adulte. Au niveau périphérique, dans la glande surrénale, le corticoïde a induit une sur-expression de l'ARNm du récepteur D1 au stade fœtal, se prolongeant au cours du développement mais se normalisant à l'âge adulte.

À l'issue de cette étude, plusieurs questions sont restées posées concernant la signification physiologique de telles constatations et le caractère potentiellement bénéfique ou délétère d'une corticothérapie anténatale sur la glande surrénale, sa réponse adaptée au stress périnatal et son développement ultérieur. Une modulation d'expression ne signe pas forcément une modulation de synthèse. Pour pouvoir aborder le problème des conséquences cliniques de telles variations, il serait souhaitable de compléter ces données par l'étude de la densité du récepteur dopaminergique lui-même sous l'effet de ce traitement corticoïde anténatal.

C'est aussi pour préciser la place du R DA D1 dans la régulation de la réponse surrénalienne, en particulier au cours de la période périnatale, que la seconde partie du travail

a été effectuée. Elle a porté sur l'effet de l'hypoxie sur la modulation de l'expression du R DA D1 dans la glande surrénale. Trois âges postnatals ont été analysés afin de couvrir les phases de développement survenant après la naissance. Le recours à plusieurs conditions d'hypoxie avait pour objectif de préciser qui, de l'intensité d'exposition ou de la durée d'exposition, avait le caractère le plus fort.

Nous avons constaté que le stimulus hypoxique avait induit une diminution de l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale mais uniquement chez les nouveau-nés. L'effet de modulation n'était pas retrouvé à un âge plus avancé du développement, chez le jeune ou chez l'adulte. De même, quelle que soit l'intensité ou la durée, la modulation néonatale de l'hypoxie ne différait pas. Nous avons pu proposer, au vu de travaux qui montrent la chémosensibilité des cellules chromaffines médullaires et son caractère évolutif avec le développement, des hypothèses quant à la place du R DA D1 dans le fonctionnement périnatal de la glande surrénale. On reconnaît une certaine autonomie à l'activité surrénalienne pendant la période périnatale avec des mécanismes non neurogéniques de contrôle qui feraient appel aux propriétés d'autorécepteur du récepteur dopaminergique D2. Ceci lui confère un rôle particulièrement important dans l'adaptation à l'hypoxie, du moins à un stade précoce du développement postnatal. On peut ainsi suggérer que le récepteur D1 ait un rôle analogue. Il serait souhaitable d'étayer ces hypothèses par une analyse plus précisément tissulaire, en utilisant par exemple des techniques d'hybridation *in situ*. Il serait alors possible de juger de la répartition topographique exacte de ce récepteur dans la surrénale et du retentissement éventuel de l'hypoxie.

Enfin, il serait intéressant d'étudier conjointement l'effet des corticoïdes administrés en anténatal et l'effet de l'hypoxie en période postnatale. Car, si tous les auteurs

s'accordent sur l'absolue nécessité d'avoir un système sympatho-adrénergique intact pour réussir l'adaptation à la vie extra-utérine et faire face au stress de la naissance, volontiers de nature hypoxique, nous ne savons pas si une corticothérapie anténatale aura un retentissement direct sur la faculté physiologique de la glande surrénale à réagir de façon rapide et adéquate à une hypoxie périnatale. Ceci est d'autant plus crucial que l'accélération de la maturation du contrôle neurogénique de l'activité surrénalienne peut modifier ses capacités de réponse en période périnatale. Cependant, nous ne pouvons pas nier le bénéfice apporté par les corticoïdes reçus *in utero*, en particulier dans la détresse respiratoire du prématuré. La clinique humaine ne nous a pas encore apporté d'exemple d'une mauvaise tolérance à court ou à long terme, du moins pour des cures de corticoïdes brèves et peu nombreuses. Mais, il est certain cependant que le nouveau-né, exposé *in utero* aux thérapeutiques maternelles, naît avec un héritage médicamenteux susceptible de perturber ses fonctions physiologiques encore immatures. L'effet croisé corticoïdes / hypoxie reste largement sous évalué : bénéfique ou délétère, nous ne pouvons le présager.

Quoi qu'il en soit, ce travail fournit des exemples de modifications engendrées par ces deux stimuli, l'un pharmacologique, l'autre physiologique, sur l'expression de l'ARNm du récepteur D1 de la glande surrénale, maillon impliqué dans le système sympatho-adrénergique. Il est le résultat original d'une démarche scientifique menée en cotutelle. Il a donc permis de réunir dans une même thèse expérimentale les préoccupations cliniques de deux équipes de recherche vis-à-vis des effets sur le développement, à court ou à long terme, de stimuli pharmacologiques ou physio-pathologiques.

# **ANNEXE TECHNIQUE**

## Annexe Technique

L'ensemble des travaux a porté sur une même espèce animale. Les différentes techniques de biologie moléculaire mises en œuvre ont fait appel à des procédures identiques pour révéler les récepteurs dopaminergiques et leur modulation. Seuls les protocoles expérimentaux variaient, selon que l'on étudiait le stimulus pharmacologique par traitement corticoïde anténatal, ou le stimulus physiologique par hypoxie postnatale.

### **I. Sujets et Prélèvements.**

#### **1. Les animaux**

L'espèce animale retenue pour toutes les expérimentations était le lapin blanc de type New-Zealand qui provenait de notre élevage situé au sein du centre de recherche Saint François d'Assise à Québec. Pour les lapines gestantes, le stade de gestation était défini par le nombre de jours depuis l'accouplement (le jour de l'accouplement correspondant au 1<sup>er</sup> jour de gestation G1). La première partie de l'analyse concernant l'ontogenèse du R DA D1 faisait appel à des femelles gestantes sacrifiées à 27 jours de gestation ou menant à terme leur gestation pour étude ultérieure des petits. Quant aux lapines traitées par bétaméthasone ou sérum physiologique pour étude fœtale de la modulation pharmacologique, elles recevaient les injections intramusculaires à G25 et G26 ; et le sacrifice des lapines gestantes survenait à G27. Les autres utilisées pour l'évaluation postnatale à court, moyen et long terme de l'effet

pharmacologique anténatale ou de l'effet hypoxique postnatale recevaient, si nécessaire, les injections intramusculaires à G27 et G28 ; et menaient leur gestation à terme (la mise bas survenant à G30 ± 1).

Dans l'étude pharmacologique, l'ensemble des fœtus était prélevé. Puis en postnatal, une partie des nouveau-nés de plusieurs portées différentes était utilisée pour les prélèvements, laissant un échantillon d'individus se développer jusqu'au stade de 25 jours de vie et au stade adulte. Ceci permettait de couvrir l'ensemble de la période de développement.

**Tableau : Nombre d'animaux utilisés pour l'étude portant sur l'effet de la corticothérapie anténatale sur l'expression de l'ARNm des R DA D1 et D2 dans le striatum et l'expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin au cours du développement.**

	Section Ontogenèse		Section Corticothérapie			
	Nb de sujets	Nb de portées	Bétaméthasone		NaCl 0,9 %	
			Nb de sujets	Nb de portées	Nb de sujets	Nb de portées
Fœtus 27 jours	11	2	12	4	11	3
N-nés 1 jour	7	2	12	3	15	3
Jeunes 25 jours	4	2	4	3	5	2
Adultes 6 mois	2	2	3	3	2	2

Dans l'étude hypoxique, chaque portée soumise à l'hypoxie à des stades différents du développement (1 jour, 25 jours et adulte de 6 mois) était sacrifiée à la fin de la condition

expérimentale prédéfinie. Le nombre d'individus analysés était constant pour chaque condition de cette étude : 20 nouveau-nés provenant de 3 ou 4 portées, 10 jeunes de 25 jours provenant de 2 portées et 4 adultes de 6 mois provenant de 2 portées. Pour l'analyse des nouveau-nés, les femelles gestantes mettaient bas dans la chambre où les nouveau-nés étaient soumis à l'hypoxie. Les mêmes procédures étaient réservées pour les groupes témoins placés en conditions de normoxie.

## **2. Méthodes de prélèvements**

La totalité des gestes chirurgicaux étaient effectués, indifféremment du sexe et après anesthésie préalable réalisée par un mélange au 1/10 de xylozine (Rompun 2 %, 10 mg/kg, Bayer) et de Kétamine (Kétalar, 50 mg/kg, Parke Davis). Les striata ont été prélevés après craniotomie sagittale qui permettait d'extérioriser le cerveau. L'encéphale était sectionné dans son tiers antérieur verticalement obtenant ainsi une coupe coronale. Les 2 striata apparaissent alors comme des formations renflées plus ou moins blanchâtres selon l'âge de l'individu et situés sous le plancher des ventricules latéraux. Ils étaient scindés facilement du reste du parenchyme par simple clivage à l'aide d'une pince courbe.

Les glandes surrénales ont été prélevées après laparotomie médiane qui laissait apparaître 2 formations ovoïdes, blanchâtres situées de part et d'autre de l'aorte abdominale. L'extraction en est alors aisée d'autant qu'elles sont parfaitement individualisables et pédiculées en arrière du péritoine.

## **II. Techniques de Biologie Moléculaire**

L'étape préalable aux différentes expérimentations qui ont été détaillées dans ce travail a été la mise au point de sondes spécifiques capables de reconnaître et ainsi révéler la présence

d'une expression de l'ARNm du R DA D1 au sein du striatum et également, principalement dans la glande surrénale.

