

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE

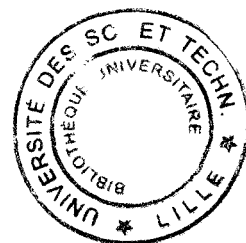
THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Jean LESAGE



CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION PRENATALE A LA MORPHINE SUR L'AXE HYPOTHALAMO- HYPOPHYSO-SURRENALIEN DU RAT NOUVEAU-NE

Soutenue le Janvier 1998 devant la commission d'examen :

PRESIDENT : Professeur H. SEQUEIRA - USTL ; Lille I

RAPPORTEURS : Professeur F. BERNET - USTL ; Lille I
: Docteur M. GRINO - INSERM ; Marseille
: Docteur P. MORMEDE - INRA ; Bordeaux

EXAMINATEURS : Professeur J.P. DUPOUY - USTL ; Lille I
: Professeur C.Y. GUEZENNEC - IMASSA ; Brétigny-sur-Orge

à Séverine.

A mes parents, à ma grand-mère,
à mes soeurs, neveux et beaux-frères pour leur
soutien et les encouragements qu'ils ont su me prodiguer.
Qu'ils reçoivent ici la marque de toute mon affection.

A Patricia et Serge Hannet et Huguette Debrauwer
pour leur soutien et le remarquable travail de dactylographie et
d'iconographie de ce mémoire. Veuillez trouver ici ma reconnaissance
et ma sincère gratitude pour votre disponibilité et votre sympathie.

J'exprime mes plus sincères remerciements à :

Monsieur H. Sequeira, qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur F. Bernet, pour son active collaboration à l'aboutissement de mon travail. Je lui exprime toute ma gratitude pour ses nombreux conseils, sa disponibilité et sa sympathie tout au long de ces trois années. Je le remercie d'avoir eu l'amitié d'être le rapporteur de cette thèse.

Monsieur M. Grino, avec qui j'ai collaboré fructueusement. Son esprit scientifique et ses grandes connaissances resteront pour moi un exemple. Je lui témoigne ici ma plus vive reconnaissance pour sa sympathie et l'honneur qu'il me fait d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur P. Mormède, d'avoir accepté de consacrer une partie de son temps précieux à être rapporteur de ce travail.

Monsieur J.P. Dupouy, qui m'a fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant de m'avoir guidé tout au long de cette étude et pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder. Qu'il trouve ici l'expression de mon admiration pour l'exemple de compétence et de ténacité qu'il représente.

Monsieur (Mon Colonel) C.Y. Guezennec, qui m'a accueilli, cette année dans son laboratoire de Neurophysiologie à l'IMASSA, pour mon service national. Je le remercie pour la collaboration que j'espère durable entre nos laboratoires, et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à ce jury.

Ce travail à été réalisé au sein du laboratoire de NEUROENDOCRINOLOGIE DU DEVELOPPEMENT (JE 234 de la DRED), de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I.

Mes remerciements s'adressent également tout particulièrement au Docteur C. Laborie, pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire. Sa collaboration technique, son amitié, nos échanges d'idées et les multiples services et encouragements qu'elle m'a dispensés durant ces années m'ont été très bénéfiques et d'un grand réconfort.

Un grand MERCI à V. Montel pour sa gentillesse et son assistance technique, aussi efficace qu'amicale et dévouée.

A Y. Dodey pour d'innombrables services de dactylographie, toujours offert avec tellement de gentillesse.

A F. Lefevre, C. Guichard et J. Bernard pour leur collaboration technique plus que précieuse.

A tous les membres du laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement, qui m'ont intégré au sein de ce laboratoire ; MERCI pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Enfin, je tiens aussi à remercier tous mes amis enseignants et étudiants du laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annélides de l'USTL, dont l'amitié et les nombreux services m'ont permis de surmonter toutes les périodes de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I INTRODUCTION.....	2
I.1. HISTORIQUE DE L'USAGE DES OPIACES PAR L'HOMME.....	2
I.2. HEROINE ET GROSSESSE : DONNEES CLINIQUES.....	3
I.3. DONNEES EXPERIMENTALES.....	4

GENERALITES

II RAPPELS SUR LE CONTROLE CENTRAL DES FONCTIONS CORTICOTROPE ET GONADOTROPE HYPOPHYSAIRES.....	8
II.1. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN.....	8
II.1.1. <i>Hypothalamus et corticolibérine (CRF)</i>	8
II.1.2. <i>Hypophyse et corticostimuline (ACTH)</i>	10
II.1.3. <i>Surrénale et corticostéroïdes</i>	11
II.1.4. <i>Transport des corticostéroïdes</i>	11
II.1.5. <i>Les récepteurs aux corticostéroïdes</i>	12
II.1.5.1. Généralités.....	12
II.1.5.2. Particularités des récepteurs cérébraux.....	13
II.1.6. <i>La régulation par rétroaction de la fonction corticotrope hypophysaire</i>	14
II.1.6.1. La rétroaction courte.....	14
II.1.6.2. La rétroaction longue.....	14
II.1.7. <i>Ontogenèse de l'axe corticotrope</i>	15
II.2. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE.....	17
II.2.1. <i>L'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire</i>	17
II.2.2. <i>L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien</i>	17
II.2.3. <i>La gonadolibérine hypothalamique</i>	17
II.2.4. <i>Gonadotropines hypophysaires</i>	19
II.2.5. <i>Ontogénèse de l'axe gonadotrope</i>	20
II.3. ONTOGENESE DE SYSTEMES NEURONAUX HYPOTHALAMIQUES IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS CORTICOTROPE ET GONADOTROPE HYPOPHYSAIRES.....	21
II.3.1. <i>Le système sérotoninergique</i>	21
II.3.2. <i>Le système catécholaminergique</i>	22
II.3.3. <i>Le système NPYergique</i>	23

PREMIERE PARTIE

Etude Préliminaire : Evolution des métabolismes hypothalamiques de neurotransmetteurs (Sérotonine, Noradrénaline, Dopamine, Neuropeptide Y) en relation avec l'activation des axes gonadotrope et corticotrope au cours de la période postnatale précoce chez le rat.....	25
I. INTRODUCTION.....	26

I.1. L'HYPERACTIVITE TESTICULAIRE DU NOUVEAU-NE.	26
I.2. L'ACTIVITE GLUCOCORTICOIDE SURRENALIENNE DU NOUVEAU-NE.	28
I.3. AUTRES FONCTIONS ENDOCRINIENNES MAJEURES ACTIVEES A LA NAISSANCE.	28
I.3.1. <i>Fonction minéralocorticoïde et système rénine angiotensine.</i>	28
I.3.2. <i>Fonction thyroïdienne.</i>	28
I.3.3. <i>Fonction pancréatique endocrine.</i>	29
I.4. BUT DE L'ETUDE PRELIMINAIRE.	29
II. MATERIEL ET METHODES.....	29
II.1. ANIMAUX, TRAITEMENTS ET PRELEVEMENTS.	29
II.1.1. <i>Les animaux.</i>	29
II.1.2. <i>Prélèvement des foetus à terme.</i>	30
II.1.3. <i>Collecte et stockage des échantillons biologiques.</i>	30
II.1.3.1. Sang	30
II.1.3.2. Hypothalamus.	30
II.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES HORMONES.	31
II.2.1. <i>Dosage des hormones circulantes.</i>	31
II.2.1.1. Extraction des hormones stéroïdes du plasma.	31
II.2.1.2. Testostérone.	31
II.2.1.3. Oestradiol.	32
II.2.1.4. Corticostérone.	33
II.2.1.5. Dosage de l'ACTH.	33
II.2.2. <i>Dosage du neuropeptide Y hypothalamique.</i>	34
II.3. DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (HPLC) DE NEUROTRANSMETTEURS ET DE LEURS METABOLITES	34
II.3.1. <i>Principe et matériel de mesure.</i>	34
II.3.2. <i>Dosage des neuromédiateurs et de leurs métabolites.</i>	35
II.4. STATISTIQUES.	35
III. RESULTATS.....	35
III.1. ANIMAUX ETUDIES.	35
III.2. EVOLUTIONS DES METABOLISMES HYPOTHALAMIQUES D'AMINES BIOGENES ET DU NPY	35
III.2.1. <i>La Sérotonine (5HT) et le 5HIAA.</i>	35
III.2.2. <i>La noradrénaline (NA) et le MHPG.</i>	36
III.2.3. <i>La dopamine (DA), le DOPAC et le HVA.</i>	36
III.2.4. <i>Le Neuropeptide Y (NPY).</i>	36
III.3. EVOLUTION DES TAUX D'HORMONES CIRCULANTES.	37
III.3.1. <i>L'ACTHémie.</i>	37
III.3.2. <i>La corticostéronémie.</i>	37
III.3.3. <i>La testostéronémie.</i>	37
III.3.4. <i>L'oestradiolémie.</i>	37
IV DISCUSSION	37
IV.1. L'ACTIVATION GONADIQUE NEONATALE.....	37
IV.2. L'ACTIVATION SURRENALIENNE NEONATALE.....	38
IV.3. EVOLUTION DU METABOLISME HYPOTHALAMIQUE DES CATECHOLAMINES.....	39
IV.4. EVOLUTION DU METABOLISME HYPOTHALAMIQUE DE LA SEROTONINE.....	40
IV.5. EVOLUTION DU CONTENU HYPOTHALAMIQUE EN NPY.....	42

DEUXIEME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur l'évolution des métabolismes hypothalamiques de différents neurotransmetteurs (Sérotonine, Noradrénaline, Neuropeptide Y) en relation avec l'activation des axes gonadotrope et corticotrope au cours de la période postnatale précoce chez le rat. 44

I. INTRODUCTION..... 45

I.1. LES SYSTEMES OPIOIDES..... 45

1.1.1. Mise en évidence des récepteurs opiacés.....	45
1.1.1.1. Les différents types de récepteurs aux opiacés.....	45
1.1.1.2. Les mécanismes de transduction membranaire.....	46
1.1.2. Les peptides opioïdes endogènes.....	46
I.2. MECANISME D'ACTION DE LA MORPHINE.....	47
I.3. BUT DE L'ETUDE.....	47
I.4. CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL ET DU PROTOCOLE DE TRAITEMENT.....	49
II. MATERIEL ET METHODES.....	49
II.1 ANIMAUX, TRAITEMENTS ET PRELEVEMENTS.....	49
II.1.1. Les animaux.....	49
II.1.2. Les traitements.....	49
II.1.3. Prélèvement des foetus, collecte et stockage des échantillons biologiques.....	50
II.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES HORMONES DANS LE SANG ET DU NPY DANS L'HYPOTHALAMUS.....	50
II.2.1. Dosage du contenu testiculaire en testostérone.....	50
II.3. DOSAGE PAR HPLC DE NEUROMEDiateURS ET DE LEURS METABOLITES.....	50
II.4. STATISTIQUES.....	50
III. RESULTATS.....	51
III.1. ANIMAUX ETUDIES.....	51
III.2. CONSEQUENCES DU TRAITEMENT PRENATAL A LA MORPHINE SUR L'EVOLUTION DES METABOLISMES HYPOTHALAMIQUES D'AMINES BIOGENES ET DU NPY.....	51
III.2.1. La Sérotonine (5HT) et le 5HIAA.....	51
III.2.2. La noradrénaline (NA) et le MHPG.....	52
III.2.3. Le neuropeptide Y.....	52
III.2.4. Masse surrénalienne et corticostéronémie.....	52
III.2.5. Masse testiculaire, testostérone tissulaire et plasmatique.....	53
III.2.6. Oestradiolémie.....	53
IV DISCUSSION.....	53
IV.1. CONSEQUENCE SUR L'ACTIVITE TESTICULAIRE NEONATALE.....	53
IV.2. CONSEQUENCE SUR L'OESTRADIOLEMIE DURANT LA PERIODE NEONATALE.....	54
IV.3. CONSEQUENCES SUR LA MASSE DES SURRENALES ET L'ACTIVATION SURRENALIENNE NEONATALE.....	54
IV.4. CONSEQUENCES SUR LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE.....	55
IV.5. CONSEQUENCES SUR LE SYSTEME NORADRENERGIQUE.....	56
IV.6. CONSEQUENCES SUR L'EVOLUTION DU CONTENU HYPOTHALAMIQUE EN NPY.....	57

TROISIEME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde de la surrénale du rat nouveau-né..... 59

I. INTRODUCTION.....	60
I.1. LA FONCTION MINERALOCORTICOIDE SURRENALIENNE.....	60
I.1.1. Régulation systémique de la sécrétion d'aldostérone.....	61
I.1.2. Régulation paracrine et nerveuse de la sécrétion d'aldostérone.....	61
I.1.3. Régulation autocrine de la sécrétion d'aldostérone.....	62
I.2. BUT DE L'ETUDE.....	63
II. MATERIEL ET METHODES.....	63
II.1 ANIMAUX, TRAITEMENTS, PRELEVEMENTS ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS.....	63
II.2. ETUDES <i>IN-VITRO</i>	64
II.3. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN Na ⁺ ET K ⁺	64
II.4. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ALDOSTERONE.....	64
II.5. ANALYSE STATISTIQUE.....	65
III. RESULTATS.....	65

III.1. ANIMAUX ETUDIÉS	65
III.2. EFFETS DE L'EXPOSITION PRÉNATALE A LA MORPHINE SUR LA FONCTION MINERALOCORTICOÏDE SURRENALIENNE DU RAT NOUVEAU-NE	66
III.2.1. Aldostérone plasmatique et surrénalienne au cours de la période postnatale précoce.	66
III.2.2. Natrémie et kaliémie.	66
III.2.3. Sécrétion d'aldostérone par les surrénales in-vitro.	66
III.2.3.1. En réponse à l'ACTH ₁₋₂₄	66
III.2.3.2. En réponse à l'angiotensine II	66
IV DISCUSSION	67

QUATRIÈME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur l'axe corticotrope et la CBG plasmatique du rat nouveau-né.	69
---	-----------

I. BUT DE L'ÉTUDE	70
--------------------------------	-----------

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.	70
---------------------------------------	-----------

II.1 ANIMAUX, TRAITEMENTS, PRÉLEVEMENTS ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS.	70
II.2. ÉTUDES <i>IN-VITRO</i>	71
II.3. HYBRIDATION <i>IN-SITU</i>	71
II.3.1. Coupe des tissus.	71
II.3.2. Les sondes d'hybridation.	71
II.3.2.1. Nature des sondes.	71
II.3.2.2. Marquage des sondes.	72
II.3.3. Réalisation de l'hybridation in-situ.	72
II.3.3.1. Prétraitement.	72
II.3.3.2. Hybridation.	72
II.3.3.3. Lavages.	73
II.3.3.4. Révélation du signal radioactif.	73
II.3.4. Quantification du signal.	73
II.4. ANALYSE PAR NORTHERN BLOT DES ARNm DU CRF HYPOTHALAMIQUE.	73
II.4.1. Extraction et mesure de la concentration en ARN totaux.	73
II.4.2. Séparation des ARN totaux par électrophorèse et transfert sur membrane.	74
II.4.2.1. Préparation des échantillons.	74
II.4.2.2. Électrophorèse.	74
II.4.2.3. Transfert des ARN totaux.	75
II.4.3. Hybridation des membranes.	76
II.4.3.1. Marquage des sondes ADNc.	76
II.4.3.2. Préhybridation et hybridation.	76
II.4.3.3. Lavages.	76
II.4.4. Autoradiographie.	76
II.4.5. Deshybridation et réhybridation avec la sonde témoin.	76
II.4.6. Mesure du signal d'hybridation.	77
II.5. MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DU CRF DANS L'ÉMINENCE MÉDIANE (EM).	77
II.6. MESURE DE LA CAPACITÉ DE LIAISON DE LA CBG PLASMATIQUE.	77
II.7. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES.	78
II.7.1. Dosage du CRF hypothalamique.	78
II.8. ANALYSE STATISTIQUE.	79

III. RESULTATS.	79
-----------------------------	-----------

III.1. ANIMAUX ETUDIÉS	79
III.2. EFFETS DE L'EXPOSITION PRÉNATALE A LA MORPHINE SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSSO-SURRENALIEN.	79
III.2.1. Sécrétion surrénalienne de corticostérone en réponse à l'ACTH ₁₋₂₄ in vitro.	79
III.2.2. Sécrétion adénohypophysaire d'ACTH en réponse au CRF in-vitro.	80
III.2.3. Contenu adénohypophysaire en ARNm de la POMC.	80

III.2.4. Contenu en CRF et en ARNm du CRF dans l'hypothalamus, et immunoréactivité CRF dans l'éminence médiane.....	80
III.3. EFFETS DE L'EXPOSITION PRENATALE A LA MORPHINE SUR LA CBG, SUR LA MASSE DU FOIE DU NOUVEAU-NE, ET SUR LA CORTICOSTERONEMIE MATERNELLE.....	80
IV DISCUSSION	80
IV.1. EFFETS DE LA MORPHINE SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN.....	80
IV.2. EFFETS DE LA MORPHINE SUR LE FOIE ET LA CBG PLASMATIQUE.....	82

CINQUIEME PARTIE

Effets de la surrénalectomie maternelle sur les conséquences d'une exposition prénatale à la morphine sur l'axe corticotrope et la surrénale du rat nouveau-né.....	83
--	-----------

I. INTRODUCTION.....	84
-----------------------------	-----------

I.1. TRANSFERT PLACENTAIRE DES GLUCOCORTICOIDES AU COURS DE LA GESTATION.....	84
I.2. BUT DE L'ETUDE.....	85

II. MATERIEL ET METHODES.....	86
--------------------------------------	-----------

II.1 ANIMAUX : OPERATIONS, TRAITEMENTS ET PRELEVEMENTS.....	86
II.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES HORMONES.....	86
II.3. QUANTIFICATION DES ARNm DU CRF ET DE LA POMC PAR HYBRIDATION <i>IN-SITU</i> ET MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DU CRF.....	87
II.4. STATISTIQUES.....	87

III. RESULTATS.....	87
----------------------------	-----------

III.1. CONTENU HYPOTHALAMIQUE EN CRF ET CORTICOSTERONEMIE CHEZ LES MERES.....	87
III.2. MASSE SURRENALIENNE.....	87
III.3. CORTICOSTERONE SURRENALIENNE ET PLASMATIQUE.....	88
III.4. CONTENU ADENOHYPOPHYSAIRE EN ARNm DE LA POMC.....	88
III.5. CONTENU HYPOTHALAMIQUE EN CRF ET ARNm DU CRF.....	88
III.6. ALDOSTERONE PLASMATIQUE ET SURRENALIENNE.....	88
III.7. ALDOSTERONEMIE MATERNELLE.....	89

IV DISCUSSION	89
----------------------------	-----------

IV.1. EFFET DE L'INJECTION DE MORPHINE A DES FEMELLES GESTANTES SUR L'ACTIVITE DE LEUR AXE CORTICOTROPE.....	89
IV.2. EFFET DE L'INJECTION DE MORPHINE A DES MERES SURRENALECTOMISEES SUR L'AXE CORTICOTROPE DU NOUVEAU-NE ET LA FONCTION GLUCOCORTICOIDE DES SURRENALES.....	90
IV.3. EFFET DE L'INJECTION DE MORPHINE A DES MERES SURRENALECTOMISEES SUR LA FONCTION MINERALOCORTICOIDE DES SURRENALES DU NOUVEAU-NE.....	91

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	92
--	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
---	-----------

ANNEXES.....	127
---------------------	------------

INTRODUCTION

I INTRODUCTION

I.1. Historique de l'usage des opiacés par l'homme.

Les opiacés figurent parmi les plus anciennes et les plus importantes substances utilisées par l'homme à des fins thérapeutiques puisque les premiers usages comme substances médicamenteuses remontent à l'antiquité. L'opium, extrait du pavot, fut utilisé par GALIEN, médecin grec du II^{ème} siècle, pour combattre les maux de tête, les troubles de la vésicule biliaire, les coliques, les calculs rénaux ainsi que pour calmer l'agitation respiratoire liée à l'asthme et aux insuffisances cardiaques.

L'opium est connu depuis longtemps non seulement pour ses remarquables vertus analgésiques, mais également pour ses effets psychotropes. Les grecs l'utilisaient déjà durant l'Antiquité tout autant pour l'agrément qu'il procurait que pour ses effets médicamenteux. On retrouve dans l'*Odyssee*, poème écrit par HOMERE vers le IX^{ème} ou VIII^{ème} siècle av. J. C., la trace d'une substance extraite d'une plante, appelée *népenthes*, célèbre dans l'Antiquité grecque comme remède magique contre la tristesse, dont les effets, qui procuraient bien-être et tranquillité, sont bien caractéristiques de ceux que la Science moderne attribue aujourd'hui aux opiacés. Dans la culture romaine, l'opium à une importance patente, ne représentait-on pas SOMNUS, le dieu romain du sommeil, portant un récipient empli de jus de pavot.

Jusqu'à l'aube du XIX^{ème} siècle, l'utilisation d'opium à des fins thérapeutiques ou psychotropes va rester cantonnée à une petite fraction de la population qui avait accès aux pratiques médicales. Le XIX^{ème} siècle est néanmoins marqué par deux événements majeurs qui vont rendre populaire l'utilisation de l'opium davantage pour ses propriétés euphorisantes que pour ses vertus analgésiques. Le premier est l'isolement en 1805 par l'allemand SERTURNER du principe actif du pavot, baptisé Morphine par référence au nom de MORPHEE, le dieu grec des rêves ; le second est l'invention en 1853 par l'anglais WOOD de la seringue hypodermique qui, en permettant l'administration intraveineuse plutôt qu'orale de la drogue, accélérera l'apparition de ses effets par ailleurs plus intenses. Cependant, l'utilisation abusive de cette drogue n'est pas sans conséquences à court ou à long terme puisque, déjà au XVI^{ème} siècle, des médecins avaient décrit chez les toxicomanes d'une part, les premiers symptômes de la tolérance, marquée par l'impérieuse nécessité d'utiliser la drogue à des doses croissantes pour obtenir les effets souhaités, et d'autre part, le phénomène de la dépendance physique et psychique liée à l'utilisation de l'opium.

Durant la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, la morphine utilisée pour ses vertus analgésiques va être administrée à grande échelle notamment en Europe durant la guerre de 1870 et aux Etats-Unis au cours de la guerre de Sécession (1861 - 1865), mettant ainsi en état de dépendance nombre de soldats rentrés dans leurs foyers.