## **1. Fabrication des sondes spécifiques**

### 1.1 Pour le récepteur dopaminergique D1

Puisque le gène du R DA D1 est dépourvu d'introns, nous avons pu dans un premier temps obtenir un fragment en utilisant comme échantillon directement l'ADN de lapin. Cet ADN de lapin avait été extrait et purifié à partir des leucocytes sanguins, il a alors été amplifié par technique PCR en utilisant des amorces choisies à partir du gène du R DA D1 de rat. Ces amorces comprenant les nucléotides 151 à 175 et 738 à 761 correspondaient à des séquences hautement conservées entre espèces. Ces oligonucléotides ont donc été synthétisés par les méthodes chimiques standards sur un DNA synthesizer de type ABI 394 (Perkin Elmer-ABI, Foster, CA). La réaction PCR était réalisée sur un volume total de 50µl contenant 0,5 µg d'ADN, 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,5 mM de chaque amorce et 2,5 U de polymérase Tap ADN (Promega, Madison, WI). L'amplification conduite par un PTC 100 thermal cycle (MJ Research, Watertown, MA) se décomposait par une étape initiale de dénaturation à 95 ° C pendant 5 min., suivie de 35 cycles de dénaturation d'ADN 95 ° C sur 1 min, puis annealing pendant 1 min à 55 ° C et élongation à 72 ° C pendant 2 min. L'étape finale d'extension se faisait à 72 ° C pendant 7 min. L'analyse de la réaction PCR était faite sur gel d'agarose 1 % dans une solution de tris-Borate-EDTA. Il était alors détecté une bande intense après coloration au bromure d'éthidium se situant approximativement aux alentours des 600 paires de bases. Cette bande était excisée du gel et l'ADN extrait à partir du kit Prep-A-Gene (BioRad, Richmond, CA). Le produit PCR obtenu était alors conservé à -18° C avant d'être radio marqué au P<sup>32</sup> et de servir de sondes d'hybridation radio-actives.

## 1.2 pour le récepteur dopaminergique D2

Les étapes d'obtention de la sonde spécifique pour le R DA D2 étaient comparables. Les amorces retenues à partir du ADNc du gène du R DA D2 comprenaient les nucléotides 196 à 221 et 631 à 654. La taille attendue des produits PCR ainsi amplifiés était de 459 paires de bases. La réaction PCR réalisée consistait en 35 cycles de : 1 min à 94 ° C, 1 min à 56 ° C, 2 min à 72 ° C et une extension finale à 72 ° C pendant 7 min. La conservation de la sonde était identique. Elle était aussi marquée au P<sup>32</sup> lors de la réalisation de l'hybridation.

## **2. Extraction de l'ARN**

Les organes prélevés ont tous été rassemblés par âge, par tissu et par condition expérimentale. Leur conservation a été possible par congélation à -60° C. L'analyse de toutes les différentes expérimentations s'est toujours faite à partir de 2 extractions d'ARN réalisée de façon indépendante.

Il était extrait à partir de chaque pool constitué 150 à 200 mg d'organe congelé. Le kit d'extraction *Rneasy Qiagen kit* (Qiagen, Hilden, Allemagne) après homogénéisation par centrifugation des échantillons permettait d'obtenir des extraits d'ARN total. Ceci était donc répété 2 fois.

## **3. Les étapes de l'étude par Northern Blot**

### 3.1 Etape de Migration de l'ARN

L'étape de migration effectuée afin de séparer les différents types d'ARNm était réalisée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1 % dénaturant.

*Préparation du gel* : 1 g d'agarose dans 73.8 ml d'eau DEPC, porté à ébullition puis refroidi à 60 ° C. Adjonction alors de 10 ml de MOPS 10 X et 16.2 ml de Formaldéhyde.

*Préparation des échantillons* : échantillon de 5 µg prélevé selon la concentration des extraits et ramené au plus à 10 µl - incorporation d'un colorant dénaturant - chauffage à 65 ° C pendant 5 min. - dépôt dans les puits. Immersion du gel dans une solution de MOPS 1X.

*Migration* : sous un voltage de 60 V pendant 6 heures environ.

### 3.2 Transfert sur membrane de nylon

Le gel placé sur un support est mis en contact par l'intermédiaire de papier buvard 3M avec un milieu salin de type SSC 10 X. Le transfert est réalisé par capillarité. Le montage est maintenu 18 heures afin d'assurer un transfert de la totalité des échantillons d'ARN.

La membrane est alors exposée pendant 2 minutes aux UV pour fixer définitivement l'ARN à son support. La membrane est ensuite lavée avec une solution de SDS 2 % puis rincée abondamment. Elle est enfin placée au contact d'un colorant, de Bleu de Méthylène- Acétate de Sodium pendant 15 min. Une décoloration par de l'éthanol à 70 % est faite permettant de révéler la décomposition de l'ARN entre le 28S et le 18S et de s'assurer de son intégrité après le transfert. La membrane est séchée entre 2 papiers absorbants et conservée à température ambiante.

### 3.3 Etape d'hybridation de la membrane

*Préparation de la sonde radio-active* : La sonde spécifique synthétisée était utilisée à hauteur de 30 ng, à laquelle étaient adjoints 4 µl d'OLB, 2µl  $\alpha$ P<sup>32</sup>, 2 µl de Kleelow et un volume d'eau distillée afin d'obtenir une solution de 20 µl. Elle était placée à 37 ° C pendant 60 à 90 min pour laisser agir l'enzyme.

*Passage sur colonnes* : Afin de recueillir les meilleures sondes correctement allongées et radio-actives, la préparation est placée sur une colonne constituée de Cefadex G.25 et TBE

10 :1. Les échantillons recueillis sont analysés pour calculer leur radio-activité et est prélevé un volume permettant d'avoir une radio-activité de  $1 \times 10^6$  cpm.

*Préhybridation* : La membrane est alors mise en contact pendant au moins 24 heures à une température de  $42^\circ \text{C}$  avec une solution composée de 1,74 g de NaCl, 15 ml de formamide déionisée, 6 ml de DDS 5 % et 8,5 ml d'eau distillée.

*Hybridation* : elle correspond à la mise en contact de la membrane avec la sonde radioactive retenue à laquelle aura été ajouté 1/10<sup>è</sup> de NaOH 4 molaire pour une bonne extension de la sonde. L'incubation est maintenue pendant 24 heures à  $42^\circ \text{C}$ .

*Lavage des membranes après hybridation* : A l'aide d'une solution 2 X SSC + 0,1 % SDS, la membrane hybridée est lavée 15 min à  $42^\circ \text{C}$  (ce, à 2 reprises), puis 15 min à  $65^\circ \text{C}$  (également à 2 reprises).

*Exposition* : La membrane hybridée est exposée à 2 supports pour obtenir l'évaluation de la radio-activité émise par le spot d'ARNm marqué correspondant. Dans un premier temps, il est utilisé une plaque de phosphorimage. Le temps d'exposition est variable selon la sonde radioactive employée, quelques minutes pour la sonde 18 S, 18h pour la sonde D2, 24 h pour la sonde D1. Dans un second temps, la membrane est exposée sur film radiographique à  $-80^\circ \text{C}$  et au contact d'une plaque intensifiante. Le temps d'exposition varie de quelques heures pour la sonde 18S à 4 jours pour la sonde D2 et 7 jours pour la sonde D1.

#### **4. Obtention et Analyse des résultats**

Par niveau d'âge et type de tissu, la totalité des conditions expérimentales, pour une étude donnée, était placée sur un même gel. De sorte que le transfert sur membrane, puis l'hybridation et l'exposition étaient réalisées dans le même temps. Ce qui limitait les variations inter-expériences qui auraient pu survenir si chaque condition avait été analysée

pour son propre compte. Cette opération a été répétée 6 fois, 3 fois avec l'ARN obtenu à partir de la première extraction et 3 fois avec l'ARN de la seconde extraction.

La lecture des plaques de phosphorimage donnait des signaux d'intensité dont l'évaluation par l'utilisation du logiciel Mac BAS V2.5 permettait d'obtenir une valeur relative d'abondance des ARNm étudiés. Cette abondance était exprimée en pixel d'intensité par mm<sup>2</sup> après avoir soustrait aux signaux, le bruit de fond provenant de la membrane. Et, afin d'affiner les résultats obtenus, l'application d'une hybridation par la sonde 18 S permettait de s'assurer d'un chargement équivalent en quantité d'ARN total pour chaque condition expérimentale. Nous admettions comme acceptable une variation de  $\pm 10 \%$ . Au-delà, il était affecté au résultat concerné, un coefficient de pondération correspondant à la variation notée. Les modulations des ARNm étaient données comme des *ratio* par rapport aux résultats des groupes contrôles (dont le niveau d'intensité était toujours fixé à 1). L'interprétation statistique était alors réalisée grâce au logiciel StatView SE<sup>+</sup> Graphics (Abacus Concept Inc, 1988).

L'analyse des films radiographiques avait pour but d'acquérir des images de ces signaux d'intensité exploitables pour publication. Les meilleurs étaient sélectionnés, puis scannés et enfin exploités par le logiciel Adobe Photoshop V7.0. Pour chaque étude, une construction a été réalisée.

### **III. L'étude Hypoxie et la chambre d'hypoxie**

Le protocole de cette étude a été aménagé de sorte que l'adaptation de l'animal à son environnement soit facilitée. Ainsi, la femelle gestante a été mise dans la chambre 2 jours environ avant la mise bas. Pour l'analyse des jeunes de 25 jours, la mère et ses petits (qui se trouvent en tout début de sevrage) sont transportés dans la chambre 24 heures avant le début

de l'exposition à l'hypoxie. De même, les adultes sont amenés 24 heures avant. Les mêmes procédures sont appliquées aux groupes contrôle.

La chambre d'hypoxie, dont l'illustration est jointe ci-contre (figure 12), a été construite avec l'aide du Dr J.Gordon de l'Université Laval dans le souci de se conformer aux recommandations du Canadian Committee for Animal Care et en accord avec la littérature scientifique disponible pour le lapin. Nous nous sommes donc inspirés de celle décrite par Prestwich et collègues en 1984. Il s'agit donc d'une chambre en plexiglas qui est conçue avec des équipements de contrôle en concentration d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, pour l'humidité et la température comme précédemment définie. L'air est pompé en permanence de la pièce vers la chambre à un débit de 1,64 l/min (Pipet-Aid, Drummond Scientific Co. Broomfield, CO. 80020). Il est mélangé à de l'azote afin d'obtenir la concentration en O<sub>2</sub> souhaitée. Le flux d'azote est de 1 l/min et contrôlé par un débitmètre (Western MEDICA, Westlake, Ohio). Les concentrations en oxygène (à 15 ou 8 %) et en CO<sub>2</sub> (< à 0,3 %) dans la chambre sont surveillées en continu (Oxygen sensor 4-0 20933-00 P.B.Puritan-Bennett, Carlsbad, CA. 92008 ; Carbon dioxide sensor 10-0403, Napco, Portland Ore, 97223). Elles sont maintenues constantes par un mécanisme de servo-contrôle fonctionnant avec des valves actionnant l'arrivée d'air ou de CO<sub>2</sub> dans la chambre. Une ouverture est placée sur le dessus de la chambre pour permettre la circulation des gaz. L'excès de CO<sub>2</sub> expiré est absorbé en faisant circuler l'atmosphère de la chambre dans un tube contenant du soda lime. La vapeur d'eau est absorbée par des grains de silice (DBH Inc. Ville St Laurent, Qué. CA) afin de maintenir une humidité d'environ 45 %. La température de la chambre est également contrôlée et maintenue à 21 ± 1 ° C. Enfin, un cycle jour-nuit de 12 heures est appliquée dans la pièce où se trouve la chambre. Les lapins des groupes contrôle ont été exposés à 21 % d'O<sub>2</sub>

dans les mêmes conditions environnementales pendant 24 heures. Tous les lapins ont eu accès librement à de la nourriture et de la boisson sans limitation.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**ADAMS M.B., SIMONETTA G., McMILLEN I.C.**

The non-neurogenic catecholamine response of the fetal adrenal to hypoxia is dependent on activation of voltage sensitive Ca<sup>2+</sup> channels.

Dev. Brain Res., 1996, 94, 182 – 189.

**ADAMS M.B., et McMILLEN I.C.**

Actions of hypoxia on catecholamine synthetic enzyme mRNA expression before and after development of adrenal innervation in the sheep fetus.

J. Physiol., 2000, 529 (3), 519 – 531.

**AHERNE A.M., VAUGHAN C.J., CAREY R.M., et O'CONNELL D.P.**

Localization of dopamine D<sub>1A</sub> receptor protein and messenger ribonucleic acid in rat adrenal cortex.

Endocrinology, 1997, 138, 1282 – 1288.

**ALBILLOS A., ABAD F., et GARCIA A.G.**

Cross-talk between M2 muscarinic and D1 dopamine receptors in the cat adrenal medulla.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 183, 1019.

**AMENTA F., RICCI A., ROSSI M.**

Localization of dopamine receptors at the periphery.

In : The peripheral dopaminergic system. Its role in cardiovascular homeostasis. / ed. par M. Manelli.

Rome : Ares Serono symposium, 1988.- p. 21 – 41.

**AMENTA F., COLLIER W.L., et RICCI A.**

Autoradiographic localization of vascular dopamine receptors.

Am. J. Hypertens., 1990, 3, Suppl., 34 S – 36 S.

**AMENTA F., CHIANDUSSI L., MANCINI M., et al.**

Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the human adrenal cortex.

Eur. J. Endocrinology, 1994, 131, 91 – 96.

**ANDERSEN P.H., GINGRICH J.A., BATES M.D., et al.**

Dopamine receptor subtypes : beyond the D1/D2 classification.

Trends Pharmacol. Sci., 1990, 11, 231 – 236.

**ANDERSON D.J., CARNAHAN J., MICHELSON A., PATTERSON P.H.**

Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells *in vivo* and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage.

J. Neurosci., 1991, 11, 3507 – 3519.

**ARAKI T., KATO H., SHUTO K., et al.**

Effects of cerebral ischemia on dopamine receptors in the gerbil striatum.

Eur. J. Pharmacol., 1996, 306, 73 – 79.

**ARTELEJO C.R., ARIANO M.A., PERLMAN R.L., et FOX A.P.**

Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism.

Nature, 1990, 348, 239 – 242.

**AXELROD J., et WEINSHILBOUM R.**

Catecholamines.

New Engl. J. Med., 1972, 287, 237 – 242.

**BAIRAM A., BASSON H., MARCHAL F., et al.**

Effects of hypoxia on carotid body dopamine content and release in developing rabbits.

J. Appl. Physiol., 1996, 80 (1), 20 – 24.

**BAIRAM A., FRENETTE J., DAUPHIN C., et al.**

Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats.  
Neurosci. Res., 1998, 31, 147 – 154.

**BAIRAM A., NEJI H., DE GRANDPRE P., CARROLL J.L.**

Autoreceptor mechanism regulating carotid body dopamine release from adult and 10-day-old rabbits.  
Respir. Physiol., 2000, 120(1), 27 – 34.

**BALLARD P.L.**

Monographs on endocrinology.

In : Hormones and lung maturation, éd. par Ballard P.L. et Ballard R.A.  
New York, Springer-Verlag, 1986. – p. 1 – 196.

**BARILI P., ZACCHEO D., AMENTA F.**

Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the rat adrenal medulla.  
Eur. J. Pharmacol., 1996, 310, 2-3, 129 – 135.

**BARRADA M.I., BLOMQUIST C.H., KOTTS C.**

The effects of betamethasone on fetal development in rabbit.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1980, 136, 234 – 238.

**BECK J.C., MITZNER W., JOHNSON J.W.C., et al.**

Betamethasone and the rhesus fetus : effect on lung morphometry and connective tissue.  
Pediatr. Res., 1981, 15, 235 – 240.

**BERGSON C., MRZLJAK L., LIDOW M.S., et al.**

Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain.  
J. Neurosci., 1995, 15, 7821 – 7836.

**BEVLACQUA M., VAGO T., SCORZA D., et MORBIATO G.**

Characterization of dopamine receptors by <sup>3</sup>H-ADNT binding in calf adrenal zona glomerulosa.  
Biochem. Biophys. Res. Com., 1982, 108, 4, 1661 – 1669.

**BIGLIERI E.G.**

Aldosterone and the renine angiotensin system.

In : The year in endocrinology. / ed. par S.H. Ingar.  
New York : Plenum Press Book C°, 1978. – p. 159 – 176.

**BIGNAMI G., ALLEVA E., CHIAROTTI F., LAVIOLA G.**

Selective changes in mouse behavioral development after prenatal benzodiazepine exposure : a progress report.  
Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 1992, 16, 587 – 604.

**BIGORNIA L., SUOZZO M., RYAN K.A., et al.**

Dopamine receptors on adrenal chromaffin cells modulate calcium uptake and catecholamine release.  
J. Neurochem., 1988, 51, 999 – 1006.

**BIGORNIA L., ALLEN C.N., JAN C.R., et al.**

D2 dopamine receptors modulate calcium channel currents and catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1990, 252, 586 – 592.

**BLASCHKO H.**

Catecholamine biosynthesis.

Br. Med. Bull., 1973, 29, 105 – 109.

**BLUMENFELD Z., et JAFFE R.B.**

Hypophysiotropic and neuromodulatory regulation of adrenocorticotropin in the human fetal pituitary gland.  
J. Clin. Invest., 1986, 78, 288 – 294.

**BOHN M.C.**

Role of glucocorticoids in expression and development of phenylethanolamine *N*-methyltransferase (PNMT) in cells derived from the neural crest : a review.  
Psychoneuroendocrinology, 1983, 8, 381 – 390.

**BONDURANT M.C., et KOURY M.J.**

Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver.  
Mol. Cell. Biol., 1986, 6, 2731 – 2733.

**BRADLEY B.S., KUMAR S.P., METHA P.N., EZHUTHACHAN S.G.**

Neonatal cushing syndrome resulting from serial courses of anténatal betamethasone.  
Obstet. Gynecol., 1994, 83, 869 – 872.

**BRANA C., AUBERT I., CHARRON G., et al.**

Ontogeny of the striatal neurons expressing the D2 dopamine receptor in humans : an in situ hybridization and receptor-binding study.  
Mol. Brain Res., 1997, 48, 389 – 400.

**CAREY R.M., THORNER M.O., et ORTT E.M.**

Effects of metoclopramide and bromocriptine on the renin-angiotensin-aldosterone system in man : dopaminergic control of aldosterone.  
J. Clin. Invest., 1979, 63, 727 – 735.

**CAREY R.M., et DRAKE C.R.**

Dopamine selectively inhibits aldosterone responses to angiotensin II in humans.  
Hypertension, 1986, 8, 399 – 406.