Dans l'Europe du XIX^{ème} siècle, l'utilisation de cette drogue pour ses vertus psychotropes demeurera restreinte à certains milieux intellectuels et littéraires dans le

but de stimuler la créativité ou comme échappatoire. Mais, peu à peu, l'usage abusif de la morphine va s'amplifier et s'étendre à l'ensemble du corps social.

Au début du XXème siècle est synthétisée l'héroïne, molécule de morphine sur laquelle sont greffés deux groupements acétyles (Fig. 1) qui, grâce à sa plus grande liposolubilité, pénètre plus facilement dans le système nerveux et agit plus rapidement que la morphine. La mise sur le marché de l'héroïne va être à l'origine d'un des fléaux de ce siècle, à savoir la dépendance aux drogues dures, opiacés en général, héroïne en particulier.

Dans notre société actuelle, la consommation accrue d'héroïne, constitue un des problèmes majeurs de santé publique. Elle représente un véritable danger tant sur le plan sanitaire que sur le plan socio-économique dont les effets dévastateurs ne sont pas encore pleinement inventoriés. Dans notre seule région du Nord-Pas-de-Calais, on estime à 10.000 personnes environ le nombre de consommateurs d'héroïne devenus dépendants, en France 160.000 personnes héroïnomanes ont recours au système sanitaire et social (données de l'OFDT 1996).

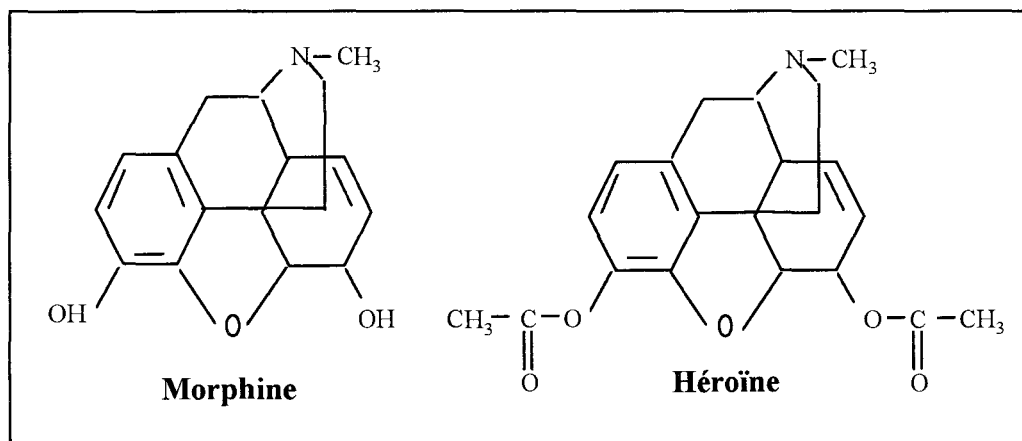


Figure. 1 : Structures chimiques de la morphine et de l'héroïne

I.2. Héroïne et grossesse : données cliniques.

L'extension actuelle de la toxicomanie, qui est à mettre en relation avec la crise socio-économique que traverse notre société, touche de plus en plus largement une population jeune. Celle-ci, en âge de procréer, prend le plus souvent inconsciemment le risque d'exposer *in utero* embryon ou fœtus à des drogues parmi lesquelles figurent en bonne place l'héroïne, la morphine ou ses dérivés.

Les premières observations des effets de ces drogues sur le fœtus durant la grossesse ont été rapportées dès 1875 (*in COBRINIK et coll. 1959*), mais il a fallu attendre les années 70 pour que les conséquences de ces toxicomanies sur la grossesse aient pu être mieux définies sur la base d'études portant sur plusieurs centaines de cas (*ZELSON et coll. 1971* ; *OSTREA et coll. 1979*).

Il convient cependant de souligner que les effets d'une consommation d'héroïne sur la grossesse dans bien des cas, ne sont pas faciles à inventorier, d'une part, en raison de l'absence ou de la faible organisation, dans de nombreux pays, d'une surveillance médicale prénatale institutionnalisée et d'autre part, en raison du fait que de nombreux toxicomanes vivent en marge des organisations sanitaires.

Plusieurs auteurs attribuent à la toxicomanie liée aux opiacés, un accroissement significatif de la fréquence des avortements (14,3% pour FRAZER 1976 ; 29,8% pour STOFFER 1968), une augmentation de la fréquence des accouchements prématurés (15 à 35%), un risque accru d'anémie dans 30% des cas et surtout un important retard de croissance intra-utérin dans près de 40% des cas (BOUTTE *et coll.* 1988). A ceci s'ajoutent des risques importants d'infections associées à la toxicomanie comme les maladies vénériennes sexuellement transmissibles (MST), les hépatites virales et surtout le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) souvent dues à une contamination sanguine (BONGAIN 1991).

Néanmoins, c'est chez le nouveau-né que s'observent les conséquences les plus marquées de la toxicomanie maternelle. Parmi elles, la plus remarquable est la forte diminution du poids à la naissance qui reste inférieur à 2500 g chez 40% des enfants exposés in-utéro à ces drogues. Le syndrome de sevrage qui se caractérise par un ensemble de signes non spécifiques, tant neurologiques que digestifs, est un autre signe associé, chez 60 à 90% des nouveau-nés âgés de 1 à 4 jours, à une exposition prénatale à l'héroïne. Des anomalies respiratoires ont également été rapportées (OSTREA *et coll.* 1979) ainsi que, plus rarement, des effets tératogènes (BONGAIN 1991) chez des enfants de mères ayant poursuivi la consommation de drogues tout au long de leur grossesse.

En résumé, les conséquences chez l'enfant d'une prise d'opiacés par la mère s'observent dès la naissance. La morbidité accrue chez le nouveau-né est à mettre en relation avec la prématurité et l'hypotrophie. Il convient néanmoins de souligner que cette morbidité n'est pas exclusivement imputable à ce type de drogue puisque la consommation des opiacés est souvent associée à l'usage d'autres éléments nocifs tels que l'alcool et/ou le tabac. De surcroît, la précarité des conditions de vie de la mère toxicomane est aussi un facteur de risques pour la grossesse. De plus, bon nombre de toxicomanes présentent une polyintoxication par prise de barbituriques ou d'amphétamines associés à l'héroïne dont les quantités consommées sont souvent très variables et difficiles à préciser par les sujets eux-mêmes.

I.3. Données expérimentales.

Dans le but de mieux comprendre les risques encourus par les enfants de mères toxicomanes, l'utilisation de modèles expérimentaux, impliquant des animaux de laboratoire, a permis une étude des modifications physio-pathologiques engendrées par une exposition prénatale aux opiacés.

Différentes études relatives à l'action des opiacés au cours du développement périnatal ont été focalisées sur le système nerveux. Les premières, réalisées par SLOTKIN *et coll.* (1975), ont porté sur l'étude des cellules adrénérgiques médullosurrénaliennes de rats exposés à la morphine avant et après la naissance ; la drogue administrée à la mère atteignant le fœtus via le placenta et le nouveau-né via le

lait maternel. Ces auteurs ont ainsi montré que l'exposition à la morphine induit, au cours des 20 premiers jours de la vie postnatale, un retard de maturation des cellules chromaffines caractérisé par une diminution de l'activité Dopamine β -hydroxylase (enzyme responsable de la conversion de la Dopamine en Noradrénaline) et par une réduction du contenu en catécholamines de la médullosurrénale. Par la suite, avec la découverte des récepteurs aux opiacés (PERT et SNYDER 1973 ; SIMON *et coll.* 1973 ; TERENIUS 1973) et la caractérisation consécutive de différents types de peptides opioïdes endogènes (HUGUES *et coll.* 1975 ; GOLDSTEIN *et coll.* 1979), les recherches relatives à l'action des opiacés sur le cerveau en développement se sont focalisées sur l'étude de ces récepteurs et de leurs ligands endogènes. Cependant, compte tenu de la grande variété des protocoles expérimentaux utilisés, de la nature de la drogue, de sa fréquence d'administration et de la durée du traitement, il est particulièrement difficile d'établir une synthèse cohérente de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces multiples études. On peut cependant retenir un fait majeur, à savoir qu'une exposition chronique à un opiacé a, sur l'ontogénèse des systèmes opioïdes endogènes, des effets délétères bien plus marqués chez l'animal jeune, que chez l'adulte (*revue in* KUHN *et coll.* 1992).

Un autre grand axe de recherche a porté sur l'action inhibitrice des opiacés sur la croissance du système nerveux central, et a conduit à la découverte, au début des années 80, du rôle de facteurs de croissance joué par les opioïdes endogènes au cours de l'ontogénèse (*revue in* HAMMER et HAUSER 1992). En effet, il est maintenant bien établi que les peptides opioïdes sont fortement impliqués dans la croissance neuronale et gliale du système nerveux, aussi bien au cours de l'embryogénèse que durant la période postnatale précoce. Ainsi, un traitement périnatal à la morphine perturbe chez le rat à la fois le développement des neurones, celui de la glie ainsi que l'établissement des branchements dendritiques (HAMMER et HAUSER 1992). Par ailleurs, plusieurs études relatives à la maturation de différents ensembles neuroniques, tels que les systèmes catécholaminergique ou cholinergique, font état d'altérations morpho-fonctionnelles occasionnées par une exposition prénatale aux opiacés (KUHN *et coll.* 1992). La morphine administrée à la rate gestante induit à long terme des effets sur sa progéniture. Quand celle-ci est devenue adulte, il a été signalé des altérations sexuellement dimorphiques du contenu hypothalamique en Noradrénaline (diminution de 57% chez la femelle et augmentation de 95% chez le mâle) et des perturbations des comportements sexuels (inhibition du comportement de lordose chez la femelle et augmentation du comportement de monte chez le mâle) (VATHY *et coll.* 1985 ; VATHY et KATAY 1992).

En résumé, les principales conclusions que l'on puisse tirer de ces différentes études concernant les conséquences, chez le nouveau-né, d'une exposition aux opiacés au cours de l'ontogénèse sont :

1. - Une altération de la maturation et du fonctionnement des systèmes opioïdes endogènes.
2. - Une action des opioïdes sur le système nerveux en développement d'une part comme agents trophiques, et d'autre part en tant que neurotransmetteurs.

3. - Une modification à long terme et probablement permanente du fonctionnement des systèmes catécholaminergiques centraux et périphériques.

A ce jour de nombreuses inconnues subsistent cependant en ce qui concerne plus particulièrement :

- la nature des "médiateurs" possibles des effets des opiacés sur les paramètres neurochimiques et physiologiques,
- l'existence éventuelle d'autres effets trophiques des opiacés sur le développement de systèmes neuronaux non-opioïdes,
- l'impact des modifications neurochimiques engendrées par ces drogues sur le fonctionnement du système nerveux central. On peut s'attendre en particulier à de profondes perturbations des fonctions contrôlées par les catécholamines et les peptides opioïdes endogènes chez les animaux exposés à ces drogues avant leur naissance.

Ces vastes champs d'investigations possibles et la nécessité, dans le contexte clinique actuel, de mieux connaître les effets et le mode d'action de ces drogues chez le fœtus, nous ont conduit à l'étude présente. Pour différentes raisons, qui seront développées par la suite, nous avons choisi de limiter provisoirement celle-ci à la période postnatale précoce.

Il est maintenant bien établi que le système catécholaminergique central ainsi que d'autres systèmes, sérotoninergique en particulier, jouent un rôle majeur dans le contrôle central de l'activité des axes hypothalamo-hypophysio-surrénalien et hypothalamo-hypophysio-gonadique. Aussi, sur la base des données expérimentales chez le rat et cliniques chez l'homme, nous avons émis l'hypothèse que la prise de morphine par la mère pouvait altérer à court terme (fœtus et nouveau-né), d'une part le métabolisme de plusieurs neurotransmetteurs dans le cerveau et en particulier dans l'hypothalamus et, d'autre part, le contrôle central des fonctions corticotrope et gonadotrope hypophysaires.

GENERALITES

II RAPPELS SUR LE CONTROLE CENTRAL DES FONCTIONS CORTICOTROPE ET GONADOTROPE HYPOPHYSAIRES.

II.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou plus simplement l'axe corticotrope a l'organisation type d'un système neuroendocrinien (fig. 2). Une glande endocrine périphérique, la surrénale, par sa partie périphérique, le cortex surrénalien (ou corticosurrénale), sécrète une hormone stéroïdienne, (cortisol chez l'homme, corticostérone chez le rat) responsable des effets physiologiques caractéristiques de l'activation de l'axe corticotrope. La corticosurrénale est placée sous le contrôle de l'adénohypophyse via l'ACTH (Adrenocorticotropique Hormone) ou corticostimuline, elle-même sous le contrôle de l'hypothalamus par l'intermédiaire de neurohormones dont la principale est la corticolibérine ou CRF (Corticotropin-Releasing Factor) et, à un degré moindre l'AVP ou vasopressine. La synthèse et la sécrétion du CRF par les neurones parvocellulaires du Noyau Paraventriculaire (NPV) est tributaire des centres nerveux supérieurs. Les glucocorticoïdes surrénaliens (cortisol, corticostérone) modulent en retour l'activité du système par un mécanisme de rétrocontrôle (ou feedback) négatif qui s'exerce à différents niveaux de cet axe.

L'axe corticotrope est activé de façon aiguë dans diverses situations de stress, quand surviennent des modifications du milieu intérieur ou de l'environnement externe à l'organisme, ce qui confère à ce système un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie et dans la mobilisation de l'énergie métabolique nécessaire à une réponse comportementale adaptée.

L'axe corticotrope présente une activité pulsatile et cyclique ; chez le rat le rythme est circadien (période voisine de 24 heures) et la sécrétion de corticostérone est maximale (acrophase) au cours de l'heure qui suit le passage de la phase lumineuse à la phase obscure du nyctémère.

II.1.1. *Hypothalamus et corticolibérine (CRF).*

Bien que la notion de facteurs hypothalamiques contrôlant les sécrétions adéno ou antéhypophysaires ait été postulée dès les années 40, il a fallu attendre 1981 pour que la structure de la corticolibérine (CRF) soit déterminée, suite à son isolement à partir d'hypothalamus de mouton (VALE *et coll.* 1981 ; SPIESS *et coll.* 1981). Le CRF, peptide de 41 acides aminés, est un puissant stimulant de la sécrétion d'ACTH (BAIRD *et coll.* 1982 ; RIVIER *et coll.* 1982) par les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure. D'autres facteurs d'origine hypothalamique (vasopressine ou ADH, ocytocine, angiotensine II) exercent aussi un certain effet stimulant sur la sécrétion d'ACTH ou, plus généralement, potentialisent l'action du CRF sur l'adénohypophyse.

Le CRF impliqué dans la stimulation de la fonction corticotrope de l'hypophyse est synthétisé par des neurones parvocellulaires du NPV dont les axones se projettent dans la couche externe de l'éminence médiane (EM) où des terminaisons nerveuses viennent au contact de capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire

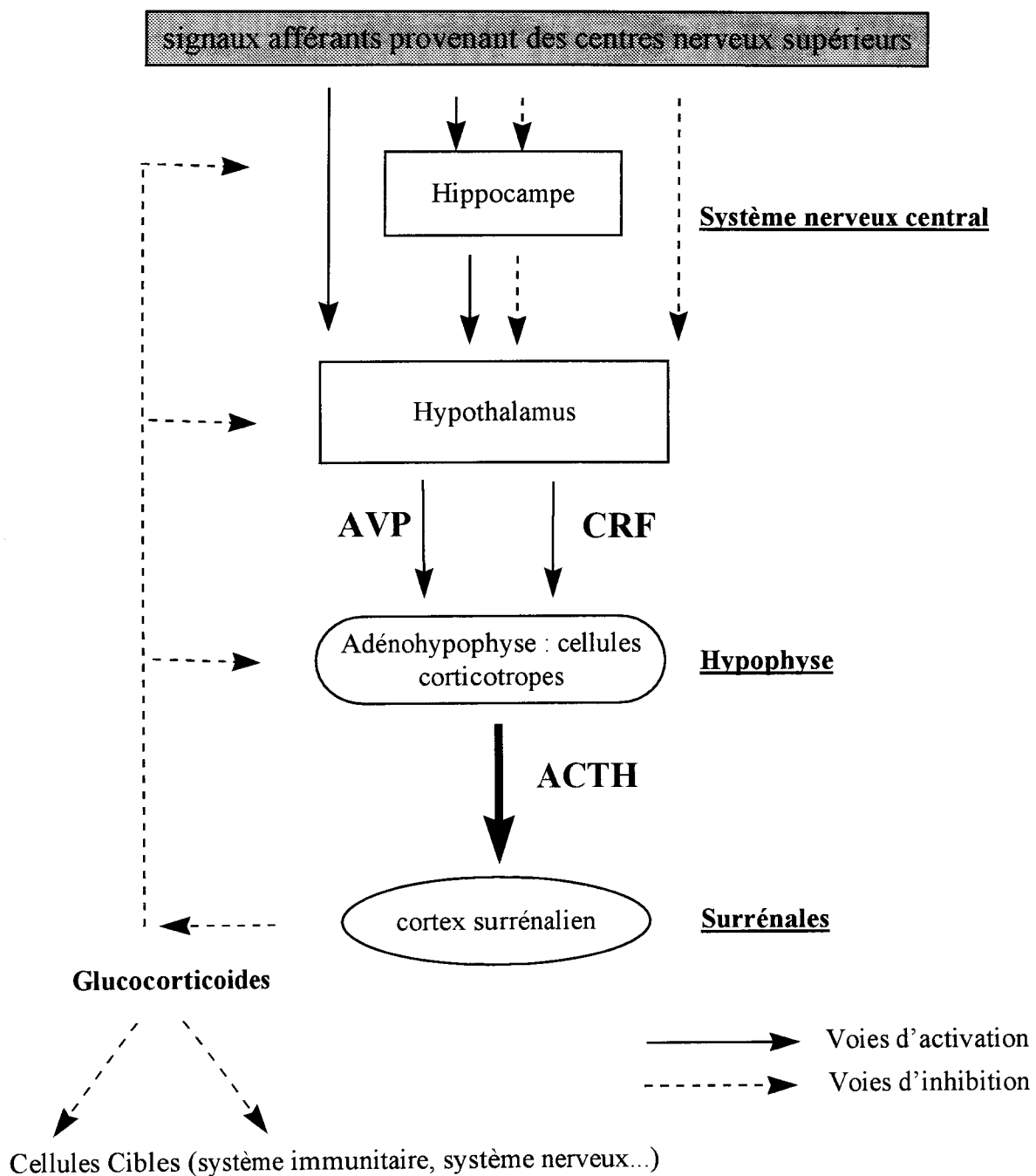


Figure 2 : Voies d'activation et d'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

(adapté d'après : « *Mechanism(s) of early glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion from anterior pituitary corticotropes* ». Shipston MJ. 1995. Trends Endocrinol Metab, 6 : 261 - 266).

(contacts neuro-hémaux). Le CRF est donc une neurohormone hypothalamique qui, via le sang portal, atteint les cellules corticotropes adénohypophysaires, reconnues par des récepteurs spécifiques localisés sur leur membrane plasmique.

Le NPV reçoit de nombreuses afférences nerveuses ; il est en relation fonctionnelle avec le système limbique (amygdale, hippocampe) qui l'informe de l'état émotionnel, avec l'organe sous-fornical qui l'informe de la composition physico-chimique du plasma, avec des afférences viscérales du tronc cérébral (noyaux du nerf vague et noyaux catécholaminergiques à l'origine de voies noradrénergiques ascendantes) qui le renseignent en particulier sur l'état du système cardiovasculaire. Le NPV est aussi en relation fonctionnelle avec de nombreux autres noyaux hypothalamiques comme le noyau ventro-médian qui centralise les informations sur la balance énergétique ou le noyau suprachiasmatique qui joue un rôle important dans l'intégration de messages photopériodiques et dans le déterminisme du rythme circadien de l'axe corticotrope.

Cet ensemble de connexions pourrait servir de support anatomique aux influences du fonctionnement cérébral sur l'activité de l'axe corticotrope (fig. 3).

La plupart des systèmes neurochimiques sont capables de moduler l'activité des neurones peptidergiques (CRF et AVP) du NPV, impliqués dans le contrôle de l'activité de l'axe corticotrope (GUILLAUME *et coll.* 1987).

On rappellera brièvement que les neurones à CRF du NPV reçoivent une importante innervation noradrénergique en provenance des noyaux A1, A2 et A6 du tronc cérébral et du locus coeruleus, et une innervation adrénergique issue des noyaux C1, C2 et C3 de la portion caudale de la médulla. Il est clairement établi que ces systèmes catécholaminergiques exercent un contrôle activateur majeur, via des récepteurs de type α - adrénergique, sur l'activité des neurones à CRF du NPV, plus particulièrement lors de la réponse à un stress (SZAFARCZYK *et coll.* 1985, ECKLAND *et coll.* 1988, PLOTSKY *et coll.* 1989).

Des fibres dopaminergiques contactent des neurones à CRF du NPV ; bien que l'effet de la dopamine sur l'axe corticotrope ait été peu étudiée, on peut signaler que l'administration d'agonistes dopaminergiques stimule la sécrétion de CRF (*revue in* CALOGERO 1995) et provoque une élévation de la corticostéronémie (KITCHEN *et coll.* 1988).

Le neuropeptide Y fréquemment colocalisé avec la noradrénaline dans des neurones des noyaux catécholaminergiques du tronc cérébral et présent également dans des neurones du noyau arqué, est capable de stimuler la sécrétion d'ACTH d'une part en augmentant la sécrétion du CRF hypothalamique et d'autre part en potentialisant l'action de ce neuropeptide sur l'hypophyse (SUDA *et coll.* 1993).

Des fibres nerveuses sérotoninergiques issues de corps cellulaires localisés dans les noyaux B7, B8 et B9 du raphé médian, contactent des neurones parvocellulaires à CRF du NPV. Il est bien établi que le système sérotoninergique active la libération à la fois du CRF et de l'ACTH (*revue in* FULLER 1992). La sérotonine (5HT) et des agonistes sérotoninergiques stimulent la sécrétion de CRF *in-vivo* et *in-vitro*. La fenfluramine, qui augmente la sécrétion de 5HT en bloquant sa recapture, stimule la production de CRF par l'hypothalamus (HOLMES *et coll.* 1982), augmente sa

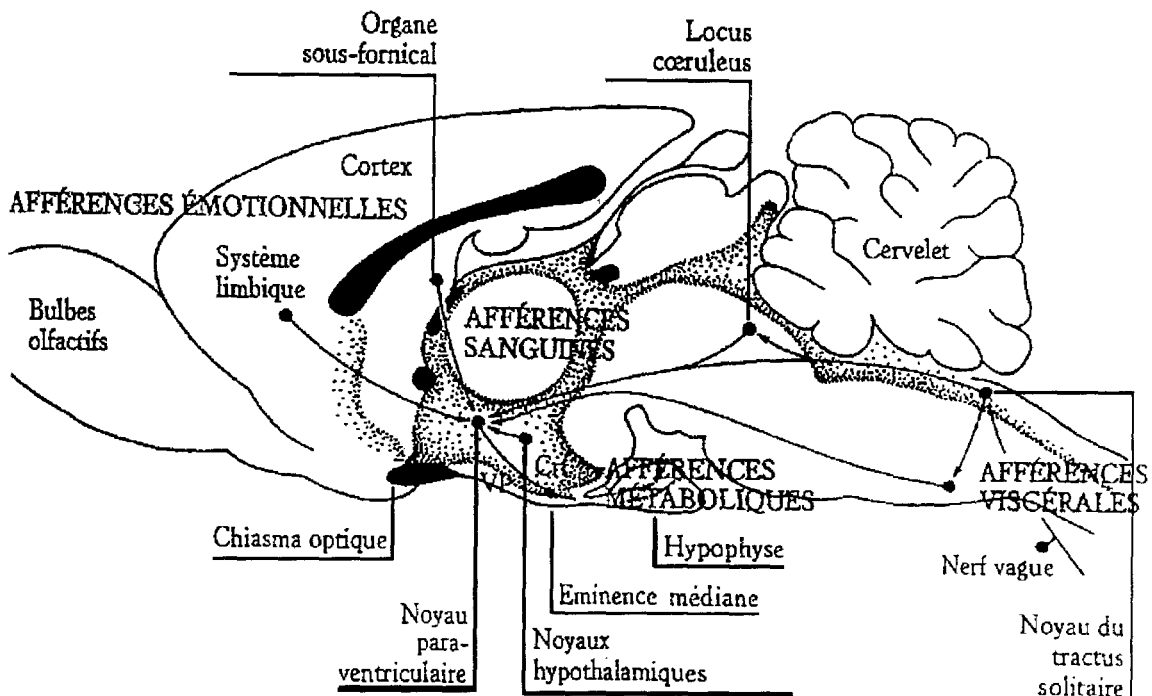


Figure 3 : Voies centrales de régulation de l'axe corticotrope.

Les neurones peptidergiques (CRF et AVP) du noyau paraventriculaire, responsables du contrôle de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse antérieure reçoivent une riche innervation. Ils informent le noyau paraventriculaire de l'humeur (système limbique, hippocampe, amygdale), des caractéristiques physico-chimiques du plasma (organe sous-fornical), de l'équilibre de la balance énergétique (noyau ventro-médian de l'hypothalamus), de l'état du système cardiovasculaire (nerf vague et systèmes noradrénergiques ascendants).

(d'après : Mormède P. 1988 *Les réponses neuroendocrines de stress*. Numéro spécial du recueil de Médecine Vétérinaire, 1164 (19) : 723-742).

libération dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire (OLIVER *et coll.* 1990) et élève la corticostéronémie (APPEL *et coll.* 1991).

Sur la base de données pharmacologiques, il apparaît que de nombreux autres neurotransmetteurs semblent également jouer un rôle dans le contrôle central de l'activité des neurones à CRF. C'est le cas par exemple pour l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui exercerait une influence inhibitrice ou pour l'acétylcholine et des peptides opioïdes endogènes qui auraient une influence plutôt stimulatrice.

II.1.2. Hypophyse et corticostimuline (ACTH).

L'ACTH (corticostimuline ou corticotropine) est synthétisée dans les cellules corticotropes adénohypophysaires (antéhypophysaires) sous la forme d'un précurseur de grande taille, la proopiomélanocortine (POMC), clivé ensuite par diverses enzymes protéolytiques en différents peptides de plus petite taille, dont l'ACTH.

Le CRF, qui atteint les cellules corticotropes par le sang portal, stimule la sécrétion d'ACTH via sa liaison à des récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G, et l'activation des systèmes adénylate cyclase/protéine Kinase A (PKA) et phospholipase C. L'accroissement rapide de la sécrétion d'ACTH induite par le CRF, sécrété de manière pulsative va de pair avec la stimulation de l'expression du gène de la POMC et l'augmentation du contenu intracellulaire en ACTH des cellules corticotropes. (REISINE et AFFOLTER 1987). Le CRF est également capable, lors d'une administration chronique, d'augmenter la proportion de cellules corticotropes antéhypophysaires (GERTZ *et coll.* 1987).

L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés dont les 24 premiers (extrémité N-terminale) constituent la séquence nécessaire et suffisante à la manifestation de son action biologique. Sa structure est parfaitement conservée dans l'ensemble des espèces (RINIKER *et coll.* 1972).

L'ACTH se fixe sur des récepteurs de la membrane plasmique des cellules corticosurréaliennes, récepteurs de haute affinité couplés positivement à l'adénylate-cyclase qui, ainsi stimulée, augmente la production d'AMPc. Une protéine Kinase (PK) AMPc-dépendante catalyse la phosphorylation et l'activation d'une enzyme hydrolysant les esters de cholestérol présents dans les enclaves lipidiques. Ce mécanisme permet l'approvisionnement des mitochondries en cholestérol libre. (fig. 4).

L'ACTH active aussi le système de clivage de la chaîne latérale du cholestérol qui conduit, au sein des mitochondries, à la formation de pregnénolone par hydroxylation. Ainsi, l'ACTH augmente la production surrénalienne de cortisol à court et à long terme en activant la synthèse d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des glucocorticoïdes (fig. 4). Il en résulte une élévation de la réponse à l'ACTH, lorsque la glande a été préalablement stimulée (MURAKAMI et TAKAHASHI 1983 ; ARMARIO *et coll.* 1985) ou une hyporéactivité de la glande à l'ACTH, après une absence prolongée de stimulation (BIERICH *et coll.* 1959). L'action de l'ACTH sur la glande surrénale s'accompagne également d'une action trophique au niveau de la zone corticale (DAZORD 1983) ; l'hypertrophie surrénalienne est d'ailleurs un des signes cliniques mettant en évidence une activation chronique de l'axe corticotrope (SELYE 1936).

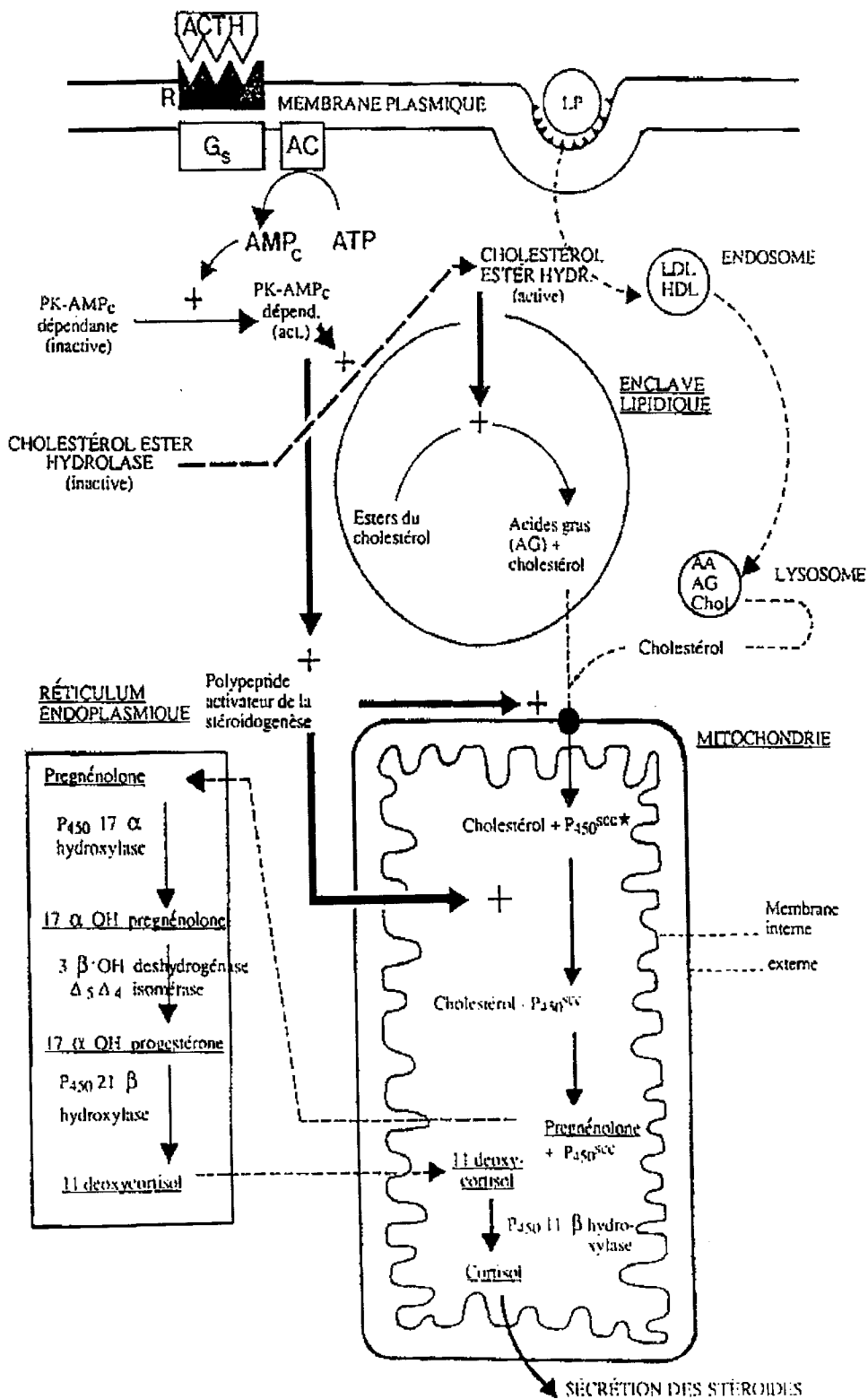


Figure 4 : Stéroïdogénèse dans la zone fasciculo-réticulée de la surrénale. Effet de l'ACTH

(d'après : Dupouy JP. 1992 *Hormones et grandes fonctions*. Collection Ellipses, tome I, p.101).

II.1.3. Surrénale et corticostéroïdes.

La glande surrénale des mammifères est constituée de deux tissus endocrines, la corticosurrénale à la périphérie et la médulosurrénale au centre, distinctes par leur origine embryologique et leurs fonctions. La surrénale est entourée d'une capsule conjonctive externe (fig. 5). Chez l'adulte, les cellules les plus nombreuses de la médulosurrénale sont des cellules chromaffines qui synthétisent et libèrent dans le sang des catécholamines (principalement noradrénaline et adrénaline). Ces cellules, par leur origine embryologique, sont assimilables à des cellules sympathiques "post-ganglionnaires". Elles sont innervées par des fibres du nerf splanchnique qui, dans leur grande majorité, sont de nature cholinergique préganglionnaire, néanmoins, un contingent non négligeable de fibres sont de nature peptidergique.

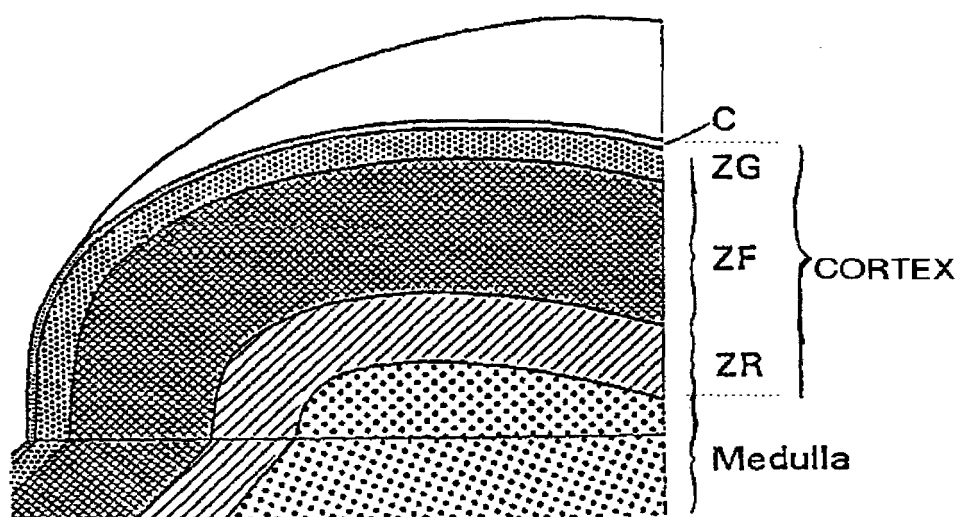


Figure 5 : Représentation schématique d'une portion de glande surrénale de mammifère. La corticosurrénale (Cortex) est périphérique et la médulosurrénale (Medulla), centrale. La surrénale est délimitée par une capsule fibreuse (C). Le cortex est sur la base de critères anatomo-physiologiques, subdivisé en trois grandes zones qui sont, de la périphérie vers le centre, la zone glomérulée (ZG), la zone fasciculée (ZF) et la zone réticulée (ZR).

La corticosurrénale est subdivisée de l'extérieur vers l'intérieur en 3 zones : glomérulée (ZG), fasciculée (ZF) et réticulée (ZR) (fig. 5), qui constituent le tissu stéroïdien synthétisant des hormones dérivées du cholestérol ; les principales sont l'aldostérone (ZG), la corticostérone (rat) ou le cortisol (homme) (ZF, ZR) et des androgènes (ZR). La corticostérone et le cortisol appartiennent au groupe des hormones dites glucocorticoïdes ; elles induisent de nombreux effets métaboliques, immunologiques et nerveux et sont libérées sous l'action de l'ACTH. L'aldostérone appartient au groupe des minéralocorticoïdes ; elle joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme hydrominéral.

II.1.4. Transport des corticostéroïdes.

La corticostérone, comme l'ensemble des hormones stéroïdes est liposoluble. Elle circule dans le sang en grande partie liée (à plus de 98%) à des protéines plasmatiques telles que la transcortine ou CBG (Cortisol Binding Globuline) qui couvre plus de 80% du transport et l'albumine ; un faible pourcentage de corticostérone (moins de 2%) circule à l'état libre.

Chez l'homme, la CBG lie le cortisol avec une haute affinité (constante d'association $K_a = 760 \mu\text{mol/l}$; concentration plasmatique $CP = 0,7 \mu\text{mol/l}$), mais une faible capacité. A l'inverse l'albumine est un transporteur de forte capacité mais de faible affinité ($K_a = 1\text{mmol/l}$; $CP = 550 \mu\text{mol/l}$). Il en est de même chez le rat.

La forme libre constitue fondamentalement la fraction biologiquement active de l'hormone. Il semble en être de même pour la forme liée à l'albumine puisque la corticostérone associée à cette protéine est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre les cellules cibles nerveuses (PERDRIDGE et MIETUS 1979). Des études récentes sur la transcortine laissent supposer que cette protéine pourrait être impliquée dans le relargage "dirigé" du cortisol dans les cellules cibles, soit en interagissant avec une protéine de liaison plasmatique (HSU *et coll.* 1986), soit sous l'influence d'une protéase capable de réduire son affinité par le ligand (SCROCCHI *et coll.* 1993). En conclusion, on peut estimer que 20% environ de la sécrétion de corticostérone constituent la fraction biologiquement active de l'hormone au niveau du système nerveux central. Au niveau d'autres tissus seule la corticostérone libre paraît susceptible soit de diffuser librement dans les cellules cibles pour induire ses effets, soit d'être captée par le foie pour y être dégradée.

II.1.5. Les récepteurs aux corticostéroïdes.

II.1.5.1. Généralités.

Les glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone) agissent sur leurs tissus cibles via leur liaison avec des récepteurs spécifiques. Ceux-ci sont de deux types ; on distingue ainsi les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Les récepteurs aux glucocorticoïdes ont des affinités très différentes pour la corticostérone. Les MR ou récepteurs de type I présentent une affinité très élevée pour la corticostérone et l'aldostérone ($K_d = 0,5 - 1\text{nM}$) et une affinité bien plus réduite pour la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse. Les GR ou récepteurs de type II présentent une affinité plus faible pour la corticostérone ($K_d=2,5-5\text{nM}$), une affinité très faible pour l'aldostérone et par contre une affinité élevée pour la dexaméthasone (KROZOWSKI et FUNDER 1983, REUL et DE KLOET 1985). Les concentrations circulantes de glucocorticoïdes étant beaucoup plus élevées que celles de l'aldostérone (deux à trois fois supérieures) et les MR présentant une affinité 5 à 10 fois supérieure à celle des GR pour les glucocorticoïdes, les MR devraient être en permanence occupés par ceux-ci en l'absence d'un mécanisme capable d'exclure les glucocorticoïdes des tissus cibles de l'aldostérone. Ceci est le cas puisqu'une enzyme, la 11β -hydroxystéroïde deshydrogenase (11β -HSD), abondante dans les tissus périphériques, catabolise la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone ayant peu d'affinité pour les MR ; cette enzyme empêche ou réduit ainsi la liaison des glucocorticoïdes aux récepteurs MR et les laisse disponibles pour l'aldostérone (FUNDER *et coll.* 1988). Les MR et les GR, sont des récepteurs intracellulaires

cytosoliques. Ces récepteurs dans leur forme inoccupée (forme inactivée) sont constitués de deux hétéromères : le premier porte deux sites de liaison, l'un pour les hormones stéroïdes, l'autre pour l'ADN ; le deuxième hétéromère est composé de deux protéines dites de choc thermique (hsp 90) de 90 kDa chacune. Ces protéines sont libérées lors de la liaison du récepteur avec le ligand, et le complexe stéroïde-récepteur (forme activée) migre dans le noyau cellulaire pour se fixer, sous la forme de dimère, à l'ADN. En général, il s'agit d'un homodimère constitué de l'association de 2 MR ou de 2 GR occasionnellement d'un hétérodimère MR-GR (HOLSBOER et BARDEN 1996). Les dimères se lient à des "éléments régulateurs hormonaux" (HRE) constitués par une séquence commune d'une quinzaine de nucléotides localisée dans la région du promoteur des gènes dont l'expression est modulée par les hormones stéroïdes. Ainsi la liaison aux HRE du récepteur dimérique sous sa forme activée, entraîne l'activation d'un ensemble complexe de facteurs de transcription nécessaires à l'initiation de la transcription elle-même, et à l'augmentation de l'expression des gènes cibles. Le retour du récepteur à sa forme inactivée nécessite, comme pour son activation, des processus de phosphorylation couplés à l'utilisation d'ATP (SCHMIDT et LITWACK 1982, MENDEL *et coll.* 1990).

Bien que les glucocorticoïdes aient fondamentalement une action génomique, il n'est pas exclu qu'ils puissent agir à des étapes post-transcriptionnelles ou encore via des récepteurs membranaires, ce qui paraît être le cas pour le rétrocontrôle immédiat de la sécrétion d'ACTH (*revue in* SHIPSTON 1995). Des travaux récents suggèrent que les glucocorticoïdes pourraient agir via des récepteurs MR et/ou GR autrement que par l'interaction avec les HRE, en particulier en interagissant avec d'autres facteurs de transcription voire sans interaction avec l'ADN (FUNDER 1996).

II.1.5.2. Particularités des récepteurs cérébraux.

Au niveau du système nerveux central, les MR ne sont pas protégés contre la fixation des glucocorticoïdes puisque la 11 β -HSD est présente dans ce tissu (notamment dans l'hippocampe) à un niveau très faible. Par ailleurs, les concentrations cérébrales en corticostérone sont beaucoup plus élevées que celles de l'aldostérone (YONGUE et ROY 1987).

Bon nombre d'études relatives à ces récepteurs ont permis de montrer clairement que les récepteurs cérébraux de type I fixent ainsi préférentiellement les glucocorticoïdes et ne se comportent donc pas comme des récepteurs des minéralocorticoïdes. Ainsi, les deux types de récepteurs aux corticostéroïdes (type I et type II) diffèrent par leurs affinités pour la corticostérone, et par leur degré d'occupation en condition de base ou de stress. Aux concentrations circulantes basales de corticostérone on estime que, les MR sont occupés à 80% par la corticostérone tandis que les GR ne sont occupés qu'à 40%. Les MR pourraient donc être responsables des actions toniques (ou permissives) de la corticostérone au cours du fonctionnement basal de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. En revanche, en situation de stress, GR et MR sont occupés à 95% par la corticostérone (DE KLOET et REUL 1987). Les GR, peu occupés dans des conditions basales, le sont fortement quand l'activité de l'axe corticotrope est intense (réponse à un stress) ou bien lors d'un traitement aux corticoïdes à des doses pharmacologiques. Il a été ainsi proposé que du taux d'occupation respectif de ces deux types de récepteurs, dépendent les actions

spécifiques des glucocorticoïdes au niveau du système nerveux central (DE KLOET 1991).

La distribution des récepteurs centraux aux corticostéroïdes a fait l'objet de très nombreuses études (REUL et DE KLOET 1985-1986, SAPOLSKY *et coll.* 1983, SARRIEAU *et coll.* 1984, FUXE *et coll.* 1985, VAN EEKELLEN *et coll.* 1987-1988). Il apparaît que les récepteurs de type II sont répartis de manière ubiquitaire dans le cerveau alors que les récepteurs de type I sont présents en grande quantité dans le système limbique et plus particulièrement dans l'hippocampe et le septum. De plus, les corps cellulaires des neurones localisés dans des noyaux des systèmes monoaminergiques ascendants (dopaminergique, adrénérgique et sérotoninergique du tronc cérébral) présentent une forte immunoréactivité à des anticorps monoclonaux anti-GR ; ceci suggère que les glucocorticoïdes sont susceptibles de moduler l'activité de ces systèmes. (HARFSTRAND *et coll.* 1986, AHIMA et HARLAN 1990, MORIMOTO *et coll.* 1996).

II.1.6. La régulation par rétroaction de la fonction corticotrope hypophysaire.

Il existe deux types de rétrocontrôle de l'activité de la fonction corticotrope :

- la rétroaction courte (*short-loop-feedback*) exercée par le CRF et l'ACTH,
- La rétroaction longue (*long-loop-feedback*) exercé par la corticostérone.

II.1.6.1. La rétroaction courte.

Ce type de rétroaction met en jeu l'ACTH et le CRF. Il a été montré que l'ACTH est susceptible d'inhiber la sécrétion de CRF hypothalamique et que le CRF comme l'ACTH pourraient inhiber leur propre sécrétion (MONTELEONE 1990). Cependant, l'importance de ce type de rétroaction semble très limitée puisque ces peptides traversent peu ou pas la barrière hémato-encéphalique ; ils ne peuvent agir que sur des structures centrales hors barrière telles que l'éminence médiane, l'area postrema, la glande pinéale ou le tubercule interpedonculaire.