**CASTRO S.W., et STRANGE P.**

Differences in ligand binding properties of the short and long versions of the dopamine D2 receptor.  
J. Neurochem., 1993, 60, 372 – 375.

**CHALLIS J.R., JONES C.T., ROBINSON J.S.**

Development of fetal pituitary adrenal function.  
J. Steroid Biochem., 1977, 8, 471 – 478.

**CHARLTON B.G., NKOMAZANA O.F., Mc GADEY J., NEAL D.E.**

A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex.  
J. Anat., 1991, 176, 99 – 104.

**CHEN J., DINGER B., FIDONE S.J.**

Second messenger regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat carotid body.  
Biol. Signals, 1995, 4, 277 – 285.

**CHEN J.F., QIN Z.H., SZELE F., et al.**

Neuronal localization and modulation of the D2 dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6-hydroxydopamine.  
Neuropharmacology, 1991, 30 (9), 927 – 941.

**CHOI W.S., MACHIDA C.A., et RONNEKLEIV O.K.**

Distribution of dopamine D1, D2 and D3 mRNAs in the monkey brain : ribonuclease protection assay analysis.  
Mol. Brain Res., 1995, 31, 86 – 94.

**CIVELLI O., BUNZOW J.R., et GRANDY D.K.**

Molecular diversity of the dopamine receptors.  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, 32, 281 – 307.

**COHEN A.**

Plasma corticosterone concentrations in the fetal rat.  
Horm. Metab. Res., 1973, 5, 66 – 69.

**COOPER M.J., HUTCHINS G.M., ISRAEL M.A.**

Histogenesis of the Human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages.  
Am. J. Pathol., 1990, 137, 605 – 615.

**COULTER C.L., McMILLEN I.C., et BROWNE C.A.**

The catecholamine content of the perinatal rat adrenal gland.  
Gen. Pharmacol., 1988, 19 (6), 825 – 828.

**COUPLAND R.E., et WEAKLEY B.S.**

Developing chromaffin tissue in the rabbit : an electron microscopic study.  
J. Anat., 1968, 102, 425 – 455.

**COUPLAND R.E., WEAKLEY B.S.**

Electron microscopic observation on the adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue of the postnatal rabbits.  
J. Anat., 1970, 106, 213 – 231.

**COUPLAND R.E., PARKER T.L., KESSE W.K., MOHAMED A.A.**

The innervation of the adrenal gland. III Vagal innervation.  
J. Anat. 1989, 163, 173 – 181.

**CROWLEY P.A., CHALMERS I., KEIRSE M.J.N.C.**

The effects of corticosteroid administration before preterm delivery : a overview of the evidence from controlled trials.  
Br. J. Obstet. gynéco., 1990, 97, 11 – 25.

**CROWLEY P.A., MRCOG, FRCPI**

Antenatal corticosteroid therapy : a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1995, 173, 322 – 335.

**CUCHE J.L.**

Dopaminergic control of aldosterone secretion. State-of-the-art review.  
Fundam. Clin. Pharmacol., 1988, 2, 327 – 339.

**CZYZYK-KRZESKA M.F., BAYLISS D.A., LAWSON E.E., et MILLHORN D.E.**

Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia.  
J. Neurochem., 1992, 58, 1538 – 1546.

**DAHMER M.K., et SENOGLES S.E.**

Differential inhibition of secretagogue-stimulated sodium uptake in adrenal chromaffin cells by activation of D4 and D5 dopamine receptors.  
J. Neurochem., 1996, 67, 1960 – 1964.

**DALMAZ Y., PEQUIGNOT J.M., COTTET-EMARD J.M., et al.**

Sustained enhancement of the catecholamine dynamics in rat carotid bodies, adrenals, sympathetic ganglia and target organs under long-term moderate hypoxia.  
Biomed. Biochim. Acta, 1987, 46 (12), 899 – 902.

**DALMAZ Y., PEQUIGNOT J.M., TAVITIAN E., et al.**

Long-term hypoxia increases the turnover of dopamine but not norepinephrine in rat sympathetic ganglia.  
J. Aut. Nerv. Syst., 1988, 24, 57 – 64.

**DALY J.R., et EVANS J.L.**

Daily rhythms of steroid and associated pituitary hormones in man and their relationship to sleep.  
*In* : Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology / ed. par M.H. Briggs et G.A. Christie  
London, New York : Academic Press, 1974. – p. 61 – 110.

**DELPIANO M., HESCHELER J.**

Evidence for a PO<sub>2</sub> sensitive K<sup>+</sup> Channel in the type I cell of the rabbit carotid body.  
FEBS Lett., 1989, 249, 195 – 198.

**DEVASKAR U., DEVASKAR S.U., VOINA S., et al.**

GH stimulates adrenal steroidogenesis in the fetus.  
Nature, 1981, 290, 404 – 405.

**DUPOUY J.P.**

CRF activity in fetal rat hypothalamus in late pregnancy.  
Neuroendocrinology, 1975, 19, 303 – 313.

**DUPOUY J.P., et DUBOIS M.P.**

Ontogenesis of the  $\alpha$  MSH,  $\beta$  MSH and ACTH cells in the fetal hypophysis of the rat. Correlation with the growth of the adrenals and adrenocortical activity.  
Cell Tiss. Res., 1975, 161, 373 – 384.

**EDMONS C.J.**

Aldosterone secretion and its clinical disorders.  
*In* : General comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex / ed. par J.I. Chester et I.W. Henderson.  
London, New York, San Francisco : Academic Press, 1978. - 2, p. 565 – 599.

**EDWARDS C.R., et LAUDON J.**

Corticosteroids.  
*In* : Hormone assays and their clinical application / ed. par J.A. Loraine et E.T. Bell.  
Edinburgh, London, New York : Churchill Livingstone Ed., 1976. – p. 519 – 579.

**ELIOT R.J., LAM B.S., LEAKE R.D., et al.**

Plasma catécholamine concentrations in infants at birth and during the first 48 hours of life.  
J. Pediatr., 1980, 96, 311 – 315.

**ENGLE M.J., KEMMITZ J.W., RAO T.J., et al.**

Effects of maternal dexamethasone therapy on fetal lung development in the rhesus monkey.  
Am. J. Perinatol., 1996, 13 (7), 399 – 407.

**EVINGER M.J., ERNSBERGER P., REGUNATHAN S., et al.**

A single transmitter regulates gene expression through two separate mechanisms : cholinergic regulation of Phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA via nicotinic and muscarinic pathway.  
J. Neurosci., 1994, 14, 2106 – 2116.

**FANDREY J., et BUNN H.F.**

*In vivo* and *in vitro* regulation of erythropoietin mRNA : measurement by competitive polymerase chain reaction.  
Blood, 1993, 81, 617 – 623.

**FANDREY J.**

Hypoxia-inducible gene expression.  
Respir. Physiol., 1995, 101, 1 – 10.

**FAXELIUS G., HÄGNEVIK K., LAGERCRANTZ H., et al.**

Catecholamine surge and lung function after delivery.

Arch. Dis. Childr., 1983, 58, 262 – 266.

**FIDONE S.J., GONZALEZ C., YOSHIZAKI K.**

Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body *in vitro*.

J. Physiol., 1982, 333, 93 – 110.

**FIDONE S.J., DINGER B.G., GONZALEZ C.**

Mechanisms of carotid body chemoreception.

In : The lung biology in health and disease, Vol. 10 The regulation of breathing, ed par JA Dempsey et AI Pack.

New York, Dekker, 1995. - p. 391 – 471.

**FLORIO T., PAN M.G., NEWMAN B., et al.**

Dopaminergic inhibition of DNA synthesis in pituitary tumor cells is associated with phosphoprotein phosphatase activity.

J. Biol. Chem., 1992, 267, 24169 – 24172.

**FOUCART S., LACAILLE-BELANGER P., KIMURA T.R., et al.**

Modulation of adrenal catecholamine release by DA2 dopamine receptors in the anesthetized dog.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1988, 15, 601 – 611.

**FRAIL D.E., MANELLI A.M., WITTE D.G., et al.**

Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from goldfish retina : stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization.

Mol. Pharmacol., 1993, 44, 1113 – 1118.

**FRASER R., CONNELL M.C., INGLIS G., et al.**

The role of dopamine in the control of corticosteroid secretion and metabolism.

J. Steroid Biochem., 1989, 32, 217 – 222.

**FROHNA P.A., NEAL-BELIVEAU B.S., et JOYCE J.N.**

Neonatal 6-hydroxydopamine lesions lead to opposing changes in the levels of dopamine receptors and their messenger RNAs.

Neurosci., 1995, 68 (2), 505 – 518.

**GALLO-PAYET N., CHOUINARD L., BALESTRE M.N., et GUILLOIN G.**

Dual effects of dopamine in rat adrenal glomerulosa cells.

Biochem. Biophys. Res. Com., 1990, 172, 1100 – 1108.

**GARLAND J.S., BUCK R., LEVITON A.**

Effect of maternal glucocorticoid exposure on risk of severe intraventricular hemorrhage in surfactant-treated preterm infants.

J. Pediatr., 1995, 126, 272 – 279.

**GAUDA E.B., BAMFORD O., et GERFEN C.R.**

Developmental expression of tyrosine hydroxylase, D<sub>2</sub>-dopamine receptor and substance P genes in the carotid body of the rat.

Neurosci., 1996, 75 (3), 969 – 977.

**GERFEN C.R.**

The neostriatal mosaic multiple levels of compartmental organization.