II.1.6.2. La rétroaction longue.

Le principal facteur de contrôle de l'activité corticotrope hypophysaire est la corticostérone elle-même. Toutes les composantes de l'axe corticotrope (NPV de l'hypothalamus, adénohypophyse) ainsi que les structures centrales situées en amont et impliquées dans l'activation ou l'inhibition de cet axe (système limbique en général et hippocampe en particulier) possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes. Par leur intermédiaire, ces hormones surrénaliennes sont susceptibles de moduler l'activité de ces différentes composantes. In fine, la corticostérone est donc capable de contrôler sa propre production par un phénomène de rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire (KELLER-WOOD et DALLMAN 1984). Les effets inhibiteurs de la corticostérone sur les sécrétions de CRF et d'ACTH s'exercent de manière différente au cours du temps ; la rétroaction négative de la corticostérone peut ainsi être divisée en trois composantes : une rapide, une intermédiaire et une tardive.

Le rétrocontrôle rapide, intervient entre 10 min. et 2 heures après une élévation modérée de la corticostéromie. L'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la sécrétion d'ACTH s'exerce principalement sinon exclusivement au niveau hypophysaire, via une

interruption du couplage stimulus-sécrétion, sans affecter la biosynthèse de l'ACTH, son stockage ou sa dégradation (WIDMAIER et DALLMAN 1983a,b). Cette inhibition rapide mettrait en jeu les récepteurs intracellulaires de type II et dépendrait de l'induction de nouvelles protéines, dont celle de calmoduline qui, en liant le calcium, inhiberait sa mobilisation intracellulaire (ANTONI *et coll.* 1996).

La rétroaction dite intermédiaire survient de 2 à 10 h après une exposition prolongée à des concentrations plus élevées de glucocorticoïdes. L'effet de ces stéroïdes sur l'inhibition de la sécrétion d'ACTH implique la transcription de l'ADN et la production de protéines. (McEWEN *et coll.* 1986). A cette phase de la rétroaction, ni la synthèse de l'ACTH ni celle du CRF ne sont perturbées.

Enfin la rétroaction tardive se traduit par l'inhibition de la synthèse d'ACTH en diminuant l'expression des gènes de la POMC dans l'adénohypophyse et du CRF dans l'hypothalamus, la diminution du nombre de récepteurs au CRF et l'inhibition des mécanismes de transduction cellulaire du CRF et de l'AVP (*Revue in* DALLMAN *et coll.* 1994).

En conclusion, les deux premiers types de rétroactions, rapide et intermédiaire, interviendraient probablement lors de la régulation circadienne de la corticostéronémie dans des conditions basales voire dans des conditions de stress très modérés et de courte durée alors que la rétroaction tardive s'exercerait uniquement dans des conditions pathologiques, après un traitement prolongé aux glucocorticoïdes ou dans des conditions de stress intenses et prolongés.

II.1.7. Ontogenèse de l'axe corticotrope.

Dès le 13ème jour du développement embryonnaire (E13) peut être avant, les surrénales du fœtus sont capables de synthétiser et de sécréter spontanément de la corticostérone (ROOST 1967). Le contrôle de l'activité surrénalienne par l'ACTH adénohypophysaire n'apparaît que vers E16 - E17 (COHEN 1960, DUPOUY et CHATELAIN 1981) ; la corticostéronémie foetale s'élève progressivement pour atteindre son niveau maximum à E19 avant de décroître. Au cours de cette période, les évolutions de l'ACTHémie, de la population des récepteurs surrénaux à l'ACTH et de la corticostéronémie sont parfaitement corrélées (CHATELAIN *et coll.* 1989, BOUDOURESQUE 1988). Les ARN messagers (ARNm) codant pour la POMC apparaissent au niveau adénohypophysaire à E15 (HINDELANG *et coll.* 1990) puis leur taux augmente jusqu'à E21 (GRINO *et coll.* 1989a). Quant au contenu de l'hypophyse en ACTH, il augmente entre E17 et E19, mais chute momentanément à E20 (DUPOUY et CHATELAIN 1981, 1984 ; BOUDOURESQUE *et coll.* 1988) ce qui peut être le reflet d'une sécrétion accrue de cette hormone à cette période.

En fin de gestation le contrôle hypothalamique de la fonction corticotrope hypophysaire devient opérationnel. En effet, l'encéphalotomie des fœtus *in utero*, qui détruit l'hypothalamus mais laisse l'adénohypophyse en place dans la selle turcique, induit à terme une diminution de l'ACTHémie, une atrophie surrénalienne et une forte baisse de la corticostéronémie (DUPOUY et CHATELAIN 1981). Le neuropeptide CRF est détecté dans l'hypothalamus en voie de différenciation à E15,5, dans le NPV à E 16,5 et dans la partie antérieure de l'éminence médiane à E18 (BUGNON *et coll.* 1982). Le contenu hypothalamique en CRF augmente régulièrement de E17 à E21 (CHATELAIN *et coll.* 1988). Dans le NPV, les ARNm du CRF sont détectables à E17,

leur taux augmente entre E17 et E19 puis diminue jusqu'à E21 (GRINO *et coll.* 1989a, BARAM et LERNER 1991). In vitro, le CRF et à un degré moindre l'AVP stimulent la sécrétion d'ACTH par des adénohypophyses collectées à E17, E19 et E21 (DUPOUY et CHATELAIN 1984 ; DELOFF *et coll.* 1994). Enfin BOUDOURESQUE *et coll.* (1988) ont montré par immunoneutralisation passive à l'aide d'un immunosérum anti-CRF que ce neuropeptide régule la sécrétion d'ACTH hypophysaire foetal dès E17 toutefois, en fin de gestation, d'autres facteurs sécrétagogues paraissent intervenir dans le contrôle central de la sécrétion d'ACTH hypophysaire ; parmi eux figure l'AVP.

Les ARNm de l'AVP sont détectés dans le NPV dès E18 (ALMAZAN *et coll.* 1989) puis leur taux augmente de E18 à E21 ; cette évolution est conforme à celle de l'AVP mise en évidence par immunohistologie dans l'hypothalamus foetal. (GRINO et BURGUNDER 1992a).

Chez le foetus, la voie via laquelle CRF et AVP atteignent l'antéhypophyse n'est pas clairement élucidée tout au moins à un stade précoce du développement embryonnaire quand s'établissent les relations fonctionnelles entre l'hypothalamus et l'hypophyse. En effet, des connexions vasculaires entre l'éminence médiane et l'adénohypophyse se mettent en place entre E12 et E18 (SZABO et CSANYI 1982, HALASZ *et coll.* 1972), mais l'établissement de contacts neurohémax entre les fibres neurosécrétrices et les capillaires du système porte-hypophysaire, n'est pas observé avant E18 (BUGNON *et coll.* 1982, UGRUMOV *et coll.* 1985). Ces données suggèrent qu'à des stades plus précoces du développement, le CRF pourrait diffuser dans le tissu nerveux hypothalamique puis atteindre l'adénohypophyse par la circulation portale.

Dès E16, l'existence de sites récepteurs MR et/ou GR a été montré *in-vitro* (KITRAKI *et coll.* 1984). La densité des GR est faible au cours des premiers jours de vie extra-utérine aussi bien dans l'hypothalamus que dans l'hippocampe. Cependant, au cours de la période périnatale l'affinité de ces récepteurs pour la corticostérone est plus élevée que pour des stades ultérieurs. Le taux de ces récepteurs augmente ensuite pour atteindre celui de l'adulte entre la deuxième et la troisième semaine après la naissance (MEANEY *et coll.* 1985 ; ROSENFELD *et coll.* 1993). En ce qui concerne les MR, leur concentration est très faible au cours des premiers jours suivant la naissance, puis elle augmente fortement pour atteindre à la fin de la première semaine de vie extra-utérine le niveau de l'adulte. Ces récepteurs sont présents uniquement dans la région septohippocampale, et à l'inverse des GR ne présentent pas de modification de leur affinité pour la corticostérone (*revue in* ROSENFELD *et coll.* 1993). Leur expression, leur densité et leur caractéristique de liaison ne changent guère entre la première semaine de vie extra-utérine et le stade adulte (ROSENFELD *et coll.* 1988, SARRIEAU *et coll.* 1988, VAN-EEKELLEN *et coll.* 1991). Le contrôle par les glucocorticoïdes de l'activité des neurones à CRF ne semble cependant pas s'exercer entre E17 et E18 puisque, le blocage pharmacologique de la stéroïdogénèse surrénalienne par la métopirone (inhibiteur de la 11 β -hydroxylase), ne perturbe pas à cette période de la gestation l'expression du CRF dans le NPV (BARAM et SCHULTZ 1992). Néanmoins, entre E19 et E21 sur la base de plusieurs critères physiologiques on peut affirmer que le rétrocontrôle exercé par les glucocorticoïdes est opérationnel chez le foetus (DUPOUY et CHATELAIN 1984). La CBG est présente dans la circulation foetale au début de la 3^{ème} semaine de gestation, son taux plasmatique est voisin de celui de l'adulte (SMITH et HAMMOND 1991 ; ELFAHIME *et coll.* 1992) puis il chute régulièrement au cours des premiers jours de la vie extra-utérine (KOCH 1969 ;

D'AGOSTINO et HENNING 1981 ; DUPOUY et CHATELAIN 1986) ; il augmente ensuite pour atteindre celui de l'adulte 6 semaines environ après la naissance (HENNING 1978 ; SMITH et HAMMOND 1991).

En conclusion, chez le nouveau-né délivré à terme, l'axe corticotrope est pleinement développé et fonctionne de manière similaire à celle de l'adulte.

II.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

La partie de ce mémoire relative à l'axe gonadotrope chez le mâle et la femelle étant assez restreinte, le fonctionnement de cet axe ne sera rappelé que succinctement.

II.2.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (Fig 6).

Dans le testicule endocrine, la biosynthèse de la testostérone par les cellules de Leydig est sous le contrôle hypophysaire de l'hormone lutéinique (LH), dont la synthèse et la sécrétion par les cellules gonadotropes, dépendent de la gonadolibérine hypothalamique ou GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) qui atteint l'adénohypophyse via le sang porte hypothalamo-hypophysaire. En retour, des hormones testiculaires élaborées par les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli modulent l'activité de l'axe par divers mécanismes de rétrocontrôle mettant en jeu plus particulièrement la testostérone pour la production de GnRH et de LH, et l'inhibine pour celle de FSH (Follicule-Stimulating Hormone).

L'hormone stéroïde majeure produite par le testicule est la testostérone, dont les actions s'exercent principalement au niveau des organes de la sphère sexuelle et dont les effets biologiques déterminent les caractères sexuels secondaires.

La testostérone possède également un effet anabolisant et stimule les métabolismes protéiques, lipidiques et glucidiques.

II.2.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (Fig 7).

L'axe gonadotrope de la femelle présente le même type d'organisation que celui du mâle. La biosynthèse et la sécrétion par l'ovaire des deux hormones stéroïdes majeures l'oestradiol et la progestérone, est sous le contrôle hypophysaire de la LH et de la FSH elles-mêmes régulées par la sécrétion pulsatile de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. En retour, les hormones stéroïdes et peptidiques ovariennes modulent l'activité hypothalamique et/ou hypophysaire via de complexes mécanismes de rétrocontrôle (feedback) dits positif (activation) ou négatif (inhibition) (Fig 7).

II.2.3. La gonadolibérine hypothalamique.

La GnRH est un décapeptide dont l'extrémité N-terminale est cyclique (pyroglutamyl) et l'extrémité C-terminale amidée. Dans toutes les classes de vertébrés les corps cellulaires des neurones à GnRH, relativement peu nombreux (environ 1300 chez le rat, moins de 3000 chez le babouin et l'homme) et dispersés, sont localisés principalement dans l'hypothalamus antérieur. On les trouve au voisinage du septum, dans la bande diagonale de Broca, dans la partie ventrolatérale de l'aire préoptique et la région suprachiasmatique. Quelques cellules sont également présentes dans l'hypothalamus médiobasal et le noyau arqué.

signaux afférents provenant des centres nerveux supérieurs et du tronc cérébral

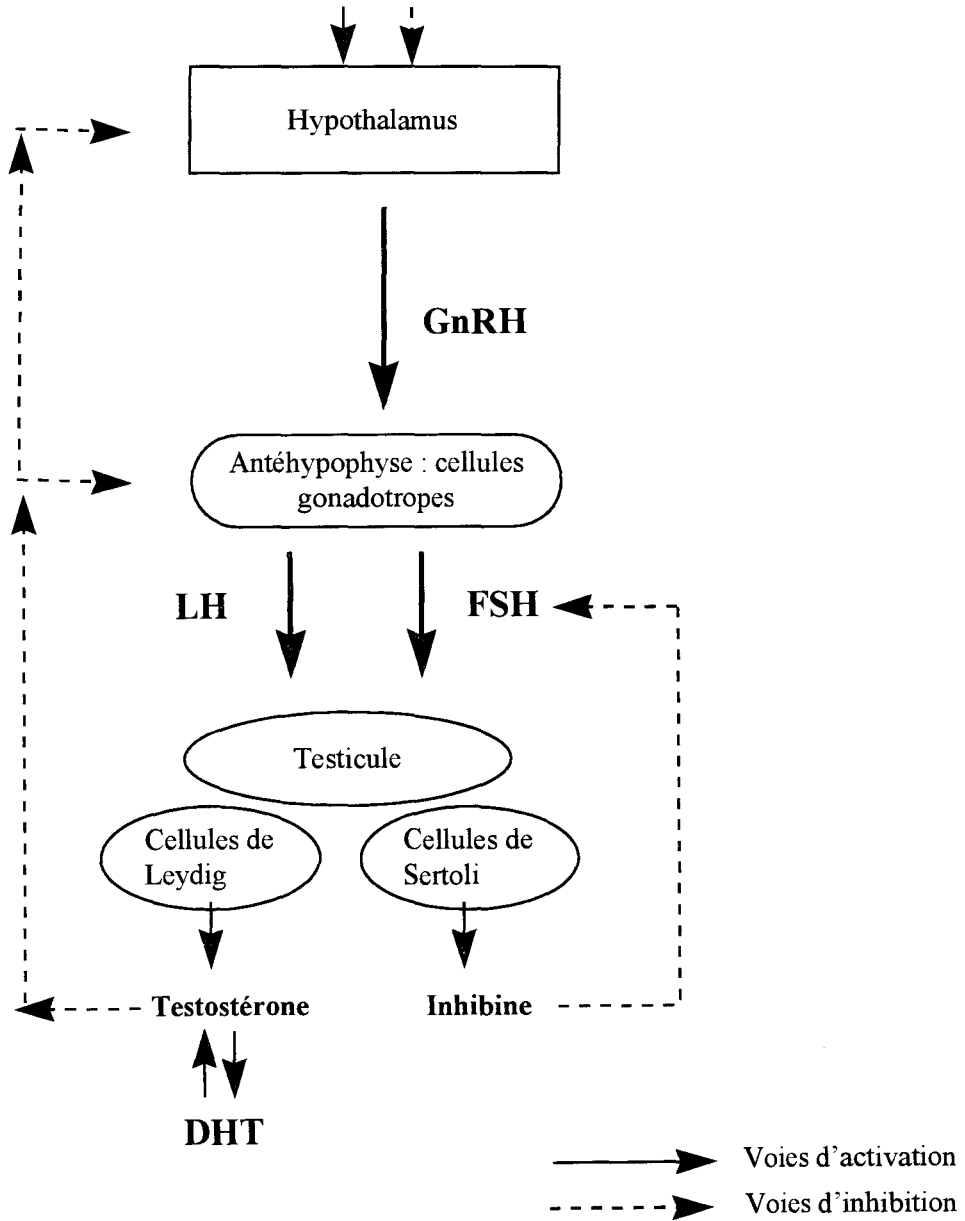


Figure 6 : Voies d'activation et d'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire.

signaux afférents provenant des centres nerveux supérieurs et du tronc cérébral

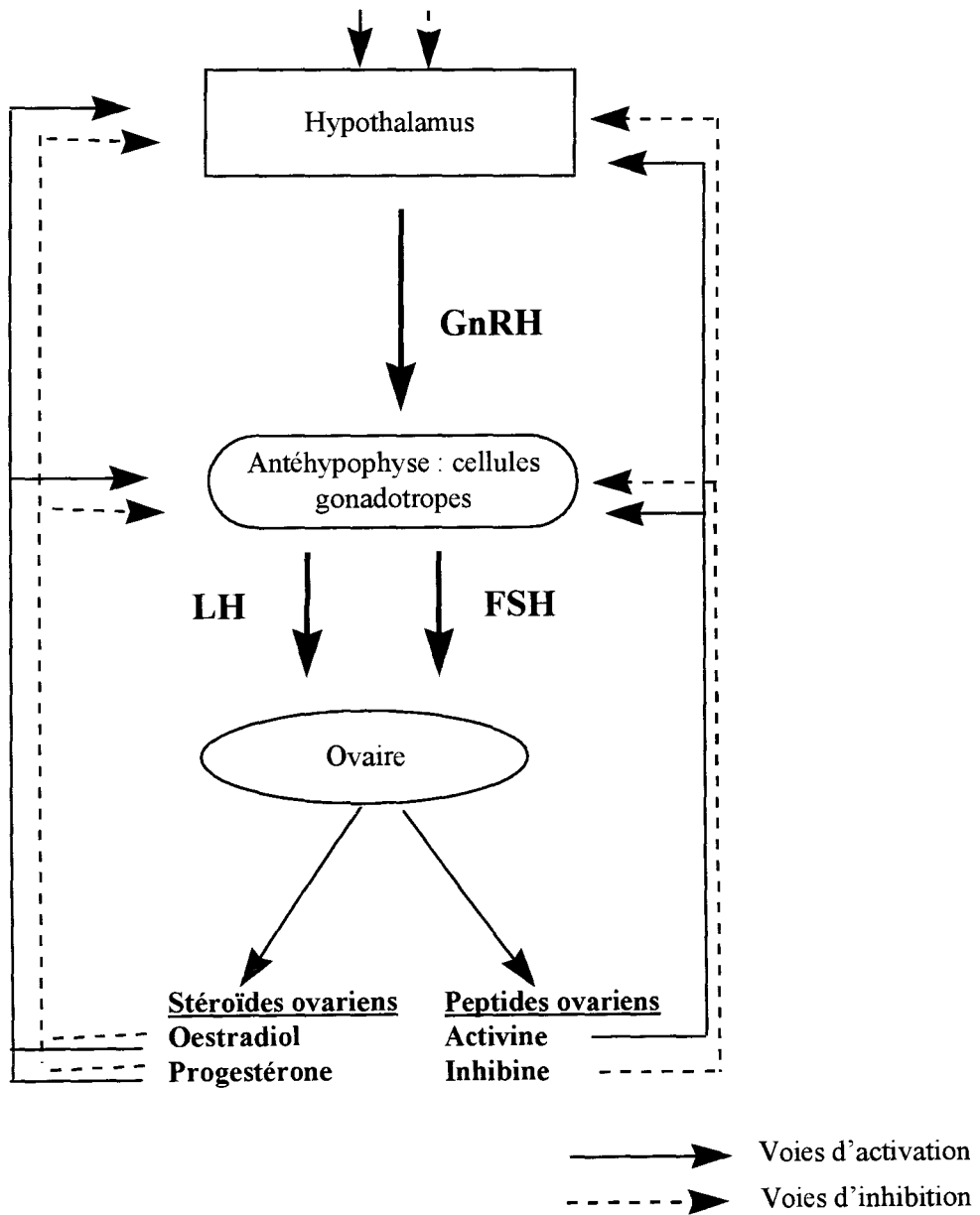


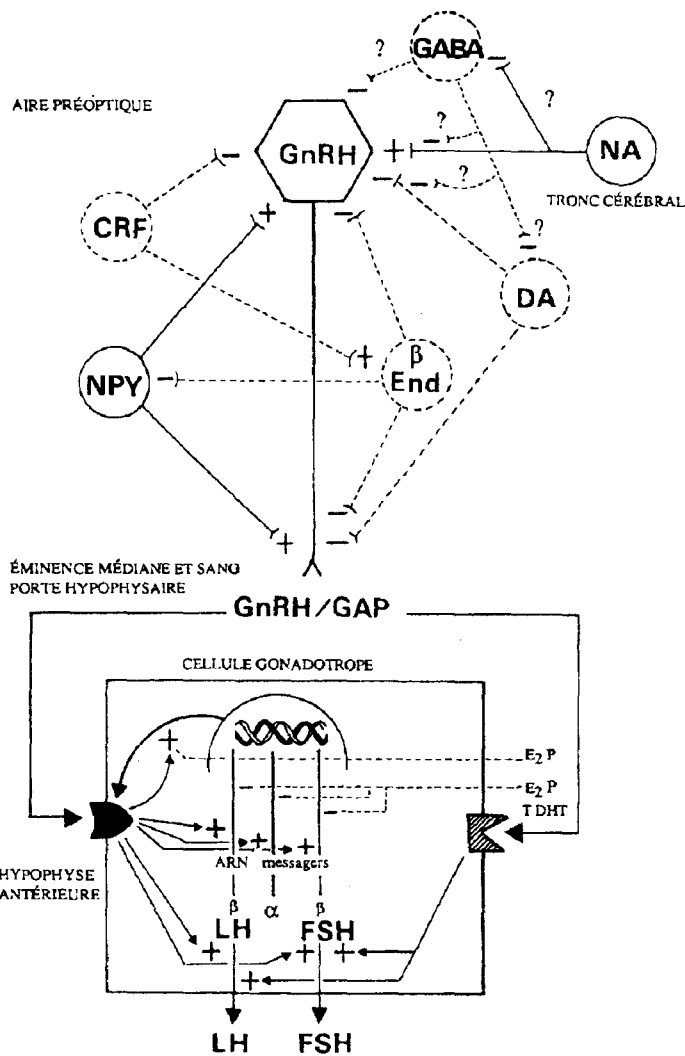
Figure 7 : Voies d'activation et d'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien.

Cependant, tous les neurones à GnRH ne sont pas impliqués dans le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope hypophysaire. Chez le rat 50 à 70% des neurones à GnRH seulement ont des terminaisons axoniques au niveau de l'éminence médiane (SILVERMAN *et coll.* 1987, MERCHENTHALER *et coll.* 1989). Les fibres à GnRH sont particulièrement abondantes dans l'éminence médiane et au niveau de l'organe vasculaire de la lame terminale (GAUTRON 1992). Les neurones à GnRH sont polymorphes, certains ont un aspect « lisse » du fait de la rareté de leurs expansions somato-dendritiques alors que d'autres bien plus nombreux ont un aspect « épineux » en raison de l'abondance de ces expansions. Ces derniers paraissent engagés dans des connexions synaptiques réciproques avec des neurones voisins dont quelques neurotransmetteurs ont été caractérisés (DA, noradrénaline, β endorphine, sérotonine, GABA, NPY). Chez le rat, la libération pulsatile de GnRH dans le sang portal implique une certaine synchronisation de l'activité de ces neurones hypophysiotropes à gonadolibérine, situés dans l'aire préoptique. Cette synchronisation, pour être réalisée, doit impliquer l'intervention d'afférences neuronales établissant, avec les neurones à GnRH un véritable réseau fonctionnel.

L'activation de la fonction gonadotrope hypophysaire met en jeu de très nombreux neurotransmetteurs dont la production et/ou la libération dépendent pour la plupart, des taux de stéroïdes sexuels dans la circulation. En ce qui concerne les relations établies entre les neurotransmetteurs étudiés dans ce travail, et la fonction gonadotrope hypophysaire rappelons brièvement :

- 1) que des neurones à NPY établissent des contacts synaptiques avec des neurones à GnRH et que le NPY stimule la libération de GnRH dans le sang porte hypophysaire et potentialise l'action stimulatrice de la GnRH sur la sécrétion de LH hypophysaire (*revue in DUPOUY 1992*).
- 2) que des neurones à GnRH sont aussi contactés par des fibres catécholaminergiques (DA, NA) et que la NA a une action stimulatrice directe sur les neurones à GnRH (*revue in DUPOUY 1992*).
- 3) que des fibres sérotoninergiques établissent des contacts avec des corps cellulaires de neurones à GnRH dans l'aire préoptique et avec des terminaisons axonales de neurones à GnRH dans l'éminence médiane. De plus, la 5HT, dont le métabolisme hypothalamique est accru lors de la sécrétion de LH en phase préovulatoire du cycle oestrien chez la femelle, stimule *in-vitro* la sécrétion de GnRH (*revue in VITALE et CHIOCCIO 1993*).

Divers autres neurotransmetteurs sont susceptibles de participer, semble-t-il à un degré moindre, au contrôle activateur de la fonction gonadotrope hypophysaire. En ce qui concerne le contrôle inhibiteur de celle-ci, on peut citer, de manière non exhaustive, le rôle joué par les peptides opioïdes endogènes (dont la β endorphine), le CRF, la dopamine ou encore le GABA (*revue in DUPOUY 1992*). A un moment précis du cycle oestrien ou du cycle menstruel, la prédominance de l'activation ou de l'inhibition de la fonction gonadotrope dépend d'une part de multiples interrelations fonctionnelles entre plusieurs groupes de neurones précédemment cités et d'autre part de l'état endocrinien des animaux et, plus particulièrement, des taux de stéroïdes sexuels gonadiques dans la circulation (cf. Fig. 8).



Effets stimulants (+) ou inhibiteurs (-)

E₂ = œstradiol

P = progestérone

T = testostérone

DHT = dihydrotestostérone

Les neurones impliqués directement ou indirectement dans l'activation de la fonction gonadotrope sont représentés en traits pleins ; ceux qui sont impliqués dans son inhibition sont représentés en traits discontinus.

Figure 8 : Représentation schématique et non exhaustive du contrôle de la fonction gonadotrope de l'hypophyse antérieure (d'après : DUPOUY JP, 1992, *Hormones et grandes fonctions*. Collection Ellipses, Tome I, p.150).

II.2.4. Gonadotropines hypophysaires.

La LH et la FSH sont des hormones glycoprotéiques, composées de deux sous-unités distinctes, α et β , dont les chaînes polypeptidiques sont associées de manière non-covalente (PIERCE et PARSONS 1981).

Dans une espèce donnée, la chaîne polypeptide de la sous-unité α est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques hypophysaires (LH, FSH, TSH) et placentaires (HCG). Ces hormones antéhypophysaires sont synthétisées dans les cellules gonadotropes (LH, FSH) ou thyroïdiques (TSH). La sous-unité α est codée par un seul gène alors que les sous-unités β , spécifiques de chaque hormone, sont codées par des gènes différents (PIERCE et PARSONS 1981, COMBARNOUS 1991). La synthèse de FSH et de LH est généralement colocalisée dans les mêmes cellules gonadotropes. Celle de LH est essentiellement sous le contrôle de la gonadolibérine hypothalamique. Celle-ci contrôle la transcription du gène de la LH β et stimule à très court terme la sécrétion de LH. Ainsi, la sécrétion pulsatile de LH par l'hypophyse dépend directement de la pulsativité des neurones hypothalamiques à GnRH (CALDINI *et coll.* 1991). Les effets de la GnRH sur la transcription du gène de la FSH β et sur la sécrétion de FSH sont plus discrets que ceux relatifs à la LH. Ceci explique pourquoi la GnRH a été initialement, mais de manière trop restrictive, nommée LH-RH (LH-releasing hormone). Bien que la présence de la GnRH soit indispensable à la synthèse et à la sécrétion de LH et à un moindre degré de FSH, d'autres facteurs (oestradiol, inhibine, activine) peuvent également intervenir (ROTTEN 1991). La synthèse et la sécrétion de FSH dépendent de rétroactions exercées par des stéroïdes (oestradiol, progestérone, testostérone) et par des facteurs protéiques gonadiques (inhibine, activine, follistatine) ayant principalement mais non exclusivement pour cible l'adénohypophyse (CALDINI *et coll.* 1991). A l'inverse, la synthèse et la sécrétion de LH dépendent de rétroactions qui s'exercent en majeure partie sur l'hypothalamus et aboutissent à une modulation de la pulsativité (amplitude et fréquence) de la sécrétion de GnRH (CALDINI *et coll.* 1991). Toutefois, comme les neurones à GnRH n'ont pas de récepteurs aux stéroïdes (SHIVERS *et coll.* 1983, WATSON *et coll.* 1992, HUANG et HARLAN 1993), ces derniers ne peuvent agir que par l'intermédiaire direct ou indirect d'autres neurones (aminergiques et peptidergiques) qui, pour certains d'entre eux, possèdent des récepteurs aux stéroïdes (HERBISON *et coll.* 1991, HERBISON et THEODOSIS 1992). La GnRH, libérée dans le sang portal de manière pulsatile, selon une fréquence et une amplitude propres à chaque espèce, agit directement sur les cellules gonadotropes via des récepteurs membranaires bien caractérisés et induit une sécrétion pulsatile mais permanente de gonadotrophines (HAZUM et CONN 1988).

L'initiation de la sécrétion de LH, induite par la GnRH, implique le calcium et la calmoduline. La GnRH provoque l'activation de la phospholipase C, la production d'inositol phosphates, et de diacylglycérol, l'activation de la protéine Kinase C (PK-C). Ce mécanisme de transduction du signal neurohormonal intervient aussi bien pour la libération de LH que pour la stimulation de sa synthèse via la production des ARNm des sous-unités α et LH β . Par ailleurs, puisque l'AMPC stimule également l'expression des gènes de ces sous-unités, et que la GnRH augmente sa production, ce second messager est un autre candidat potentiel comme médiateur intracellulaire des effets de la GnRH (*revue in* DUPOUY 1992). Chez le mâle, la LH se fixe à des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules de Leydig testiculaires,

et positivement couplés au système adénylate-cyclase/AMPC. Par ce biais, la LH stimule la synthèse et la sécrétion de testostérone. La FSH stimule aussi la stéroïdogénèse leydigienne, mais de manière indirecte via la sécrétion, par les cellules de Sertoli dotées de récepteurs à cette hormone gonadotrope, de facteurs diffusibles à actions paracrines. Ces deux hormones gonadotropes (LH et FSH) en initiant une cascade d'interactions cellulaires au niveau testiculaire sont impliqués dans le développement des cellules germinales, la différenciation des cellules myoïdes périvitubulaires et le bon fonctionnement des cellules de Leydig autrement dit dans le contrôle des fonctions exocrine et endocrine des testicules (*revue in DUPOUY 1992*). Chez la femelle, la LH et la FSH sont impliquées dans le développement folliculaire au sein de l'ovaire. La FSH stimule la multiplication des cellules de la granulosa et la formation de l'antrum. De plus, la FSH, via un mécanisme dépendant de l'AMPC, induit la synthèse des récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa, permettant à cette hormone d'exercer son rôle trophique sur ces cellules folliculaires pour aboutir à la maturation du follicule préovulatoire. La LH est aussi impliquée dans la différenciation des cellules de la thèque interne en cellules stéroïdogènes et dans la régulation de la stéroïdogénèse alors que la FSH, en stimulant l'aromatase des cellules de la granulosa permet la transformation d'androgènes élaborés par les cellules de la thèque interne en oestrogènes. Ainsi, la LH et la FSH sont deux des hormones majeures agissant en synergie pour assurer la stéroïdogénèse folliculaire. Le pic de LH qui survient en milieu de cycle (cycle menstruel ou en proestrus cycle oestrien) accompagné d'un pic plus discret de FSH provoque l'ovulation ; la LH initie en phase postovulatoire les changements morphologiques et fonctionnels caractéristiques du corps jaune (*revue in DUPOUY 1992*).

II.2.5. Ontogénèse de l'axe gonadotrope.

Aux environs du 15ème jour du développement embryonnaire, les testicules de rat sont capables de synthétiser et de sécréter de la testostérone (McEWEN 1978). La LH stimule la sécrétion de testostérone dès E 18,5, au delà de ce stade (entre E 18,5 et E 21) la réponse à la LH diminue, tandis que dans les testicules le nombre de cellules de Leydig double (HABERT 1993).

Chez la femelle, les ovaires sécrètent peu d'oestrogènes au cours de la vie foetale mais leur sécrétion s'accroît significativement 5 jours après la naissance. Bien que les ovaires des foetus répondent à la LH par une production d'AMPC dès le stade E 14, le contrôle de la stéroïdogénèse ovarienne par les hormones gonadotropes adénohypophysaires ne paraît pas s'établir de manière indiscutable avant le 5ème jour postpartum (WENIGER *et coll.* 1993).

En ce qui concerne la biosynthèse de LH et de FSH, les cellules gonadotropes synthétisent et sécrètent la sous-unité α bien avant de synthétiser la sous-unité β de la LH ou de la FSH (SIMMONS *et coll.* 1990). Ainsi, la sous-unité α libre est décelable dans l'ébauche hypophysaire avant même l'individualisation de la poche de Rathke, vers le 11ème jour de gestation chez le rat ; elle constitue un des marqueurs les plus précoces de la différenciation hypophysaire. La LH résultant de l'association des sous-unités α et LH β , apparaît à 17 jours de gestation chez le rat ; son apparition précède de quelques heures celle de FSH, décelable par immunohistologie au voisinage de 19 jours (*revue in TARAGNAT 1997*). Ces résultats concernant les peptides chez le rat ont été confirmés par l'analyse des ARNm des sous-unités α , LH β et FSH β ; en effet la

présence de transcrits α est notée dès le 11^{ème} jour de gestation, celle de transcrits LH β et FSH β respectivement vers 16,5 et 17,5 jours (*revue in* TARAGNAT 1997).

Chez l'embryon de rat, la GnRH est détectée dès 11,5 jours de gestation, exclusivement au niveau de l'épithélium olfactif ; dès lors, les neurones à GnRH commencent leur migration le long du septum nasal en direction du cerveau proprement dit. Au cours de cette migration, des fibres axoniques de neurones à GnRH se dirigent vers l'éminence médiane (*revue in* EL AMRAOUI 1995). La GnRH est détectée dans l'hypothalamus à partir du 12^{ème} jour de gestation (*revue in* TARAGNAT 1997). Après migration, les neurones à GnRH du rat sont en grande majorité localisés dans l'aire préoptique (SILVERMAN 1988). En fin de gestation, une augmentation du nombre de neurones est observée autour de l'aire préoptique, alors que les neurones à GnRH ne sont plus observés dans la région nasale et à proximité du nerf olfactif (*revue in* EL AMRAOUI 1995).

Les cellules gonadotropes adénohypophysaires répondent à la GnRH dès le stade E 18,5, toutefois le contrôle endogène de la sécrétion des hormones gonadotropes hypophysaires par la GnRH hypothalamique n'est pas clairement établi avant le stade 20,5 (DAIKOKU *et coll.* 1981). Ces observations montrent la mise en place progressive de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire au cours de la vie foetale. Cet axe est fonctionnel avant la naissance puisque la destruction in-utéro de l'hypothalamus par encéphalotomie ou l'ablation simultanée du cerveau et de l'hypophyse par décapitation dès le stade E 16,5 induisent une inhibition de la maturation et du fonctionnement des cellules de Leydig chez le fœtus mâle (*revue in* DAIKOKU *et coll.* 1981). Le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope chez le rat mâle s'exerce dès le stade E19 et la rétroaction négative de la testostérone sur la libération de LH et probablement celle de GnRH semble opérationnelle aux stades E19 et E21 de la gestation (LALAU *et coll.* 1990a,b).

L'ensemble de ces données et bien d'autres apporte la preuve que, à la naissance, l'axe gonadotrope du nouveau-né mâle est fonctionnellement en place (*revue in* TARAGNAT 1997). Au cours de la vie foetale, l'activité endocrine du testicule du rat est très importante à E19, stade où la testostéronémie est maximale (LALAU *et coll.* 1990a,b).

II.3. Ontogénèse de systèmes neuronaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle des fonctions corticotrope et gonadotrope hypophysaires.

II.3.1. Le système sérotoninergique.

Chez le rat adulte, les fibres sérotoninergiques qui innervent l'hypothalamus ont pour origine des corps cellulaires des noyaux du raphé et des neurones à 5HT présents dans l'hypothalamus dorso-médian (FRANKFURT *et coll.* 1981 ; STEINBUSCH et NIEUWENHUYNS 1981). Les premiers neurones sérotoninergiques des noyaux B4 et B9 du raphé, du mésencéphale et de la protubérance apparaissent dès le stade E13 du développement embryonnaire. Des projections nerveuses ascendantes à destination du diencéphale en général et de la région hypothalamique en particulier ont été mises en évidence entre E14 et E15 (WALLACE *et coll.* 1983). Au stade E16, quelques fibres sérotoninergiques en provenance des noyaux du raphé innervent la portion dorso-caudale du 3^{ème} ventricule et la région suprachiasmatique (UGRUMOV *et coll.*

1986). Deux jours plus tard, un réseau dense de fibres sérotoninergiques apparaît autour du 3^{ème} ventricule (UGRUMOV *et coll.* 1985b) ainsi qu'au niveau du chiasma optique, de l'aire préoptique, du septum, de l'organe vasculaire de la lame terminale et de quelques noyaux de la région médiobasale de l'hypothalamus (UGRUMOV *et coll.* 1986). L'éminence médiane reçoit aussi un important contingent de fibres à 5 HT, mais à ce stade (E18) ces fibres se terminent pour la plupart dans la zone sub-épendymaire et au niveau de la zone externe de l'éminence médiane ; peu d'entre-elles atteignent le plexus capillaire primaire du système porte-hypophysaire. Chez des rats âgés de 9 jours des fibres à 5HT établissent des contacts neurohémaux au niveau de la couche externe de l'éminence médiane (UGRUMOV *et coll.* 1986).

Les données de la littérature relatives au développement et au fonctionnement des récepteurs de la sérotonine sont assez peu nombreux, de plus, ces récepteurs sont polymorphes. HELLENDALL *et coll.* (1992) ont détecté chez le rat la présence d'ARNm codant pour différents types de récepteurs à la sérotonine dès le stade E14 (récepteurs 5HT_{1C} dans le plexus choroid et 5 HT_{1A} dans les noyaux B4 et B9 du raphé) et au stade E18 (récepteurs 5 HT₂ dans le cortex cérébral). A des stades précoces du développement foetal, la population de récepteurs à la 5HT est élevée puis elle diminue ensuite pour atteindre les taux de l'adulte (UZBEKOV *et coll.* 1979).

La mise en place du système sérotoninergique central suggère que la Sérotonine pourrait entre autre jouer un rôle dans le contrôle neuro-endocrinien de fonctions adénohypophysaires du fœtus à des stades précoces du développement intra-utérin. UGRUMOV *et coll.* (1985a) ont émis l'hypothèse que la Sérotonine circulant dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut à des stades précoces de l'ontogénèse moduler les sécrétions hypophysaires après avoir été absorbée par les tanicytes puis captée soit par des cellules neurosécrétrices, soit par les vaisseaux du système porte adénohypophysaires.

II.3.2. Le système catécholaminergique.

L'hypothalamus du fœtus et du nouveau-né comme celui de l'adulte est innervé par des fibres catécholaminergiques issues de corps cellulaires de neurones hypothalamiques et du tronc cérébral. Dès le 13^{ème} jour de gestation des fibres catécholaminergiques peuvent être mises en évidence dans l'hypothalamus médian. (UGRUMOV *et coll.* 1989b), et des neurones présentant une immunoréactivité à la tyrosine hydroxylase (enzyme impliquée dans la biosynthèse des cathécolamines via la conversion de la tyrosine en DOPA) apparaissent dans l'hypothalamus et le septum. (UGRUMOV *et coll.* 1989a). Au 15^{ème} jour de gestation, ces neurones se répartissent de manière bilatérale dans la partie dorsale de l'hypothalamus. Au 18^{ème} jour, des fibres catécholaminergiques sont présentes dans le septum et la bande de BROCA ; elles innervent, chez le nouveau-né comme chez l'adulte, des neurones à GnRH (WRAY et HOFFMAN 1986). A ce stade du développement intra-utérin, les premières terminaisons catécholaminergiques apparaissent dans l'éminence médiane ; par la suite leur nombre s'accroît jusque la 4^{ème} semaine après la naissance (UGRUMOV *et coll.* 1989b ; UGRUMOV et MITSKEVICH 1992).

Dans le NPV, bien que les premières fibres catécholaminergiques soient observées dès le 17^{ème} jour (KHACHATURIAN et SLADEK 1980) ou au 19^{ème} jour de gestation (HYPPA 1969). C'est surtout à partir de la naissance que le réseau de fibres se développe pour atteindre sa complexité maximale dans le NPV de l'adulte

où ces fibres entrent en contact avec des neurones peptidergiques dont ils modulent l'activité (FOSTER *et coll.* 1985).

Chez le fœtus, du 18^{ème} au 21^{ème} jour, les neurones catécholaminergiques se répartissent dans l'ensemble de l'hypothalamus et plus particulièrement dans sa portion antérieure, puisqu'on les rencontre plus volontiers dans les noyaux péri et paraventriculaires, et, dans une moindre mesure, dans les noyaux suprachiasmatiques et supraoptiques ainsi que dans l'aire préoptique médiane (UGRUMOV *et coll.* 1989a). Dans la partie ventrale de l'hypothalamus médian et postérieur, un important groupe de neurones catécholaminergiques innerve la zona incerta, les noyaux dorsomédians et postérieurs de l'hypothalamus ; leurs fibres atteignent latéralement l'éminence médiane (UGRUMOV *et coll.* 1989a). En fin de gestation certains de ces neurones commencent à migrer en direction du noyau arqué.

Au cours de la période postnatale, la répartition des neurones catécholaminergiques de l'hypothalamus n'est pas sensiblement différente de celle observée chez le fœtus à terme à ceci près que le nombre de neurones augmente dans toutes les régions avec l'âge (UGRUMOV *et coll.* 1989a). Deux à trois semaines après la naissance, les interrelations entre ces neurones et des neurones peptidergiques du NPV sont similaires à celles observées chez l'adulte (KHACHATURIAN et SLADEK 1980). Dans l'éminence médiane, le nombre de fibres catécholaminergiques et l'intensité de leur marquage en immunohistologie augmentent avec l'âge et sont maxima vers le 33^{ème} jour postnatal au moment de la maturité sexuelle (HYPPA 1969, LOIZOU 1971, IBATA *et coll.* 1982).

En conclusion, ces données morphologiques suggèrent que les catécholamines pourraient jouer un rôle dès la naissance voire avant dans le contrôle central de fonctions adénohypophysaires. Il convient cependant de noter que le système catécholaminergique plus que le système sérotoninergique subit d'importantes modifications postnatales. La participation éventuelle de ces deux systèmes neuroniques dans le contrôle de fonctions hypophysaires au cours de la période postnatale précoce sera discuté par la suite.

II.3.3. Le système NPYergique.

Les premiers corps cellulaires immunoréactifs au NPY sont détectés dès le 13^{ème} jour de gestation dans le tronc cérébral du fœtus de rat (WOODHAMS *et coll.* 1985). Au 14^{ème} jour le NPY est quantifiable par dosage radioimmunologique dans le diencephale (ALLEN *et coll.* 1984). Dans le tronc cérébral, l'apparition du NPY est synchronisée avec le développement des systèmes catécholaminergiques. Ceci n'est pas surprenant puisque chez l'adulte, NPY et catécholamines sont colocalisés dans des terminaisons de neurones adrénérgiques des complexes ventrolatéraux C1 et dorso-vagaux C2 de la *médulla* ainsi que dans des terminaisons de neurones noradrénérgiques des complexes A₁, A₂, A₄ et A₆ (EVERITT *et coll.* 1984). Au cours du développement, tous ces complexes neuroniques contiennent du NPY, bien que sa répartition locale puisse présenter une certaine hétérogénéité. Ainsi, dans le complexe A₆, le NPY détecté par immunohistologie paraît peu abondant et cantonné à la partie ventro-médiane du locus coeruleus ; dans le complexe A₄ quelques fibres à NPY sont décelables au voisinage du 4^{ème} ventricule (WOODHAMS *et coll.* 1985).

Dans l'hypothalamus, les premiers neurones à NPY apparaissent dans le noyau arqué et dans l'aire dorsolatérale au stade E 14,5. De E 15 à E 17, des fibres à NPY en provenance des régions dorsales et ventrales du thalamus atteignent l'hypothalamus. A E 18 l'hypothalamus s'enrichit en fibres et corps cellulaires NPYergiques particulièrement dans les noyaux arqués et paraventriculaires (KAGOTANI *et coll.* 1989).

Au 19ème jour de gestation, des neurones à NPY de la strie terminale innervent la zone préoptique de l'hypothalamus. Dès lors, jusqu'à la naissance (E 21), le nombre de corps cellulaires et de fibres et NPYergiques augmente dans l'hypothalamus, particulièrement dans les noyaux arqués, dorsomédio-latéraux et paraventriculaires (KAGOTANI *et coll.* 1989). A la naissance, la distribution des neurones à NPY dans le cerveau est pratiquement identique à celle observée chez l'adulte (WOODHAMS *et coll.* 1985).