Trends Neurosci., 1992, 15, 133 – 138.

**GIUSSANI D.A., McCARRIGLE H.H.G., BENNET L., et al.**

Carotid sinus nerve section delays the increase in plasma cortisol during acute hypoxia in chronically-prepared fetal sheep.

J. Physiol., 1994, 477 (1), 75 – 80.

**GOLDBERG L.L., VOLKMAN P.H., et KOHLL J.D.**

A comparison of the vascular dopamine receptors with other dopamine receptors.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1978, 18, 57 – 79.

**GOLDBERG M.A., DUNNING S.P., BUNN H.F.**

Regulation of the erythropoietin gene : evidence that the oxygen sensor is a heme protein.

Science, 1988, 242, 1412 – 1415.

**GOODYER P.R., et LAZARO-LOPEZ F.**

Antenatal betamethasone and renal ammoniogenesis in the newborn.

Dev. Pharmacol. Ther., 1981, 3, 139 – 143.

**GUPTA C., et YAFFE S.J.**

Reproductive dysfunction in female offspring after prenatal exposure to phenobarbital : critical period of action.

Pediatr. Res., 1981, 15, 1488 – 1491.

**HÄGNEVIK K., FAXELIUS G., IRESTEDT L., et al.**

Catecholamine surge and metabolic adaptation in the newborn after vaginal delivery and cesarean section.

Acta Paediat. Scand., 1984, 73, 602 – 609.

**HANUKOGLU I.**

Steroidogenic enzymes : structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis.

J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1992, 43, 779 – 804.

**HARDY J.A., WESTER P., BACKSTROM L., et GOTTFRIES J.**

The regional distribution of dopamine and serotonin uptake and transmitter concentrations in the human brain.

Neurochem. Int., 1987, 4, 445 – 450.

**HAYNES R.C.**

Theories on the mode of action of ACTH in stimulating secretory activity of the adrenal cortex.

In : Handbook of physiology. / ed. par H. Blasko, G. Sayers, A.D. Smith.

Washington : American Physiological Society Ed., 1975. – 4, p. 69 – 76.

**HEALY D.P., JAYARAMAN G., ASHIROVA O.**

Chemical hypoxia-induced increases in dopamine D1A receptor mRNA in renal epithelial cells are mediated by nitric oxide.

Acta Physiol. Scand., 2000, 168 (1), 233 – 238.

**HEYDECK D., ROIGAS J., ROIGAS C., et al.**

The catecholamine sensitivity of adult rats is enhanced after prenatal hypoxia.

Biol. Neonate, 1994, 66, 106 – 111.

**HOLGERT H., PEQUIGNOT J.M., LAGERCRANTZ H., et HÖKFELT T.**

Birth-related up-regulation of mRNA encoding tyrosine hydroxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, neuropeptide tyrosine, and prepro-enkephalin in rat adrenal medulla is dependent on postnatal oxygenation.

Pediatr. Res., 1995, 37 (6), 701 – 706.

**HORN A.S.**

Dopamine uptake : a review of progress in the last decade.

Progress in Neurobiology, 1990, 34, 387 – 400.

**HRISTIC M., KALAFATIC D., PLECAS B., JOVANOVIC V.**

The effect of dexamethasone on the adrenal gland in fetal and neonatal rats.  
J. Exp. Zool., 1995, 272, 281 – 290.

**HUANG L.E., WILLMORE W., GU J., et al.**

Inhibition of HIF-1 activation by carbon monoxide and nitric oxide : implications for oxygen sensing and signaling.  
J. Biol. Chem., 1999, 274, 9038 – 9044.

**HUETTL P., GERHARDT G.A., BROWNING M.D., MASSERANO J.M.**

Effects of dopamine receptor agonists and antagonists on catecholamine release in bovine chromaffin cells.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1991, 257, 567 – 574.

**HUEY K.A., POWELL F.L.**

Time-dependent changes in dopamine D(2)-receptor mRNA in the arterial chemoreflex pathway with chronic hypoxia.  
Brain Res. Mol. Brain Res., 2000, 75 (2), 264 – 270.

**IRESTEDT L., LAGERCRANTZ H., HJEMDAHL P., BELFRAGE P.**

Fetal and maternal plasma catecholamine levels at elective cesarean section in général or epidural anesthesia versus vaginal delivery.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1982, 142, 1004 – 1010.

**ITOH A., MIWA S., KOSHIMURA K., et al.**

Ischemia-induced changes in catecholamine release and their mechanisms : a study using cultured bovine adrenal chromaffin cells.  
Brain Res., 1994, 643, 266 – 275.

**IVERSEN L.**

Catecholamine up take processes.  
Br. Med. Bull., 1973, 28, 130 – 135.

**JABER M., TISON F., FOURNIER M.C., et BLOCH B.**

Differential influence of haloperidol and sulpiride on dopamine receptors and peptide mRNA levels in the rat striatum and pituitary.  
Mol. Brain Res., 1994, 23, 14 – 20.

**JACOBSON L., et SAPOLSKY R.**

The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.  
Endoc. Rev., 1991, 12, 118 – 134.

**JOBE A.H., POLK D., IKEGAMI M., et al.**

Lung responses to ultrasound guided fetal treatments with corticosteroids in preterm lambs.  
J. Appl. Physiol., 1993, 75, 2099 – 2105.

**JOHNSON J.W.C., MITZNER W., BECK J.C., et al.**

Long-term effects of betamethasone on fetal development.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1981, 141, 1053 – 1063.

**JOHNSON M., HANSON G.R., GIBB J.W., et al.**

Effect of neonatal hypoxia-ischemia on nigro-striatal dopamine receptors and on striatal neuropeptide Y, dynorphin A and substance P concentrations in rats.  
Dev. Brain Res., 1994, 83, 109 – 118.

**JUCHAU M.R.**

Drug biotransformation reactions in the plasma  
In : Perinatal pharmacology and therapeutics, ed. par Mirkin B.L.  
New York, Academic Press, 1976.- p. 71 – 118.

**JUNG A.B., BENNETT J.P.Jr.**

Development of striatal dopaminergic function. I. Pre- and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D<sub>1</sub> (D<sub>1A</sub>) and D<sub>2</sub> (D<sub>2A</sub>) receptors.

Dev. Brain Res., 1996, 94, 109 – 120.

**KALLIO J., KARLSSON R., TOPPARI J., et al.**

Antenatal dexamethasone treatment decreases plasma catecholamine levels in preterm infants.

Pediatr. Res., 1998, 43, 801 – 807.

**KARI M.A., HALLMAN M., ERONEN M., et al.**

Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant : a randomized placebo-controlled multicenter study.

Pediatrics, 1994, 93, 730 – 736.

**KEBADIEN J.W., et CALNE D.B.**

Multiple receptors for dopamine.

Nature, 1979, 277, 93 – 96.

**KHANDJIAN E.W.**

UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals.

Mol. Biol. Rep., 1986, 11, 107 – 115.

**KITAI S.T., et SURMEIER D.J.**

Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons.

Adv. neurol., 1993, 60, 40 – 52.

**KONDO H., KURAMOTO H., IWANAGA N.**

Immunohistochemical study on Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu-like immunoreactive nerve fibers in the rat adrenal medulla.

Brain Res., 1984, 310, 371 – 375.

**KONDO H.**

Immunohistochemical analysis of the localisation of neuropeptides in the adrenal gland.

Arch. Histol. Jap., 1985, 48, 453 – 481.

**KUMAR G.K., OVERHOLT J.L., BRIGHT G.R., et al.**

Release of dopamine and norepinephrine by hypoxia from PC-12 cells.

Am. J. Physiol., 1998, 274 (Cell Physiol. 43), C1592 – C1600.

**LACAZE-MASMONTEIL T.**

Corticothérapie anténatale et accélération de la maturation foetale. I. Données expérimentales et pharmacologiques.

Arch. Pédiatr., 1996, 3, 1111 – 1117.

**LAGERCRANTZ H.**

Catecholamine surge at birth in the human infant.

In : Catecholamines : basic and peripheral mechanisms.

New-York, 1984 – p. 113 – 120.

**LAGERCRANTZ H., et SLOTKIN T.A.**

The "stress" of being born.

Sci. Am., 1986, 254, 100 – 112.

**LAGERCRANTZ H.**

Stress, Arousal, and gene activation at birth.

News Physiol. Sci., 1996, 11, 214 – 218.

**LAHOSTE G.J., YU J., et MARSHALL J.F.**

Striatal Fos expression is indicative of dopamine D1/D2 synergism and receptor supersensitivity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 7451 – 7455.

**LAITINEN J.T.**

Dopamine stimulates K<sup>+</sup> efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation.  
J. Neurochem., 1993, 61, 1461 – 1469.

**LAJINESS M.E., CHIO C.L., et HUFF R.M.**

D2 dopamine receptor stimulation of mitogenesis in transfected chinese hamster ovary cells : relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1993, 267, 1573 – 1581.

**LANDIS S.C., et PATTERSON P.H.**

Neural crest cell lineages.  
Trends Neurosci., 1981, 4, 172 – 175.

**LE DOUARIN N.M., et DUPIN E.**

Cell lineage analysis in neural crest ontogeny.  
J. Neurobiol., 1993, 24, 146 – 161.

**LEON C., GRANT N., AUNIS D., LANGLEY K.**

Expression of cell adhesion molecules and catécholamines synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland.  
Dev. Brain Res., 1992, 70, 109 – 121.