Après la naissance, le marquage immunocytochimique du NPY intéresse principalement des fibres nerveuses, toutefois des corps cellulaires situés dans les noyaux arqués restent bien marqués (KAGOTANI *et coll.* 1989).

Ces données suggèrent donc que le système NPYergique du cerveau se met en place au cours de la dernière semaine de la vie foetale. On ignore quel est son rôle chez le fœtus, néanmoins compte tenu de ce que l'on sait chez l'adulte, on peut émettre l'hypothèse qu'il puisse participer dès la naissance au contrôle multifactoriel des sécrétions hypophysaires de LH et d'ACTH, de manière directe (via la sécrétion dans le sang portal) et/ou de manière indirecte (via le contrôle des neurones à GnRH et à CRF).

PREMIERE PARTIE

Etude Préliminaire :

Evolution des métabolismes hypothalamiques de neurotransmetteurs (Sérotonine, Noradrénaline, Dopamine, Neuropeptide Y) en relation avec l'activation des axes gonadotrope et corticotrope au cours de la période postnatale précoce chez le rat.

I. INTRODUCTION

Au cours de la gestation, le fœtus vit dans des conditions privilégiées lui permettant de laisser certains organes au repos ou au semi-repos. Les échanges gazeux étant assurés par le placenta, le système pulmonaire est pratiquement quiescent; les besoins métaboliques étant également assurés par des échanges transplacentaires, l'appareil digestif et les reins fonctionnent au ralenti, bien que le fœtus déglutisse du liquide amniotique et produise de l'urine. Enfin, le fœtus in utero n'a pas à assurer la thermorégulation. Son séjour dans l'utérus est néanmoins marqué par l'organogénèse, la mise en place de fonctions vitales, d'interrelations fonctionnelles entre divers organes et tissus et la préparation de la vie extra-utérine. Par ailleurs, la circulation du sang dans l'appareil cardio-vasculaire est permanente mais elle s'effectue, là encore, de façon privilégiée. Les résistances systémiques sont basses, et la circulation pulmonaire est quasiment au repos. A la naissance, tous ces systèmes vont devoir s'adapter brutalement aux conditions de vie extra-utérine dans un milieu aérien relativement froid, avec des apports de substrats énergétiques à assurer par l'alimentation, des déchets à éliminer par le rein et un équilibre hydro-minéral à maintenir. Il existe cependant des priorités déterminées par les nécessités de la survie immédiate ; en premier lieu viennent l'approvisionnement en O₂, le rejet de CO₂ et le maintien d'une glycémie normale. Ceci nécessite d'une part l'adaptation du système pulmonaire et l'établissement de la circulation coeur-poumon et d'autre part des modifications endocriniennes adaptées pour utiliser les substrats énergétiques stockés pendant la gestation (glycogène hépatique, lipides du tissu adipeux) et pour assurer la régulation du métabolisme énergétique à partir de substrats endogènes et exogènes.

Au niveau endocrinien, au cours des toutes premières heures qui suivent la naissance, période que nous nommerons « postnatale précoce » (PP) plusieurs systèmes endocriniens sont activés, c'est en particulier le cas pour les axes gonadotrope et corticotrope.

I.1. L'hyperactivité testiculaire du nouveau-né.

L'hyperactivité testiculaire (HAT) du rat nouveau-né se caractérise par un pic fugace de sécrétion de testostérone (T) dans les minutes qui suivent la naissance (CORBIER *et coll.* 1978 ; PANG *et coll.* 1979 ; SLOB *et coll.* 1980). Cette activation testiculaire néonatale entraîne, parallèlement à l'augmentation de la testostéronémie, une intense et éphémère élévation du contenu de l'hypothalamus en T et de son dérivé par aromatisation, l'oestradiol (E₂), (CORBIER *et coll.* 1981 ; RHODA *et coll.* 1983, 1984). L'HAT n'est pas propre au rat ; elle a été retrouvée chez plusieurs espèces de mammifères dont la souris, le poulain et l'homme (CORBIER *et coll.* 1990, 1992). Le pic de T est lié au fait de naître ; ni le passage de l'obscurité à la lumière, ni l'abaissement raisonnable de température entre le milieu intra-utérin et le milieu extérieur, ni la chute de la progestéronémie qui accompagne la mise-bas ne sont des facteurs susceptibles d'expliquer l'apparition de cette hyperactivité testiculaire aussi précoce qu'éphémère (ROFFI *et coll.* 1985). L'HAT résulte de l'activation de l'axe gonadotrope chez le mâle, puisqu'elle est associée à une sécrétion intense et fugace de LH par l'adénohypophyse (ROFFI *et coll.* 1977 ; SLOB *et coll.* 1980) et à une élévation transitoire du contenu hypothalamique en GnRH (CORBIER *et coll.* 1983b).

Ces profondes modifications du milieu hormonal observées en période postnatale précoce jouent un rôle essentiel dans la sexualisation définitive du système nerveux central (SNC). En effet, il est bien établi, grâce aux travaux de CORBIER *et coll.* (1981 ; 1983a , b ; 1992) et de ROFFI *et coll.* (1986 ; 1987) que le comportement sexuel normal (attitude de monte chez le mâle, de lordose chez la femelle) tout comme le caractère acyclique de la sécrétion de LH chez le mâle résultent d'une sexualisation du SNC par la T et son dérivé l'oestradiol (E₂) au cours de la période périnatale. L'HAT est précédée, in utero, d'une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire dont l'apogée se situe à 18 ou 19 jours de gestation (WEISZ et WARZ 1980 ; HABERT et PICON 1982 ; LALAU *et coll.* 1990a) ; cette hyperactivité testiculaire prénatale pourrait être, quant à elle en relation avec l'organogénèse sexuelle de type mâle.

Tout laisse penser que la T sécrétée par le fœtus et le nouveau-né exerce une action déféminisante et/ou masculinisante sur le SNC, en désensibilisant l'animal adulte aux hormones sexuelles femelles et/ou en le sensibilisant aux androgènes. L'HAT joue un rôle dans l'établissement de la réponse sexuellement dimorphique de la fonction corticotrope hypophysaire au cours d'un stress plus intense et plus durable chez la femelle que chez le mâle (*revue in* DUPOUY *et coll.* 1987). L'HAT rend les mâles adultes plus sensibles à la T. Les mâles castrés immédiatement après la naissance, avant que survienne l'HAT, traités à l'âge adulte par de la T ont une fréquence de monte bien plus faible que des mâles normaux et nécessitent une exposition plus longue à la T pour induire le chevauchement de la femelle en oestrus (CORBIER *et coll.* 1981). La sécrétion, pré et/ou postnatale, de T est aussi impliquée dans l'établissement de différences neuroanatomiques observées au niveau du SNC entre mâles et femelles. En effet, un noyau (*Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area* ou SDN-POA) situé dans l'aire préoptique médiane de l'hypothalamus est quatre fois plus grand chez le rat mâle que chez la femelle ; sa taille diminue chez le mâle castré à la naissance et de ce fait privé d'HAT (CORBIER *et coll.* 1983b). Cependant l'HAT n'est probablement pas l'unique responsable de cette différence neuroanatomique puisque la castration du mâle ne confère pas à ce noyau une taille comparable à celle du noyau observé chez la femelle (CORBIER 1983b).

Le nouveau-né femelle peut être masculinisé ou déféminisé par un apport unique de testostérone ou d'oestradiol (CORBIER *et coll.* 1983b). Toutefois le fœtus et le nouveau-né femelle, sont protégés de cette action de l'E₂ sur le SNC par la présence dans le plasma d'une protéine de transport, l' α -foeto-protéine (AFP), qui lie les oestrogènes avec une forte affinité (ATTARDI et RUOSLAHTI 1976) et de ce fait doit réduire son accès aux structures nerveuses centrales.

Au cours de la période périnatale, le plasma de rat contient en effet de grandes quantités d'AFP, qui traverse la barrière hémato-encéphalique et se distribue, pour une grande part, dans le liquide extra-cellulaire (PLAPINGER *et coll.* 1973).

Le jour de la naissance, la concentration plasmatique en AFP est telle que cette protéine pourrait lier des quantités d'E₂ beaucoup plus grandes que celles qui sont présentes dans le plasma à ce stade (ATTARDI et RUOSLAHTI 1976). Ces différentes données plaident en faveur du fait que l'AFP joue un rôle clé dans la protection du SNC de la femelle contre l'action masculinisante de l'E₂ au cours de la période périnatale. Par ailleurs, l'axe gonadotrope de la femelle, contrairement à celui du mâle

est peu ou pas activé au cours de cette période (PANG *et coll.* 1979, SLOB *et coll.* 1980, RHODA *et coll.* 1984).

I.2. L'activité glucocorticoïde surrénalienne du nouveau-né.

La naissance représente un changement radical d'environnement pour le fœtus, le nouveau-né se trouve alors exposé à divers stress parmi lesquels figurent l'hypothermie, l'hypoxie et l'hypoglycémie (LAGERCRANTZ et SLOTKIN 1986). Les glucocorticoïdes et les catécholamines étant par excellence les hormones du stress, il n'est donc pas surprenant d'assister à une activation de l'axe corticotrope du nouveau-né durant cette période critique du développement.

En effet, une brusque élévation de la corticostéronémie et de la cortisolémie apparaissent dans les premières heures de vie extra-utérine, respectivement chez le rat (COHEN et PECHINOT 1979) et chez l'homme (KRAIEM *et coll.* 1985 ; ROKICKI *et coll.* 1990). Cette hyperactivité surrénalienne néonatale est déclenchée par une élévation de l'ACTHémie (NAGAYA et WIDMAIER 1993).

L'hypoglycémie néonatale apparaît comme un des facteurs responsables de cette activation de la fonction corticotrope hypophysaire. Durant la période postnatale précoce l'hypoglycémie est négativement corrélée avec l'hyper-corticostéronémie. Le rat âgé de 1 jour est capable de répondre à certains stimuli physiologiques comme par exemple l'hypoglycémie néonatale (SANN 1990). L'hypoglycémie induite par une injection d'insuline chez celui-ci entraîne une élévation de la corticostéronémie (ARAI et WIDMAIER 1991). Enfin, si la glycémie néonatale est supérieure à 60-70 mg/dl, l'axe corticotrope n'est pas activé (NAGAYA et WIDMAIER 1993). L'action hyperglycémisante des glucocorticoïdes peut jouer un rôle majeur dans la restauration de l'homéostasie au cours de cette phase critique de la vie postnatale.

I.3. Autres fonctions endocriniennes majeures activées à la naissance.

I.3.1. Fonction minéralocorticoïde et système rénine angiotensine.

La surrénale du nouveau-né synthétise de l'aldostérone et l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien durant la période périnatale concerne aussi la fonction minéralocorticoïde (DELOOF *et coll.* 1992). Le système rénine-angiotensine est opérationnel chez le nouveau-né ; l'activité rénine plasmatique et la concentration en angiotensine II (AII) sont plus élevées dans le sang du cordon ombilical que dans le sang maternel (*revue in* SIZONENKO et AUBERT 1978).

I.3.2. Fonction thyroïdienne.

Les premières heures de vie extra-utérine sont également marquées par une stimulation de l'axe hypophyso-thyroïdien. La teneur du plasma en TSH s'élève et atteint un pic 30 minutes après la naissance pour décroître ensuite et devenir comparable à celle de l'adulte dès le troisième jour post-partum ; les taux plasmatiques de triiodothyronine (T3) atteignent, provisoirement à la fin du 1er jour, des valeurs observées dans l'hyperthyroïdie (*Revue in* CZERNICHOW 1982).

I.3.3. Fonction pancréatique endocrine.

Après la naissance, on observe une chute de la glycémie liée à la rupture du cordon ombilical et à l'interruption des apports transplacentaires de glucose en provenance du compartiment maternel. L'insulinémie baisse progressivement tandis que la glucagonémie s'élève (*revue in BERTRAND et coll. 1982*). L'évolution inverse des taux plasmatiques d'insuline et de glucagon constitue, dans cette période postnatale précoce un moyen très efficace de lutte contre l'hypoglycémie en permettant, d'une part l'utilisation des réserves énergétiques de glucose stockées sous forme de glycogène (hépatique et musculaire) et, d'autre part de générer du glucose par la voie de la néoglucogénèse à partir de substrats glucoformateurs (lactase, acides aminés...)

I.4. But de l'étude préliminaire.

Comme on l'a précédemment signalé, l'axe corticotrope et l'axe gonadotrope sont mis en place avant la naissance et activés chez les nouveau-nés, des deux sexes (axe corticotrope) et chez le nouveau-né mâle (axe gonadotrope).

Plusieurs systèmes neuroniques : sérotoninergique (5HT), catécholaminergique (NA ou DA), et NPYergique (NPY) innervent dans la période périnatale l'hypothalamus qui commence à contrôler, comme chez l'adulte, les fonctions corticotrope et gonadotrope de l'hypophyse foetale et néonatale.

Dans la mesure où très peu de données de la littérature sont relatives à l'évolution des métabolismes hypothalamiques de ces neurotransmetteurs chez le fœtus et/ou chez le nouveau-né et, où beaucoup d'inconnues subsistent quant au rôle possible de ces différents systèmes dans le contrôle de l'activité des axes gonadotrope et corticotrope foetaux et néonataux ; nous avons choisi dans un premier temps, d'étudier l'évolution du métabolisme hypothalamique de ces neurotransmetteurs chez le rat au cours de la période postnatale précoce.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Animaux, traitements et prélèvements.

II.1.1. Les animaux.

Les expériences sont réalisées sur des rats de souche WISTAR (Iffa Credo-l'arbresle), élevés au laboratoire et soumis à un rythme nycthéral comportant en alternance 12 heures d'éclairage (7h - 19h)/ 12 heures d'obscurité (19h - 7h), dans une pièce dont la température est maintenue à $22 \pm 2^\circ$ C. Ils ont libre accès à la nourriture et à l'eau.

La reproduction est assurée en plaçant le soir vers 17 heures un mâle dans une cage contenant 5 ou 6 femelles ; le lendemain matin, vers 9 heures, la réalisation d'un frottis vaginal permet de rechercher la présence de spermatozoïdes témoins d'un accouplement suivi d'éjaculation et donc d'une possible fécondation. Par convention, le jour du frottis est le jour 0 de la gestation. Les femelles fécondées sont placées dans des cages individuelles et élevées dans les conditions standard définies ci-dessus. La

gestation dure 21 jours et la parturition a généralement lieu dans la nuit du 21^{ème} au 22^{ème} jour.

II.1.2. Prélèvement des foetus à terme.

Le matin du 21^{ème} jour de gestation, les rates sont sacrifiées par décapitation à l'aide d'une guillotine ; les foetus à terme sont délivrés rapidement par césarienne puis placés sur un support thermostaté (température de l'ordre de 25°C) dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau, pendant une durée comprise entre 0 et 120 minutes. Dans ces conditions, il a été démontré antérieurement (LALAU *et coll.*, 1990a) l'apparition d'une "crise testiculaire néonatale" analogue, dans son intensité et sa durée, à celle développée spontanément par les nouveau-nés délivrés naturellement par voie vaginale. Les nouveau-nés sont sacrifiés 0, 30, 60, 90 ou 120 minutes après leur naissance. Leur sexe est déterminé par examen de la région ano-génitale.

II.1.3. Collecte et stockage des échantillons biologiques.

Sur chaque nouveau-né le sang est collecté après incision de la région du cou. Le cerveau est retiré de la boîte crânienne et l'hypothalamus disséqué, soigneusement pesé puis traité de manière appropriée selon le type de dosage à effectuer.

II.1.3.1. Sang.

Le sang des nouveau-nés est collecté dans des tubes coniques en polypropylène contenant 5 µl d'une solution d'EDTA à 5% puis centrifugé (13000 t/min. pendant 5 min. à 4°C) ; le plasma est réparti en fractions aliquotes puis rapidement congelé à -20°C pour le dosage des hormones circulantes (ACTH, corticostérone, testostérone, oestradiol). A chaque fraction de plasma destinée au dosage de l'ACTH, on a ajouté avant congélation 5µl d'une solution d'aprotinine 0,05 mM (inhibiteur de protéases). Le volume maximum de plasma collecté pour chaque individu étant de l'ordre de 100µl, toutes les hormones n'ont pu être dosées sur un même échantillon.

II.1.3.2. Hypothalamus.

L'hypothalamus néonatal est désagrégé par sonication :

- soit dans 200µl d'acide acétique 0,5N. Une fraction de 150µl destinée au dosage radioimmunologique du NPY est placée à 70°C pendant 10 min. pour inactiver les enzymes protéolytiques ; le reste (50µl) est réservé au dosage par HPLC de neuromédiateurs [Dopamine (DA), Noradrénaline (NA), Sérotonine (5HT)] et de leurs métabolites [acide 3-4 dihydroxyphénylacétique (DOPAC), acide homovanillique (HVA), 3 méthoxy-4 hydroxyphényléthylène glycol (MHPG) et acide 5 hydroxyindole acétique (5HIAA)] (cf. figure 9).

- soit dans 250µl de tampon acétate de sodium 0,12M à pH 5 pour le dosage de MHPG qui doit être libéré de sa forme sulfoconjugué par hydrolyse. Une fraction de 200µl est réservée au dosage par HPLC de la NA et du MHPG : le reste (50µL) est destiné au dosage des autres neuromédiateurs et de leurs métabolites. Toutes ces fractions sont centrifugées (14000 t/min. pendant 20 min.) ; le surnageant congelé à -20°C.

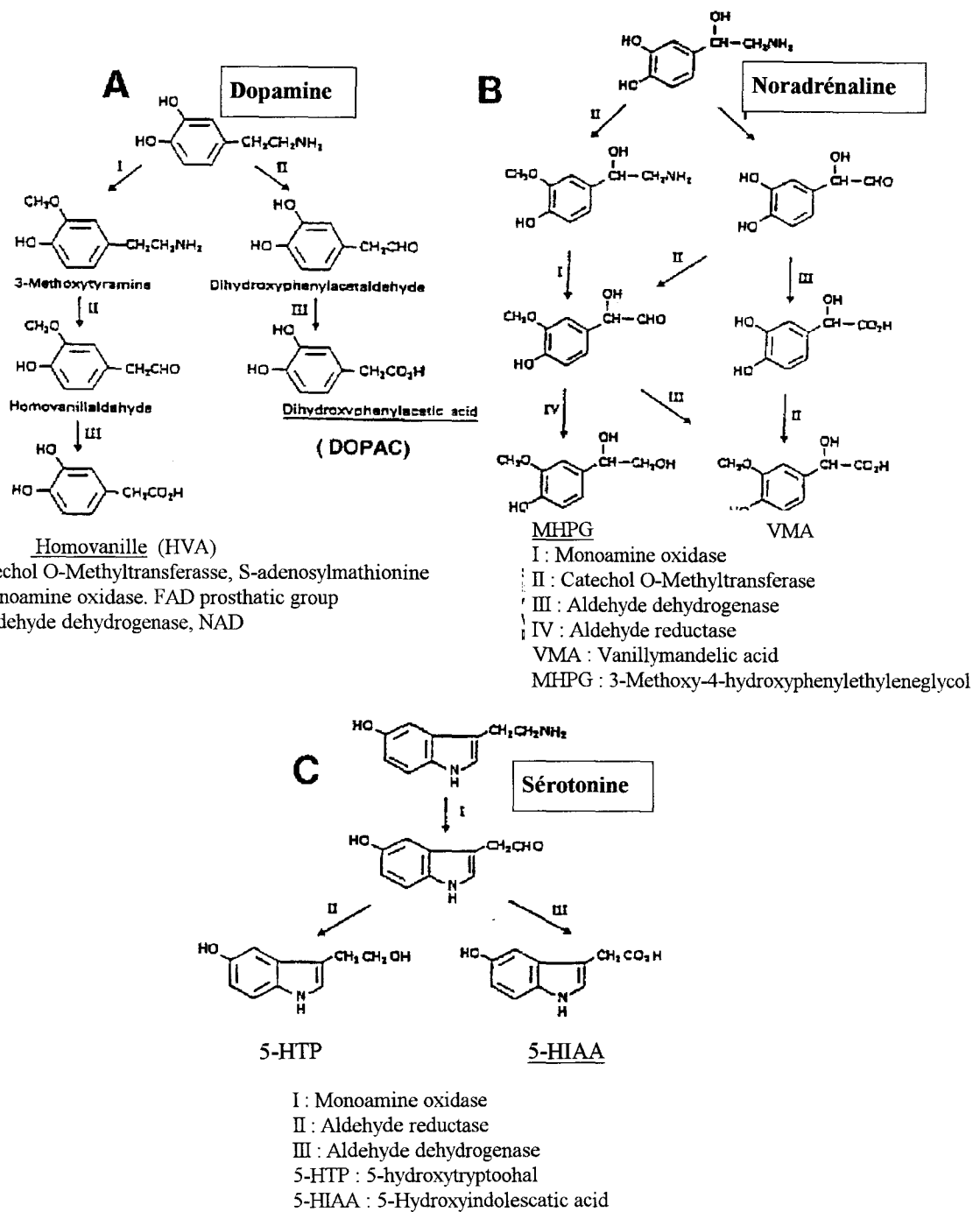


Figure 9 : Voies cataboliques de la Dopamine (A), de la Noradrénaline (B) et de la Sérotonine (C).

II.2. Dosages radioimmunologiques des hormones.

II.2.1. Dosage des hormones circulantes.

II.2.1.1. Extraction des hormones stéroïdes du plasma.

Les hormones stéroïdes ont été dosées après avoir été extraites du plasma. Les échantillons de plasma sont d'abord délipidés par l'isooctane. A cet effet, un volume de plasma compris entre 20 et 100 μ l (selon les hormones à doser) est complété à 200 μ l avec de l'eau distillée puis mélangé à 500 μ l d'isooctane. Après agitation au vortex et centrifugation (3000 t/min. pendant 5 min.), un séjour de quelques min. à -20°C permet de séparer facilement les deux phases : l'inférieure (aqueuse) étant congelée, la supérieure (organique) est éliminée par aspiration. Les hormones stéroïdes sont alors extraites de la phase aqueuse décongelée par 2ml d'acétate d'éthyle. Après quelques secondes d'agitation au vortex, centrifugation (10 min. à 3000 t/min.) puis congélation, le surnageant (phase organique) est récupéré et évaporé complètement sous courant d'air à 37°C. Le résidu sec est remis en suspension dans 150 μ l de tampon utilisé pour le dosage radioimmunologique. Toutes ces opérations (délipidation et extraction) sont réalisées dans des tubes de verre à usage unique. Les rendements d'extraction déterminés à l'aide des hormones radioactives sont les suivants : testostérone (66%), oestradiol (73%) et corticostérone > (95%).

Tous les dosages radioimmunologiques ont été réalisés dans des tubes de polypropylène de 5ml à usage unique.

II.2.1.2. Testostérone.

a) Réactifs de dosage.

Le tampon utilisé, pour la remise en suspension du résidu sec d'extraction et le dosage radioimmunologique, est du tampon phosphates 0,02M, pH 7,4 additionné de 0,5% de sérum albumine bovine (BSA). Le standard de référence est la testostérone (Sigma) et le traceur, la [1,2,6,7]³H testostérone (Amersham) dont la radioactivité spécifique (RAS) est de 90 Ci/mmol. Le traceur est stocké à -20°C dans de l'éthanol absolu. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin, anti-testostérone conjuguée à la BSA (UCB-Bioproducts); il a été couramment utilisé à la dilution finale de 1/20000^{ème}. Le volume final d'incubation, de 300 μ l, comprend 100 μ l de la solution standard de testostérone (gamme de 0,0078 ng à 0,5 ng/tube) ou 100 μ l d'extrait plasmatique, 100 μ l d'une solution de testostérone ³H et 100 μ l d'immunsérum.

b) Séparation.

Après 90 min. d'incubation à 4°C, les complexes testostérone/anticorps sont séparés de la testostérone libre par addition à tous les tubes de 1ml de milieu de séparation [tampon de dosage contenant en gramme / 100ml : 0,0025% de dextran T70 (Sigma) et 0,25% de charbon activé (Norit charcoal, Sigma) homogénéisé à 4°C]. Après agitation au vortex, décantation 30 min. à 4°C, les tubes sont centrifugés 15 min. à 5000 t/min.. On prélève ensuite 500 μ l de surnageant contenant les complexes antigène/anticorps que l'on introduit dans les tubes de comptage avec 4 ml de liquide

scintillant (Optiphase "Hisafe" de Wallac England) ; la radioactivité est mesurée au compteur β (LKB).

c) Caractéristiques du dosage.

Le pourcentage de liaison de la testostérone ^3H en absence de compétition avec la testostérone froide est de 80% (n = 14). La spécificité du dosage a été testée en déterminant le pourcentage de réaction croisée ; il est de 100% avec la testostérone, de 50% avec la dihydrotestostérone, de 1,19% avec la déhydroisoandrosterone, de 0,16% avec la corticostérone, de 0,10% avec la déoxycorticostérone ; de 0,042% avec la progestérone, de 0,0125% avec le 5 pregnan 3 β -ol 20-one et la 17 α -hydroxyprogestérone ; de 0,00025% avec le β -oestradiol et de 0,00002% avec l'hydrocortisone. Une inhibition de 50% de la liaison du traceur à l'anticorps est généralement obtenue en présence de 0,025 ng de testostérone "froide" ; la variabilité intra-dosage est de 4,55% (n = 12) et inter-dosage de 8,46% (n = 8). Le contenu en testostérone de l'échantillon est déterminé par référence à la courbe standard puis corrigé d'après le rendement d'extraction.

II.2.1.3. Oestradiol.

a) Réactifs du dosage.

Le tampon utilisé pour la remise en suspension du résidu sec d'extraction et le dosage radioimmunologique est identique à celui utilisé pour le dosage de la testostérone. Le standard de référence est l'oestradiol (Sigma) et le traceur, le $[2,4,6,7]^3\text{H}$ oestradiol (Amersham) dont la RAS est de 83 Ci / mmol.. Le traceur est stocké à -20°C dans de l'éthanol absolu. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin, anti-oestradiol conjugué à la BSA (UCB-Bioproducts) ; il a été couramment utilisé à la dilution finale de 1/10500ème. Le volume final d'incubation, de 300 μl comprend 100 μl de la solution standard d'oestradiol (gamme de 0,0039 ng à 0,250 ng / tube) ou 100 μl d'extrait plasmatique, 100 μl d'une solution d'oestradiol ^3H et 100 μl d'immunsérum.

b) Séparation.

La durée d'incubation est de 90 min. à 4°C . La séparation des complexes oestradiol/anticorps et de l'oestradiol libre s'effectue selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le dosage de la testostérone.

c) Caractéristiques du dosage.

Le pourcentage de liaison de l'oestradiol ^3H en absence de compétition avec l'oestradiol froide est de 34% (n=7). La spécificité du dosage a été testée en déterminant le pourcentage de réaction croisée ; il est de 100% avec l'oestradiol, de 0,073% avec la déhydroisoandrosterone, de 0,027% avec la testostérone, de 0,012% avec la corticostérone, de 0,011% avec le 5 pregnan 3- β ol 20-one, 0,0013% avec la progestérone, 0,011% avec la deoxycorticostérone, 0,0006% avec la 17 α -hydroxyprogestérone et 0,00012% avec l'hydrocortisone.

Une inhibition de 50% de la liaison du traceur à l'anticorps est généralement obtenue en présence de 0,016 ng d'oestradiol "froid" ; la variabilité intra-dosage est de

2,82% (n=5) et inter-dosage de 10,7% (n=4). Le contenu en oestradiol de l'échantillon est déterminé par référence à la courbe standard puis corrigé d'après le rendement d'extraction.

II.2.1.4. Corticostérone.

a) Réactifs du dosage.

Le tampon utilisé pour la remise en suspension du résidu sec et le dosage est du tampon phosphates 0,05M, pH 7,4 additionné de 0,2% d'azide de sodium et de 0,1% de gélatine. Le standard de référence est la corticostérone (Sigma) et le traceur de la [1,2,6,7]³H corticostérone (Amersham) dont la RAS est de 85 Ci/mmol. Le traceur est stocké à -20°C dans de l'éthanol absolu. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin, anti-corticostérone conjuguée à la BSA (UCB-Bioproducts) utilisé à la dilution finale de 1/20000^{ème}. Le volume final d'incubation de 700µl comprend : 400µl de tampon, 100µl de la solution standard de corticostérone (gamme de 15 pg à 4000 pg / tube) ou 100µl d'extrait plasmatique, 100µl de corticostérone ³H et 100µl d'immunsérum.

b) Séparation.

Après deux incubations successives (30 min. à 37°C ; 16 heures à 4°C), les complexes corticostérone/anticorps sont séparés de la corticostérone libre selon le principe de séparation décrit pour le dosage de la testostérone, à la différence près que, le volume du tampon (composition détaillée ci-dessus) ajouté à chaque échantillon est de 500µl.

c) Caractéristiques du dosage.

Le pourcentage de liaison de la corticostérone ³H en absence de compétition avec la corticostérone froide est de 50% (n = 20). La spécificité du dosage a été testée en déterminant le pourcentage de réactions croisées ; il est de 100% avec la corticostérone ; de 5% avec la 11 déoxycorticostérone ; de 0,18% avec la 21 déoxycorticostérone ; de 0,16% avec la 21 déoxycortisol ; de 0,005% avec le 11 déoxycortisol et le cortisol ; de 0,002% avec la progestérone et inférieur à 0,001% avec la 17 hydroxyprogestérone, le pregnénolone et la 17 α hydroxypregnenolone. La variabilité intra-dosage est de 2,37% (n = 12) et inter-dosage de 4,41% (n = 5). Une inhibition de 50% de la liaison du traceur à l'anticorps est généralement obtenue en présence de 250 pg de corticostérone "froide". Le contenu en corticostérone de l'échantillon est déterminé par référence à la courbe standard puis corrigé d'après le rendement d'extraction.

II.2.1.5. Dosage de l'ACTH.

Le dosage de l'ACTH plasmatique a été réalisé sur les échantillons de plasma non-extraits, avec un kit de dosage radioimmunologique du commerce (ACTH K-PR, Cis BioInternational, France).

La sensibilité du dosage est de 10 pg/ml et les variations intra et inter-dosage sont respectivement de 4,3% (n=6) et 11,7% (n=9).

II.2.2. Dosage du neuropeptide Y hypothalamique.

Le jour du dosage, les broyats tissulaires acides sont dilués de moitié avec du tampon contenant 1% de rouge phénol puis neutralisés par NaOH 1N. Le tampon de dosage est du tampon phosphates 0,05M, pH 7,4 additionné de BSA (0.3%) et d'EDTA (10mM). Le standard de référence est du NPY₁₋₃₆ de rat (Neosystem) et le traceur du NPY porcin marqué à l'iode 125 (IM 170-Amersham) dont la RAS est de 2000 Ci/mmol. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin dirigé contre le NPY de rat/homme. (Peninsula), à la dilution finale de 1/12000^{ème}. Le volume total d'incubation de 600 µl est constitué de tampon (300 µl), de la solution standard de NPY (gamme de 30 à 8500 pg/tube) ou de l'échantillon (100 µl), de la solution de NPY¹²⁵I (100 µl) et d'immunsérum (100 µl). La durée d'incubation est de 48 heures à 4°C.

La séparation des complexes NPY / anticorps et du NPY libre, est réalisée par apport dans chaque tube de 250 µl de tampon phosphates 0,05 M, pH 7,4 contenant du charbon activé / Dextran (1,6g/100ml, Norit Charcoal ; 0,16 g/100ml, Dextran T), de la gélatine (0,2%) et de l'EDTA (10 mM). Après homogénéisation au Vortex puis centrifugation 10 min. à 3500 t/min. à 4°C, la radioactivité du surnageant est mesurée au compteur gamma LKB.

Le pourcentage de liaison du ligand radioactif en absence de compétition avec du NPY froid est de 50% (n=9). Le pourcentage de réaction croisée est de 100% avec le NPY de rat / homme ou de NPY porcin, de 0,040% avec la β endorphine, de 0,022% avec le PHI (Peptide Histidine Isoleucine) de rat et de 0,008% avec la substance P. Par contre, le C-PON (humain), le VIP, le peptide YY (porc), le polypeptide pancréatique (rat), la Met-enképhaline, la somatostatine, l'ACTH₁₋₃₉ et l'ACTH₁₋₂₄, l'AVP, l'ocytocine et l'angiotensine II, n'entrent pas significativement en compétition avec le NPY marqué pour la fixation à l'anticorps. Une inhibition de 50% de la liaison du traceur à l'anticorps est généralement obtenue en présence de 500 pg de NPY "froid". La variabilité intra-dosage est de 3,1% (n=12) et inter-dosage de 12% (n=17).

II.3. Dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC) de neurotransmetteurs et de leurs métabolites (Cf Fig. 9).

II.3.1. Principe et matériel de mesure.

La séparation des neurotransmetteurs et de leurs métabolites se fait par chromatographie de partage en phase inverse. La phase fixe, non polaire, est constituée de grains de silice (5 µm de diamètre) sur lesquels sont greffées des chaînes hydrocarbonées à 18 atomes de carbone (C18). La phase mobile est constituée d'un tampon contenant du sulfate d'octyle dont l'extrémité hydrophobe permet sa fixation sur les chaînes en C18 du support de silice, tandis que l'autre extrémité SO₄⁻ retient les différentes monoamines par leur fonction amine ionisée. Ce principe est celui d'une chromatographie d'échange d'ions. Dans la cellule du détecteur électrochimique, les produits sont oxydés à un certain potentiel ; les électrons captés par l'électrode de mesure génèrent un courant d'intensité proportionnelle à leur concentration donc au nombre de molécules oxydées.

Le matériel est constitué d'une pompe P4000 (Spectra Physics Analytical) avec dégazeur automatique, d'une colonne Altex Ultrasphère ODS 250 x 4,6 mm, d'un détecteur ampérométrique LC-4C BAS dont la cellule est équipée d'une électrode de travail en carbone vitreux et d'un intégrateur Chromjet Spectra Physics.

II.3.2. Dosage des neuromédiateurs et de leurs métabolites.

Dans l'hypothalamus ont été dosés les catécholamines (DA,NA), la 5 HT, ainsi que leurs principaux métabolites (DOPAC, HVA, MHPG et 5HIAA).

Dans la mesure où le MHPG est surtout sous forme de sulfo-conjugué, ce dernier doit être au préalable hydrolysé pour libérer le MHPG. A cette fin, 200 µl de surnageant d'extraits hypothalamiques (cf. II 1.3.2) sont soumis à une hydrolyse enzymatique par apport de 50 µl d'une solution de sulfatase d'Hélix Pomatia (110 mg/10 ml) pendant 3 heures à 37°C. Cette hydrolyse est stoppée par addition, après refroidissement, de 20 µl d'acide citrique 0,416 M et de 30 µl de méthanol pur. Les échantillons sont alors centrifugés (20 min. à 14000 t/min.) et filtrés (filtres Millipore avec des pores d'un diamètre de 0,22 µm) ; 20 µl sont ensuite injectés dans l'appareil HPLC. La phase mobile décrite par KIM *et coll.* (1987) traverse la colonne avec un débit de 1,2 ml/min ; le potentiel imposé est de + 800 mV.

II.4. Statistiques.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes accompagnées de leur erreur standard (ESM). Les moyennes sont comparées à l'aide du test « t » de Student, quand deux groupes uniquement sont comparés par exemple (mâles versus femelles). Pour les comparaisons faisant intervenir deux facteurs (sexe x temps), une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée suivie du test de Dunnett. Les différences sont statistiquement significatives si $P < 0,05$.

III. RESULTATS

III.1. Animaux étudiés.

L'étude a été réalisée sur 13 portées de mères "indemnes" non traitées (136 nouveau-nés dont 78 mâles et 58 femelles).

III.2. Evolutions des métabolismes hypothalamiques d'amines biogènes et du NPY.

III.2.1. La Sérotonine (5HT) et le 5HIAA.

Chez les mâles, le contenu hypothalamique en 5HT reste stable au cours des deux heures suivant la naissance (Fig. 10A). Chez les femelles il est augmenté au cours de la deuxième heure, période durant laquelle le contenu hypothalamique en 5 HT est significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles (Fig. 10A).

Le contenu hypothalamique en 5HIAA (métabolite de la 5 HT) augmente significativement aussi bien chez les mâles que chez les femelles au cours des deux

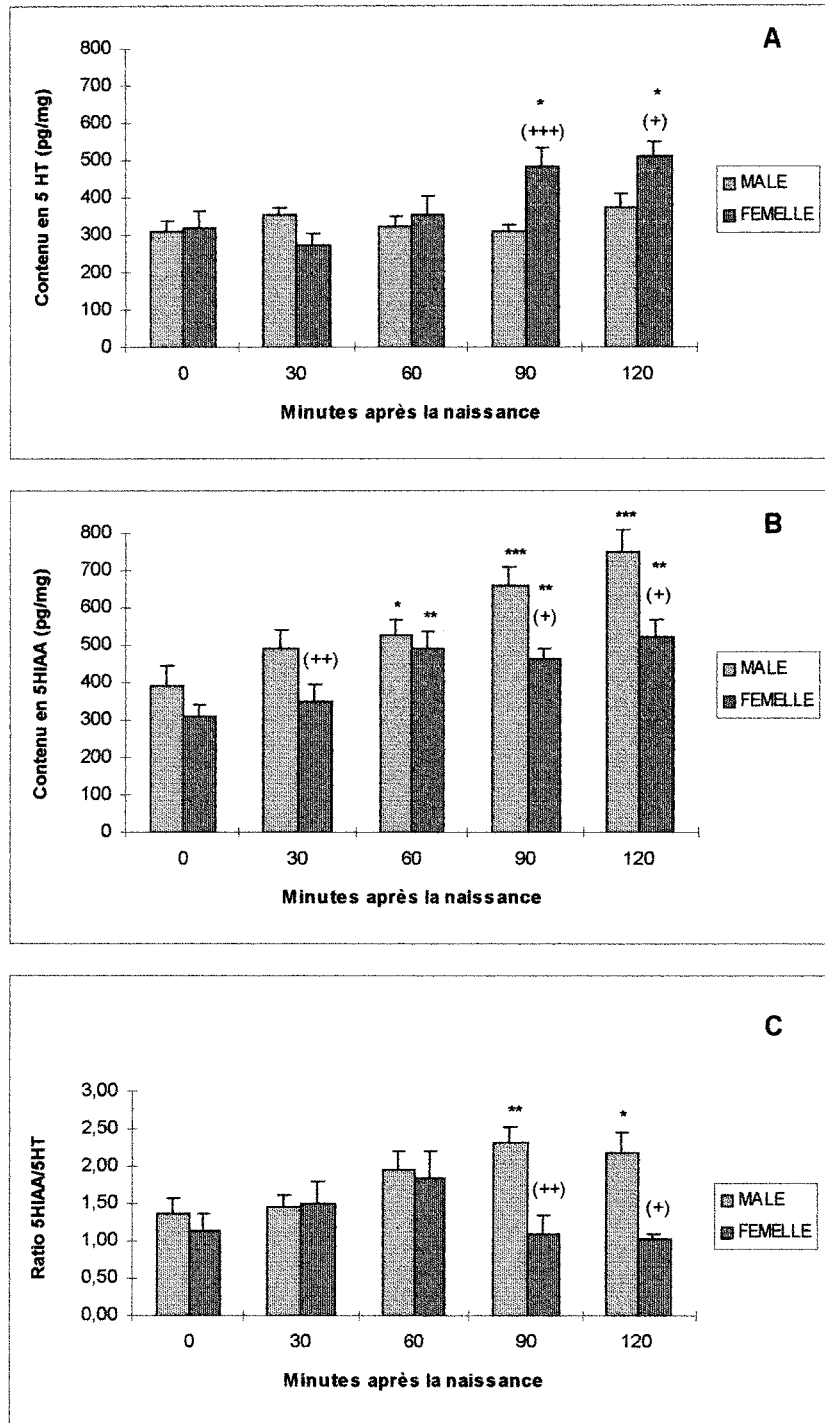


Figure 10 : Evolution postnatale du contenu hypothalamique en 5HT (A) et en 5 HIAA (B), ainsi que du métabolisme hypothalamique de la sérotonine (ratio 5 HIAA/5HT ; C) chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=5-18). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001
- femelles versus mâles (+) P<0,05 (++) P<0,01 (+++) P<0,001

heures de vie extra-utérine (Fig. 10B). Il est plus élevé chez les mâles que chez les femelles 30, 90 et 120 minutes après la délivrance.

Le métabolisme de la sérotonine exprimé par le ratio 5HIAA/5HT augmente seulement chez les nouveau-nés mâles au cours de la deuxième heure suivant la naissance, durant cette période il est significativement plus élevé chez ce dernier que chez les femelles (Fig. 10C).

III.2.2. La noradrénaline (NA) et le MHPG.

Le contenu de l'hypothalamus en NA ne varie pas chez les nouveau-nés mâles et femelles au cours des deux heures suivant la délivrance (Fig. 11A). Cependant, il est significativement plus élevé chez les mâles, excepté 90 minutes après la naissance, que chez les femelles.

Le contenu hypothalamique en MHPG augmente au cours de la deuxième heure chez les nouveau-nés des deux sexes (Fig. 11B) mais, aucune différence liée au sexe n'est observée.

Le métabolisme de la noradrénaline exprimé par le ratio MHPG/NA est augmenté aussi bien chez les mâles que chez les femelles 60 et 90 minutes après la délivrance (fig. 11C) ; il est significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles à ces stades.

III.2.3. La dopamine (DA), le DOPAC et le HVA.

Chez les nouveau-nés des deux sexes le contenu hypothalamique en DA reste stable au cours des deux premières heures de vie extra-utérine et n'est pas significativement différent entre mâle et femelle (Fig. 12A).

Le contenu en DOPAC reste stable chez les mâles alors qu'il augmente chez les femelles 60 et 120 minutes après la délivrance (Fig. 12B). Il est significativement plus élevé chez les mâles que chez les femelles uniquement 30 minutes après la naissance et au contraire plus faible 120 minutes après (Fig. 12B).

Le contenu hypothalamique en HVA, reste stable chez les femelles alors qu'il augmente chez les mâles 90 minutes après la délivrance (Fig. 12C). A ce stade il est significativement plus élevé chez les mâles que chez les femelles.

Le métabolisme hypothalamique de la DA exprimé par le ratio DOPAC/DA est stable chez les mâles et augmente chez les femelles 60 minutes après la naissance (Fig. 13A). Pour le ratio HVA/DA, il est stable chez les femelles et augmente chez les mâles à 90 minutes (Fig. 13B). Pour ces deux paramètres, on n'observe pas de différences liées au sexe au cours de la période étudiée.

III.2.4. Le Neuropeptide Y (NPY).

Le contenu de l'hypothalamus en NPY est significativement plus élevé chez les mâles que chez les femelles à la naissance. Il diminue chez ceux-ci au cours de la première heure de vie extra-utérine alors qu'il reste stable chez les nouveau-nés femelles (Fig. 14).