**LIGGINS G.C., HOWIE R.N.**

A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants.  
Pediatrics, 1972, 50, 515 – 525.

**LIGGINS G.C., FARICLOUGH R.J., GRIEVES G.A., et al.**

The mechanism of initiation of parturition in the ewe.  
Rec. Prog. Horm. Res., 1973, 29, 111 – 150.

**LIGGINS G.C.**

Adrenocortical-related maturational events in fetus.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1976, 126, 931 – 939.

**LIN C.W., MILLER T.R., WITTE D.G. et al.**

Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells.  
Mol. Pharmacol., 1995, 47, 131 – 139.

**LLANOS A.J., RAMACHANDRAN J., CREASY R.K., et al.**

Melanocyte stimulating hormone and ACTH in the regulation of glucocorticoid secretion during the perinatal period in sheep.  
Endocrinology, 1979, 105, 613 – 617.

**LLEDO P.M., HOMBURGER V., BOCKAERT J., et VINCENT J.D.**

Differential G protein-mediated coupling of D-2 dopamine receptors to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in rat anterior pituitary cells.  
Neuron., 1992, 8, 455 – 463.

**LOPEZ-LOPEZ J.R., GONZALEZ C.**

Time course of K<sup>+</sup> current inhibition by low oxygen in chemoreceptor cells of adult rabbit carotid body.  
FEBS Lett., 1992, 299, 251 – 254.

**LOUIS T.M., CHALLIS R.G., ROBINSON J.S., THORBURN G.D.**

Rapid increase of fetal corticosteroids after prostaglandin E2.  
Nature, 1976, 264, 797 – 799.

**LUNDBERG J.M., HÖKFELT T., HEMSEN A., et al.**

Neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenaline cells of adrenal medulla and tumors and plasma of pheochromocytoma patients.  
Reg. Peptides, 1986, 13, 169 – 182.

**LYON R.A., TITELER M., BIGORNIA L., et SCHNEIDER A.S.**

D2 dopamine receptors on bovine chromaffin cell membranes : identification and characterization by [<sup>3</sup>H]N-Methylspiperone binding.  
J. Neurochem., 1987, 48, 631 – 635.

**MAC ARTHUR B.A., HOWIE R.N., DEZOETE J.A., ELKINS J.**

Cognitive and psychosocial development of 4-year-old children whose mothers were treated antenatally with betamethasone.  
Pediatrics, 1981, 68, 638 – 643.

**MAC ARTHUR B.A., HOWIE R.N., DEZOETE J.A., ELKINS J.**

School progress and cognitive development of 6-year-old children whose mothers were treated antenatally with betamethasone.  
Pediatrics, 1982, 70, 99 – 105.

**MAGYAR D.M., FRIDSHAL D., ELSNER C.W., et al.**

Time trend analysis of plasma cortisol concentrations in the fetal sheep in relation to parturition.  
Endocrinology, 1980, 107, 155 – 159.

**MALMBERG A.D., JACKSON D.M., ERIKSSON A., et MOHELL N.**

Unique binding characteristics of antipsychotic agents innervation with human D<sub>2A</sub>, D<sub>2B</sub>, and D<sub>3</sub> receptors.  
Mol. Pharmacol., 1993, 43, 749 – 754.

**MALOTEAUX J. M., VANISBERG M.A., LATERRE C. et al.**

[<sup>3</sup>H]GBR 12935 binding to dopamine uptake sites : subcellular localization and reduction in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy.  
Eur. J. Pharmac., 1988, 156, 331 – 340.

**MAMET J., PEYRONNET J., ROUX J.C., et al.**

Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat.  
Pediatr. Res., 2002, 51 (2), 207 – 214.

**MAROTO R., LOPEZ M.G., DEL VALLE M., et al.**

Expression of the bovine striatal D2 receptor, but not the D1 receptor, in bovine adrenal medulla.  
Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther., 1995, 47, 40.

**MATTHEWS S.G.**

Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS.  
Pediatr. Res., 2000, 47 (3), 291 – 300.

**Mc NULTY W.P., NOUY M.J., WALSH S.W.**

Fetal and postnatal development of the adrenal glands in macaca mulatta.  
Biol. Reprod., 1981, 25, 1079 – 1089.

**MICHELSON A.M., et ANDERSON D.J.**

Changes in competence determine the timing of two sequential glucocorticoid effects on sympathoadrenal progenitors.  
Neuron., 1992, 8, 589 – 604.

**MILLHORN D.E., CZYZYK-KRZESKA M., BAYLISS D.A., et LAWSON E.E**

Regulation of gene expression by hypoxia.  
Sleep, 1993, 16, S44 – S48.

**MISSALE C., CASTELLETTI L., MEMO M.**

Identification of postsynaptic D1 and D2 dopamine receptors in the cardiovascular system.  
J. Cardiovasc. Pharmacol., 1988, 11, 643 – 650.

**MISSALE C., LOMBARDI C., DE COTIIS R., et al.**

Dopaminergic receptor mechanisms modulating the renin-angiotensin system and aldosterone secretion : an overview.  
J. Cardiovasc. Pharmacol., 1989, 14, Suppl. 8, S29 – S39.

**MISSALE C., NASH S.R., ROBINSON S.W. et al.**

Dopamine receptors : from structure to function.  
Physiol. Rev., 1998, 78, 1, 189 – 225.

**MOCHIZUKI-ODA N., TAKEUCHI Y., MATSUMARA K., et al.**

Hypoxia-induced catecholamine release and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase via suppression of K<sup>+</sup> channels in cultured rat adrenal chromaffin cells.  
J. Neurochem., 1997, 69, 377 – 387.

**MODI N., LEWIS H., AL-NAQEEB N., et al.**

The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain.  
Pediatr. Res., 2001, 50 (5), 581 – 585.

**MOFTAQIR-HANDAJ A.**

Effet de l'exposition anténatale aux médicaments sur l'activité sympatho-adrénergique au cours du développement. 210 p.  
Doctorat de l'Université Henri Poincaré Nancy 1, 1997.

**MOFTAQIR-HANDAJ A., BARBE F., BARBARINO-MONNIER P., et al.**

Circulating chromogranin A and catecholamines in human fetuses at uneventful birth.  
Pediatr. Res., 1995, 37 (1), 101 – 105.

**MOFTAQIR-HANDAJ A., JAFARI S., BOUTROY M.J.**

Neonatal catecholamine content of adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue after prenatal exposure to dexamethasone.  
Pediatr. Res., 1999, 45, 60 – 65.

**MOJET M.H., MILLS E., et DUCHEN M.R.**

Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration.  
J Physiol., 1997, 504 (1), 175 – 189.

**MONTI-BLOCH L. , et EYZAGUIRRE C.**

A comparative physiological and pharmacological study of cat and rabbit carotid body chemoreceptors.  
Brain Res., 1980, 193, 449 – 470.

**MOODY C.A., ROBINSON S.R., SPEAR L.P., et SMOTHERMAN W.P.**

Fetal behavior and the dopamine system : activity effects of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor manipulations.  
Pharmacol. Biochem. Behav., 1993, 44 (4), 843 – 850.

**MUNCK A., GUYRE P.M., HOLBROOK N.J.**

Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions.  
Endoc. Rev., 1984, 5, 25 – 43.

**MURPHY B.E., et DIEZ d'AUX R.C.**

Steroid levels in the human fetus : cortisol and cortisone.  
J. Endocrinol. Metab., 1972, 35, 678 – 683.

**NAKAJIMA W., ISHIDA A., TAKADA G.**

Effect of anoxia on striatal monoamine metabolism in immature rat brain compared with that of hypoxia : an *in vivo* microdialysis study.  
Brain Res., 1996, 740, 316 – 322.

**NIH, consensus development conference statement**

The effects of antenatal steroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH consensus statement online.  
JAMA, 1995, 273, 413 – 418.

**NUSSDORFER G.G., MAZZOCHI G., ROBBA C., et al.**

Effects of ACTH and dexamethasone on the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex : an ultrastructural stereologic study.  
Acta Endocrinol., 1977, 85, 608 – 614.

**O'MALLEY K.L., HARMON S., TANG L. et TODD R.D.**

The rat dopamine D<sub>4</sub> receptor : sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system.  
New Biologist, 1992, 4, 137 – 146.

**OOMORI Y., OKUNO S., FUJISAWA K., et al.**

Tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve fibers in the separated capsule of the rat adrenal gland.  
Acta Anatomica, 1989, 136, 49 – 54.

**OOMORI Y., OKUNO S., FUJISAWA K., ONO K.**

Immunoelectron microscopic study of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibers and ganglion cells in the rat adrenal gland.  
Anat. Rec., 1991, 229, 407 – 414.

**PACIFICI G.M., et NOTTOLI R.**

Placental transfer of drugs administered to mothers.  
Clin. Pharmacokinet., 1995, 28, 235 – 269.

**PADBURY J.F., DIAKOMANOLIS E.S., LAM R.W., et al.**

Ontogenesis of tissue catecholamines in fetal and neonatal rabbits.  
J. Dev. Physiol., 1981, 3, 297 – 303.

**PADBURY J.F., et MARTINEZ A.M.**

Sympathoadrenal system activity at birth : integration of postnatal adaptation.  
Seminars Perinatol., 1988, 12 (2), 163 – 172.

**PARKER T.L., KESSE W.K., MOHAMED A.A., AFEWORK M.**

The innervation of the mammalian adrenal gland.  
J. Anat., 1993, 183, 265 – 276.

**PIOMELLI D., PILON C., GIROS B., et al.**

Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism.  
Nature, 1991, 353, 164 – 167.

**PONS J.C., GOUJARD J., DERBANNE C., TOURNAIRE M.**

Devenir des patientes exposées au diéthylstilboestrol.  
J. Gynecol. Biol. Reprod., 1988, 7, 307 – 316.

**PRESTWICH K.N., BUSS D.D., et POSNER P.**

A new method for raising neonatal rabbits in a hypoxic environment.  
J. Appl. Physiol. (Respirat. Environ. Exercise Physiol.), 1984, 57 (6), 1913 – 1916.

**PUPILLI C., LANZILLOTTI R., FIORELLI G., et al.**

Dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in adrenal medulla and pheochromocytoma.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1994, 79, 56 – 61.

**QUINN S.J.**

Regulation of aldosterone secretion.  
Ann. Rev. Physiol., 1988, 50, 409 – 426.

**RAYMOND R., MILLHORN D.E.**

Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during hypoxia : role of Ca<sup>2+</sup> and PKC.  
Kidney Intl., 1997, 51, 536 – 541.

**REY E., PONS G., OLIVE G.**

Les médicaments dans l'unité foeto-placentaire.  
In : Les traitements médicamenteux du fœtus, éd. par Springer-Verlag  
Paris, Recherche clinique et Décision thérapeutique, 1995 – p. 5 – 14.

**RIDER E.D., JOBE A.H., IKEGAMI M., et al.**

Antenatal betamethasone dose effects in preterm rabbits studied at 27 days gestation.  
J. Appl. Physiol., 1990, 68 (3), 1134 – 1141.

**RIQUELME R.A., LLANOS J.A., McCARRIGLE H.G., et al.**

Chemoreflex contribution to adrenocortical function during acute hypoxemia in the llama fetus at 0.6 to 0.7 of gestation.  
Endocrinology, 1998, 139, 2564 – 2570.

**ROBERTS J.M., JACOBS M.M., CHENG J.B., et al.**

Fetal pulmonary beta-adrenergic receptors : characterization in the human and *in vitro* modulation by glucocorticoids in the rabbit.  
Pediatr. Pulmonol., 1985, 1, S69 – S79.

**RYCHKOV G.Y., ADAMS M.B., McMILLEN I.C., et ROBERTS M.L.**

Oxygen-sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth.  
J. Physiol., 1998, 509 (3), 887 – 893.

**SAHEBJAMI H., et DOMINO M.**

Effects of postnatal dexamethasone treatment on development of alveoli in adult rats.  
Exp. Lung Res., 1989, 15, 961 – 969.

**SAMUELS L.T., et NELSON D.H.**

Biosynthesis of corticosterone.  
In : Handbook of physiology. / ed. par H. Blasko, G. Sayers, A.D. Smith.  
Washington : American Physiological Society Ed., 1975. – 4, p. 55 – 68.

**SCHEUERMANN D.W.**

Comparative morphology, cytochemistry and innervation of chromaffin tissue in vertebrates.  
J. Anat., 1993, 183, 327 – 342.

**SEEMAN P. et VAN TOL H.H.M.**

Dopamine receptor pharmacology  
Trends Pharmacol. Sci., 1994, 15, 264 – 270.

**SEIDL K., et UNSICKER K.**

The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis.  
*Dev. Biol.*, 1989, 136, 481 – 490.

**SEIDLER F.J., et SLOTKIN T.A.**

Adrenomedullary function in the neonatal rat : responses to acute hypoxia.  
*J. Physiol.*, 1985, 358, 1 – 16.

**SEMENZA G.L.**

Hypoxia-inducible Factor 1 : control of oxygen homeostasis in health and disease.  
*Pediatr. Res.*, 2001, 49 (5), 614 – 617.

**SIBLEY D.R., et MONSMA F.J.**

Molecular biology of dopamine receptors.  
*Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, 13, 61 – 69.

**SIMPSON E.R., MASON J.I.**

Molecular aspects of the biosynthesis of adrenal steroids.  
*Pharmacol. Therap.*, 1976, 2, 339 – 369.

**SLOTKIN T.A., et SEIDLER F.J.**

Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn : mechanisms and their role in stress and survival.  
*J. Dev. Physiol.*, 1988, 10, 1 – 16.

**SLOTKIN T.A., LAPPI E.C., Mc COOK E.C., et al.**

Glucocorticoids and the development of neuronal function : effects of prenatal dexamethasone exposure on central noradrenergic activity.  
*Biol. Neonate*, 1992, 61, 326 – 336.

**SNIDER S.R., BROWN R.M., et CARLSSON A.**

Changes in biogenic amine synthesis and turnover induced by hypoxia and/or foot shock stress. I. the adrenal medulla.  
*J. Neur. Transm.*, 1974, 35, 283 – 291.

**SOKOLOFF P., GIROS B., MARTRES M.P. et al.**

Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics.  
*Nature*, 1990, 347, 146 – 151.

**SOKOLOFF P., et SCHWARTZ J.C.**

Novel dopamine receptors half a decade later.  
*Trends Pharmacol. Sci.*, 1995, 16, 270 – 275.

**SOWERS J.R., TUCK M.L., GOLUB M.S., et SOLLARS S.E.**

Dopaminergic modulation of aldosterone secretion is independent of alterations in renin secretion.  
*Endocrinology*, 1980, 107, 937 – 941.

**SPANO P.F., GOVONI S., et TRABUCCHI M.**

Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system.  
*Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1978, 19, 155 – 165.

**STRANGE P.G.**

Aspects of the structure of the D2 dopamine receptor.  
*Trends Neurosci.*, 1990, 13, 9, 373 – 378.

**TAKAHASHI L.K.**

Prenatal stress : consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function.  
*Int. J. Dev. Neurosci.*, 1998, 16, 199 – 207.

**TANG L., TODD .D., HELLER A., et O'MALLEY K.L.**

Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 1994, 268, 495 – 502.

**TAYLOR S.C., et PEERS C.**

Hypoxia evokes catecholamine secretion from rat pheochromocytoma PC-12 cells.

Biochem. Biophys. Res. Com., 1998, 248, 13 – 17.

**THOMAS S.J., WILSON D.W., PIERRE-POINT C.G., et al.**

Measurement of cortisol, cortisone, 11-deoxycortisol and corticosterone in fetal sheep plasma during the périnatal period.

J. Endocrinol., 1976, 68, 181 – 189.

**THOMPSON R.J., JACKSON A., et NURSE C.A.**

Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells.

J Physiol., 1997, 498 (2), 503 – 510.

**THORBURN G.D., WATERS M.J., DOLLING M., YOUNG I.R.**

Fetal maturation and EGF.

Prog. Aust. Phys. Pharm. Soc., 1981, 12, 11 – 15.

**TISCHLER A.S., et DELELLIS R.A.**

The rat adrenal medulla. I. The normal adrenal.

J. Amer. Coll. Toxicol., 1988, 7, 1 – 21.

**TOMLINSON A., et COUPLAND R.E.**

The innervation of the adrenal gland. IV Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats.

J. Anat., 1990, 169, 209 – 236.

**TRAUTMAN P.D., MEYER-BAHLBURG H.F.L., POSTELNEK J., NEW M.I.**

Effects of early prenatal dexamethasone on the cognitive and behavioural development of young children : results of a pilot study.

Psychoneuroendocrinology, 1995, 20, 439 – 449.

**TUCHMANN-DUPLESSIS H., et MERCIER-PAROT L.**

Médicaments antiépileptiques et malformations congénitales.

Bull. Acad. Natl. Méd., 1973, 161, 352 – 356.

**UNSICKER K., SEIDL K., HOFMANN H.D.**

The neuro-endocrine ambiguity of sympathoadrenal cells.

Int. J. Dev. Neurosci., 1989, 7, 413 – 417.

**VALENTIJN J.A., VAUDRY H. et CAZIN L.**

Multiple control of calcium channel gating by dopamine D2 receptors in frog pituitary menotrophs.

Ann. NY Acad. Sci., 1993, 680, 211 – 228.

**VALLAR L., MUCA C., MAGNI M., et al.**

Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis in Ltk<sup>-</sup> fibroblastes. Hyperpolarization, and cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> concentration decrease in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells.

J. Biol. Chem., 1990, 265, 10320 – 10326.

**VARDELL I.M., POLAK J.M., TERENGI G., BLOOM S.R.**

Neuropeptide tyrosine (NPY) immunoreactivity in norepinephrine-containing cells and nerve of the mammalian adrenal gland.

Endocrinology, 1984, 114, 1460 – 1462.

**VERNA A., SCHAMEL A., LE MOINE C., et BLOCH B.**

Localization of dopamine D2 receptor mRNA in glomus cells of the rabbit carotid body by *in situ* hybridation.

J. Neurocytology, 1995, 24, 265 – 270.

**WALTERS D.V., et OLVER R.E.**

The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth.

Pediat. Res., 1978, 12, 239 – 242.

**WARD R.M.**

Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation.

In : Pediatrics in Perinatology : fetal drug therapy. Ed. par WB Saunders

Philadelphia, 1994, 21, 523 – 542.

**WATERMAN M.R., et SIMPSON E.R.**

Steroidogenic capacity in the adrenal cortex and its regulation.

Prog. Drug Res., 1990, 34, 359 – 381.

**WEINER D.M., LEVEY A.I., SUNAHARA R.K., et al.**

D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 1859 – 1863.

**WEINSHANK R.L., ADHAM N., MACCHI M. et al.**

Molecular cloning and characterization of high affinity dopamine receptor ( $D_{1b}$ ) and its pseudogene.

J. Biol. Chem., 1991, 266, 22427 – 22435.

**WHITE L.D., et LAWSON E.E.**

Effects of chronic prenatal hypoxia on tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine *N*-methyltransferase messenger RNA and protein levels in medulla oblongata of postnatal rat.

Pediatr. Res., 1997, 42 (4), 455 – 462.

**WINTOUR E.M., BROWN E.H., DENTON D.A., et al.**

The ontogeny and regulation of corticosteroid secretion by the ovine fetal adrenal.

Acta Endocrinol., 1975, 68, 181 – 189.

**WURTMAN R.J., et AXELROD J.**

Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids.

J. Biol. Chem., 1966, 241, 2301 – 2305.

**WURTMAN R.J., POHORECKY L.A., BALIGA B.S.**

Adrenocortical control of the biosynthesis of epinephrine and proteins in the adrenal medulla.

Pharmacol. Rev., 1972, 24, 411 – 426.

**XU S., MONSMA F.J.Jr, SIBLEY D.R., CREESE I.**

Regulation of  $D_{1A}$  and  $D_2$  dopamine receptor mRNA during ontogenesis, lesion and chronic antagonist treatment.

Life Sci., 1992, 50, 383 – 396.

**ZDILAR D., et LACKOVIC Z.**

Absence of [ $^3$ H]SCH 23390 binding sites in the rat adrenal gland.

J. Pharm. Pharmacol., 1989, 41, 646 – 648.

**ZELNIK N., ANGEL I., PAUL S.M., et KLEIMAN J.E.**

Decreased density of human striatal dopamine uptake sites with age.  
Eur. J. Pharmac., 1986, 126, 175 – 176.

**ZENTEL H.J., NOHR D., MULLER S., et al.**

Differential occurrence and distribution of galanin in adrenal nerve fibers and medullary cells in rodent and avian species.  
Neurosci.Lett., 1990, 120, 167 – 170.

**ZHU H., BUNN F.**

Oxygen sensing and signaling : impact on the regulation of physiologically important genes.  
Respir. Physiol., 1999, 115, 239 – 247.

**ZHU W.H., CONFORTI L., et MILLHORN D.E.**

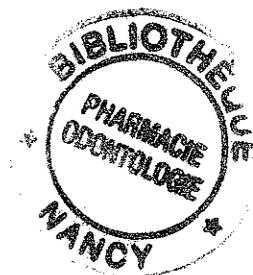
Expression of dopamine D<sub>2</sub> receptor in PC-12 cells and regulation of membrane conductance by dopamine.  
Am. J. Physiol., 1997, 273 (Cell Physiol. 42), C1143 – C1150.

## PRESENTATIONS et PUBLICATIONS

Ce travail a donné lieu aux communications et publications suivantes :

- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Betamethasone affects the expression of dopamine D1-receptor mRNA in the developing rabbit adrenal gland.  
Curr. Ther. Res., 2002 (article soumis)
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Age-related modulation of dopamine D1 receptor mRNA level by hypoxia in rabbit adrenal gland.  
Biol. Neonate, 2002 (article accepté pour publication)
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Antenatal treatment with corticosteroids affects mRNA expression of dopamine D1 and D2 receptors in the striatum of developing rabbit.  
Biol. Neonate, 2002, 82 (2), 142 – 144.
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Antenatal treatment with corticoids affects the expression of dopamine D1-receptor mRNA in the adrenals of developing rabbits.  
ESPD 8<sup>th</sup> Biennial Congress, Liège. 25 – 28 Octobre 2002.
- **LABAUNE J.M., BAIRAM A., G.PUTET, BOUTROY M.J.**  
Effet de l'hypoxie sur l'expression de l'ARNm du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale de lapin nouveau-né.  
7<sup>ème</sup>s Journées Francophones de recherche en néonatalogie, Bordeaux. 13 – 15 Décembre 2001.
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Expression de l'ARNm du récepteur dopaminergique D1 dans la glande surrénale : effet d'une corticothérapie néonatale.  
5<sup>èmes</sup> Journées Francophones de recherche en néonatalogie, Rouen. 16 – 18 Décembre 1999.
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Expression du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale de lapins en développement : ontogenèse et effet d'une corticothérapie néonatale.  
29<sup>èmes</sup> Journées nationales de la société française de médecine périnatale.  
Publication par M.Collet et A.Treissier / Ed. Arnette – 1999, p. 35 – 38.

- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Expression du récepteur dopaminergique D1 dans la surrénale de lapins en développement : ontogenèse et effet d'une corticothérapie néonatale.  
29èmes Journées nationales de la société française de médecine périnatale.  
Monaco. 28 – 29 Octobre 1999.
  
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Récepteur dopaminergique D1 : effet de l'exposition anténatale à la bétaméthasone sur l'expression de l'ARNm dans le striatum de lapin en développement.  
Médecine et Science, 1999, 15 (Supp n° 2), 100.
  
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Corticothérapie anténatale et expression de l'ARNm des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le striatum de lapin en développement.  
Journée de recherche de l'Université Laval, Québec – Canada. 25 Mai 1999.
  
- **LABAUNE J.M., BOUTROY M.J., BAIRAM A.**  
Expression de l'ARNm du récepteur dopaminergique D1 dans la glande surrénale de lapin en développement.  
Journée de recherche de l'Université Laval, Québec – Canada. 25 Mai 1999.



Pour la réalisation de ce projet de recherche, le doctorant a été lauréat en 1997 de la bourse de recherche de la société Evian, et lauréat en 1997 de la bourse de voyage de la Société française de Médecine Périnatale. Il a, par ailleurs, bénéficié du soutien de l'Association Développement humain.

Nom, prénom : **Jean-Marc LABAUNE**



Nature de la thèse : cotutelle France Quebec

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Biologie - Santé - Environnement**

**VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER**

Nancy, le 9 janvier 2003 n°733

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



**Claude BURLET**

## RESUME

La glande surrénale est au centre des mécanismes qui régissent l'homéostasie des grandes fonctions des organismes vivants supérieurs. Afin d'assurer sa fonction, même au début du développement, elle possède la faculté de moduler son activité en réponse à des stimuli, physiologiques comme l'hypoxie ou pharmacologiques comme une exposition anténatale aux corticoïdes exogènes (recours thérapeutique largement répandu aujourd'hui pour accélérer la maturation pulmonaire fœtale en cas de risque d'une naissance prématurée). Cependant, les voies neurogéniques de contrôle surrénalien ne deviennent matures que bien après la naissance dans de nombreuses espèces dont l'Homme. Le système ubiquitaire des récepteurs dopaminergiques constitue un des éléments intervenant très probablement dans les mécanismes non neurogéniques qui participent à la régulation de cette réponse surrénalienne, notamment pendant la période périnatale. Il jouerait ainsi un rôle dans l'adaptation néonatale.

Le récepteur dopaminergique D1 (R DA D1) est présent dans la glande surrénale, mais son expression a été peu étudiée. En raison d'analogies dans l'ontogenèse du tissu nerveux sympathico-adrénergique entre les espèces humaine et lapine, nous avons entrepris une étude expérimentale utilisant le lapin comme modèle animal.

Une étude préliminaire s'est attachée à évaluer la modulation de l'expression de l'ARN messager (ARNm) des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le striatum au cours du développement après exposition anténatale à un corticoïde, la bétaméthasone. Ce système de neurotransmission très élaboré, et particulièrement bien étudié, constitue un système de référence. Ceci nous a permis de valider nos techniques moléculaires d'analyse de type Northern Blot. Les résultats montrent une sur-expression des ARNm des 2 récepteurs chez le fœtus exposé, puis une sous-expression à 1 et 25 jours postnataux avec retour à la normale chez l'adulte.

Le travail a été alors axé sur le R DA D1 dans la glande surrénale. L'analyse par Northern Blot a montré que l'expression du récepteur dopaminergique D1 est présente dès le stade fœtal et jusqu'à l'âge adulte, sans modulation âge-dépendante. Après traitement anténatal aux corticoïdes, il est constaté une sur-expression chez le fœtus, qui se prolonge à 1 et 25 jours de vie pour disparaître chez l'adulte. L'étude a été complétée par l'analyse postnatale de la modulation d'expression de l'ARNm du R DA D1 après exposition à l'hypoxie (4 conditions expérimentales ont été appliquées:  $F_iO_2$  15% pendant 6 ou 24 heures, et  $F_iO_2$  8% 6 ou 24 heures). Quelle que soit la durée ou l'intensité de l'hypoxie, il est mis en évidence une diminution d'expression uniquement chez le nouveau-né de 1 jour. Il n'y a pas de modulation à 25 jours ou chez l'adulte, alors que le contrôle neurogénique s'est installé.

Ce travail, qui a fait l'objet d'une convention de cotutelle France-Québec, prouve l'existence d'une expression de l'ARNm du R DA D1 dans la glande surrénale de lapin précocement au cours du développement. Il montre le caractère modulable de cette expression sous l'influence de stimuli physiologique ou pharmacologique.

Enfin, il met l'accent sur les effets potentiels postnataux à moyen et long terme d'une thérapie administrée en anténatal. De même, il permet de souligner la différence de réponse selon l'âge postnatal auquel est appliqué un stimulus hypoxique.

**Mots clés :** Glande surrénale, Récepteur dopaminergique, Corticoïdes, Hypoxie, Nouveau-né, Développement.