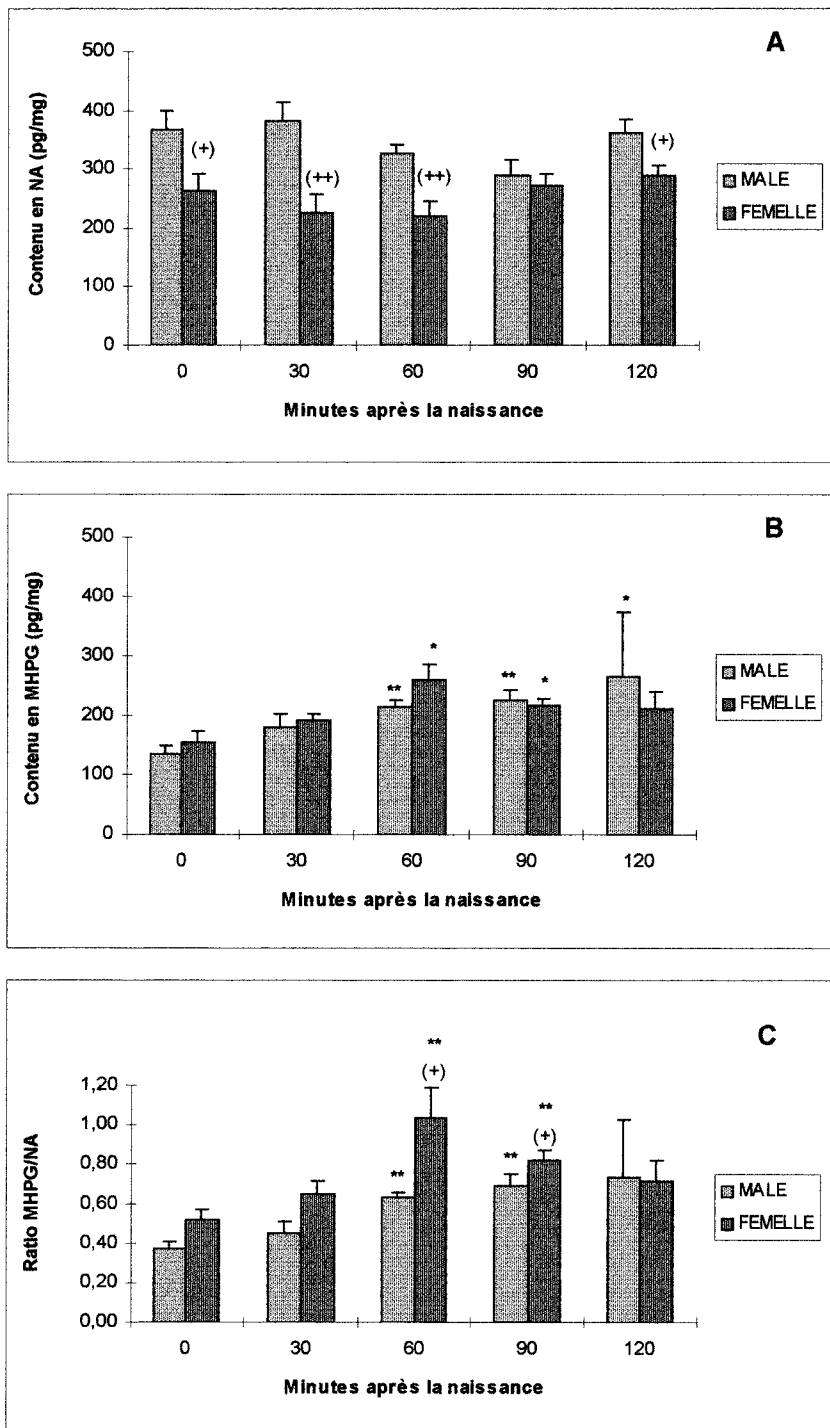


Figure 11 : Evolution postnatale du contenu hypothalamique en NA (A) et en MHPG (B), ainsi que du métabolisme hypothalamique de la noradrénaline (ratio MHPG/NA ; C) chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=4-18). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01
- femelles versus mâles (+) P<0,05 (++) P<0,01

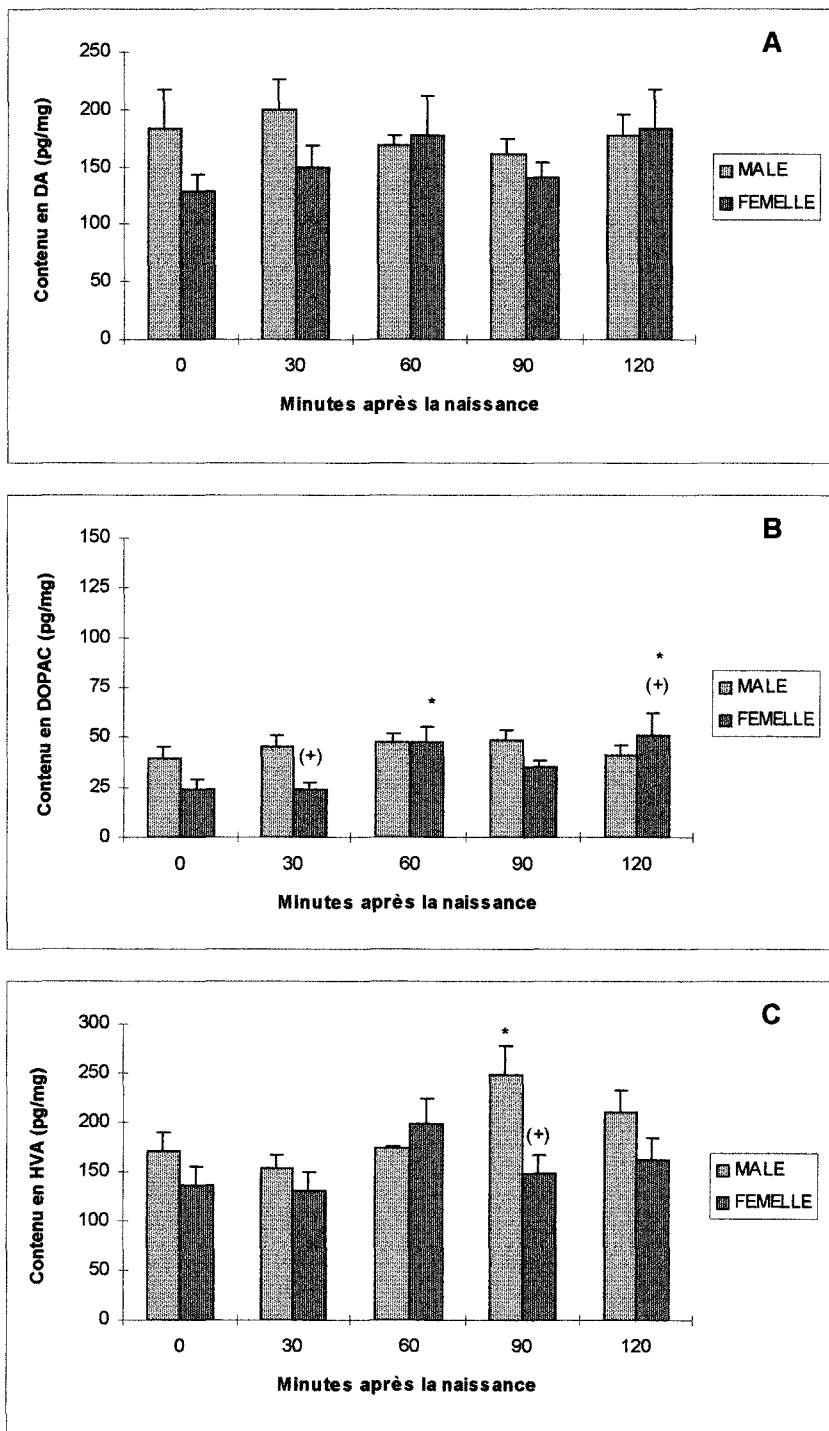


Figure 12 : Evolution postnatale du contenu hypothalamique en DA (A), en DOPAC (B), et en HVA (C) chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=5-19). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05

- femelles versus mâles (+) P<0,05

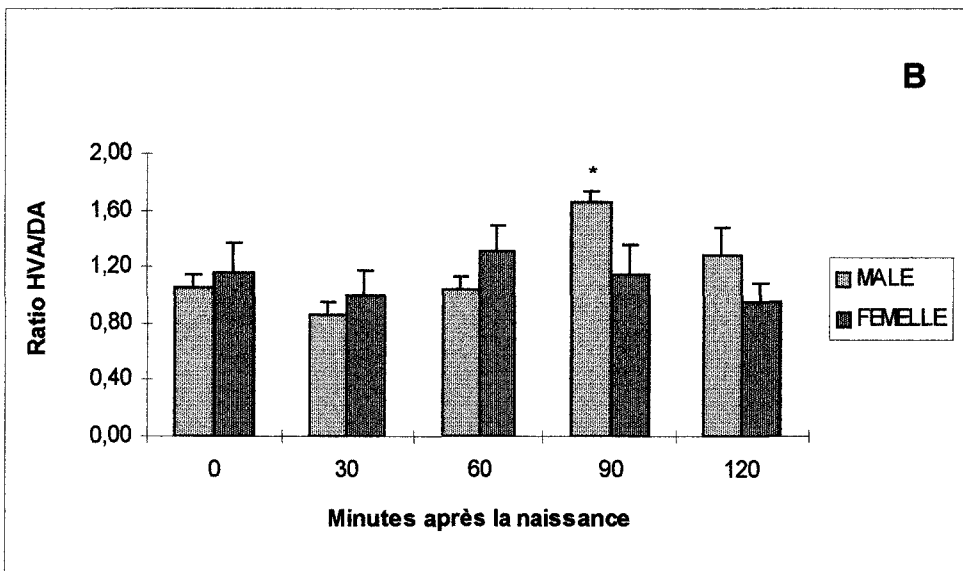
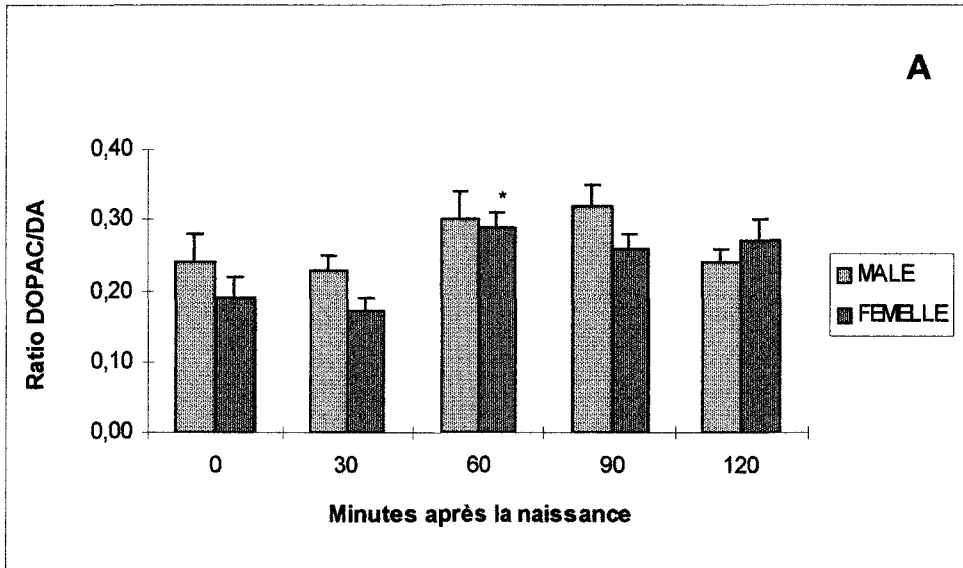


Figure 13 : Evolution du métabolisme hypothalamique de la dopamine (ratio DOPAC/DA (A) et ratio HVA/DA (B) chez des nouveau-nés de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=5-18). Analyse stastitique :
 - versus temps 0 min. * P<0,05

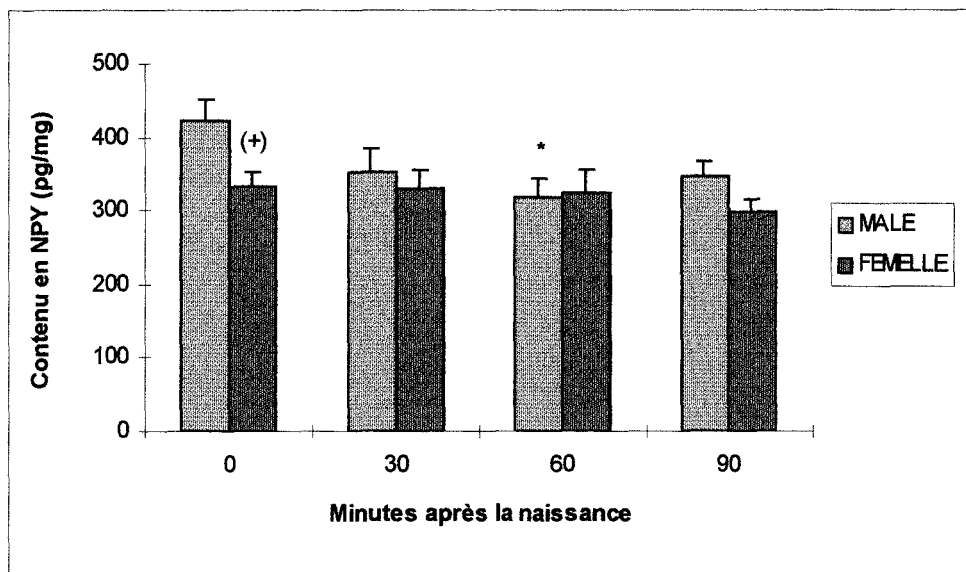


Figure 14 : Evolution postnatale du contenu hypothalamique en NPY chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=10-18). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05

- femelles versus mâles (+) P<0,05

III.3. Evolution des taux d'hormones circulantes.

III.3.1. L'ACTHémie.

Chez les nouveau-nés l'évolution postnatale précoce de la concentration plasmatique en ACTH est comparable dans les deux sexes ; elle augmente non significativement 10 minutes après la délivrance puis diminue régulièrement ensuite (Fig. 15A).

III.3.2. La corticostéronémie.

Au cours des minutes qui suivent la naissance la corticostéronémie s'élève significativement et de manière comparable dans les deux sexes (Fig. 15B). Cette élévation est significative 60 et 90 minutes chez les mâles et seulement à 90 minutes chez les femelles (Fig. 15B).

III.3.3. La testostéronémie.

La testostéronémie s'élève fortement chez les nouveau-nés mâles au cours des 60 premières minutes après la délivrance, puis tend à décroître de manière non significative au cours de la deuxième heure post-partum (Fig. 16A).

III.3.4. L'oestradiolémie.

Chez les nouveau-nés femelles, le taux plasmatique d'oestradiol s'élève très légèrement mais non significativement au cours des deux heures qui suivent la naissance (Fig. 16B).

IV DISCUSSION

IV.1. L'activation gonadique néonatale.

Chez les nouveau-nés mâles, nous avons observé l'apparition, dès la naissance d'une élévation de la testostéronémie témoignant d'une activation testiculaire, celle-ci est conforme à celle décrite antérieurement par de nombreux auteurs sous l'appellation de « crise testiculaire » néonatale (CORBIER *et coll.* 1981,1983a,b ; ROFFI *et coll.* 1986,1987 ; LALAU *et coll.* 1990a). Cette activation testiculaire sous le contrôle de la LH hypophysaire, résulte d'une stimulation de la fonction gonadotrope par la GnRH hypothalamique (CORBIER *et coll.* 1983b). La testostérone sécrétée au cours de cette crise testiculaire néonatale, est captée par l'hypothalamus et aromatisée en oestradiol ; il va en résulter une masculinisation ou déféminisation du système nerveux central qui se traduira chez l'adulte par un comportement sexuel conforme au sexe génétique et gonadique de l'individu et, une sécrétion acyclique de la LH hypophysaire (*revue in DUPOUY et coll.* 1987). Néanmoins, l'établissement de la réponse sexuellement dimorphique (plus intense et plus durable chez la femelle que chez le mâle) de la fonction corticotrope hypophysaire de l'adulte à un stress est antérieur à la naissance chez le mâle, mais peut être orienté dans le sens mâle chez des nouveau-nés femelles injectés de testostérone (*revue in DUPOUY et coll.* 1987).

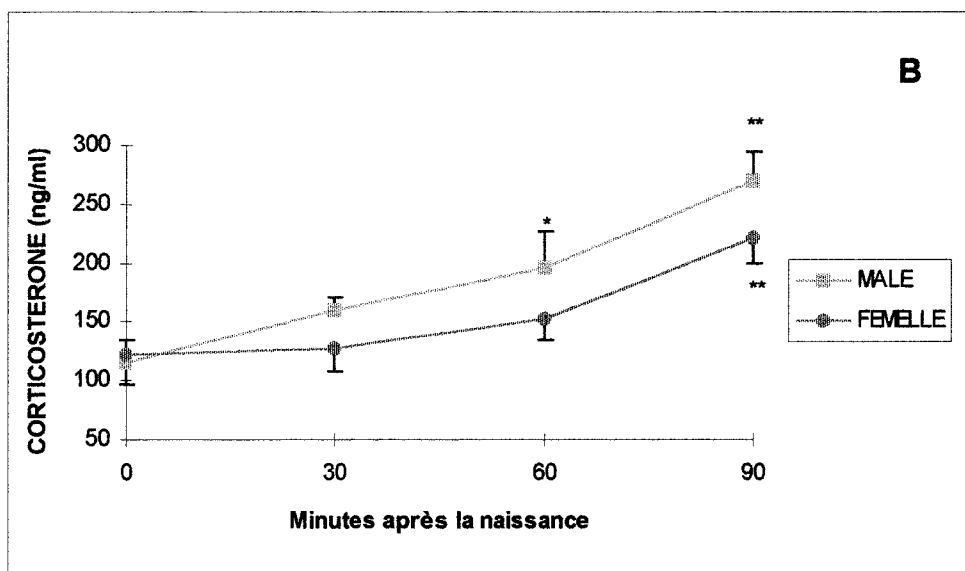
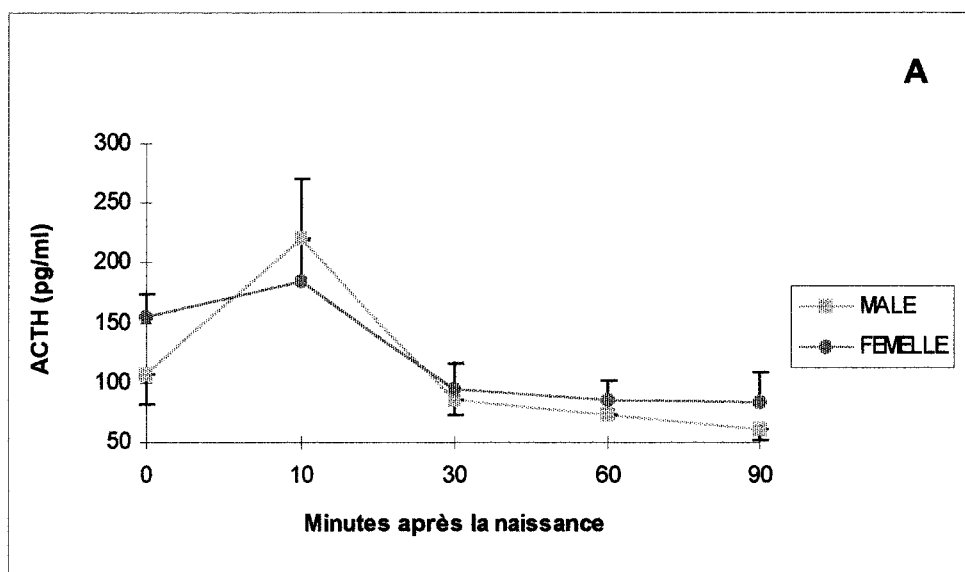


Figure 15 : Evolution postnatale de l'ACTHémie (A) et de la corticostéronémie (B) chez des nouveau-nés mâles (■) et femelles (●) de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=3-14). Analyse statistique :
 - versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01

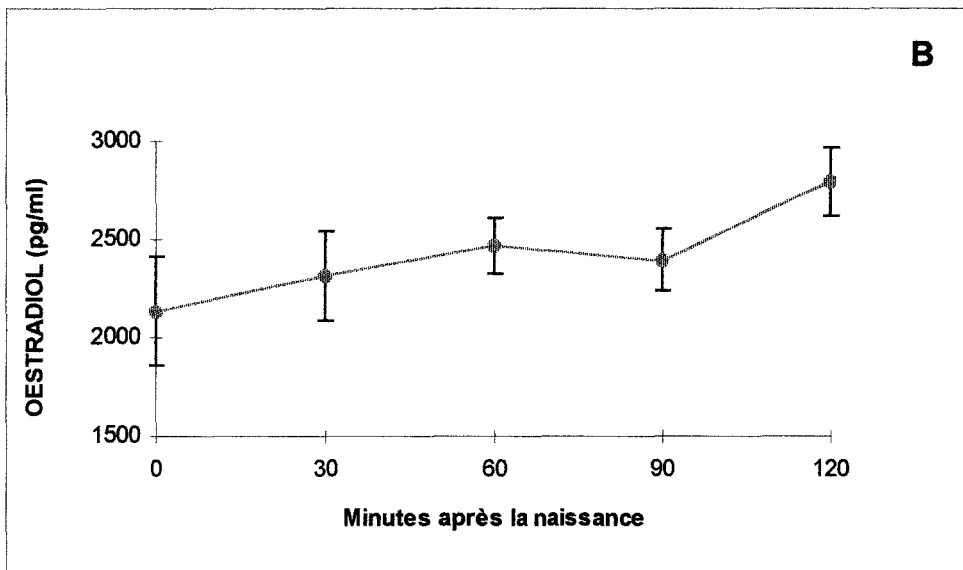
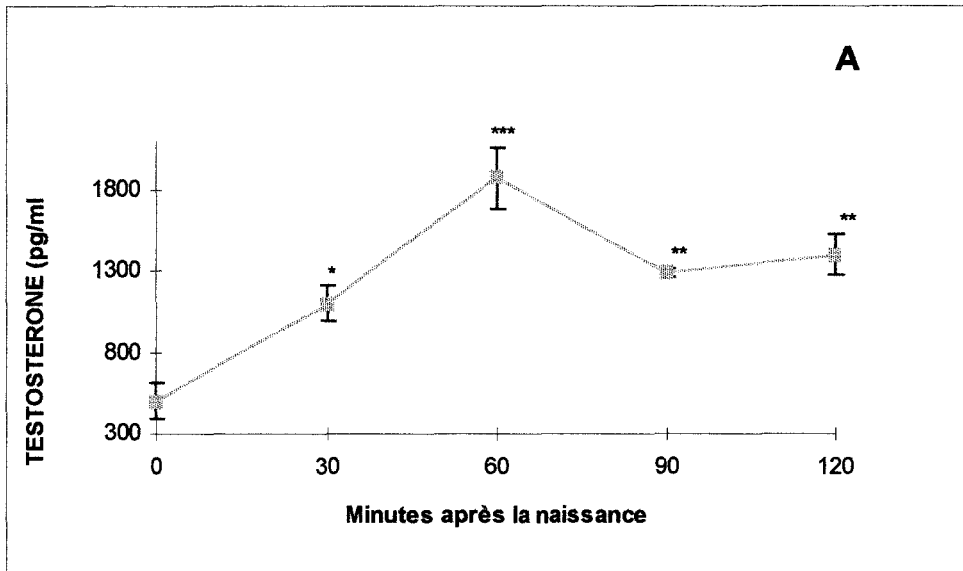


Figure 16 : Evolution postnatale de la testotéronémie (A) chez des nouveau-né mâles et de l'oestradiolémie (B) chez des nouveau-nés femelles de mères indemnes.

Moyenne \pm ESM (n=4-17). Analyse stastitique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

Chez le nouveau-né femelle, nous n'avons pas observé d'élévation de l'oestradiolémie au cours de la période postnatale précoce étudiée. Ceci est conforme aux résultats d'autres auteurs qui ont signalé l'absence d'activation de l'axe gonadotrope du nouveau-né femelle au cours des premières heures de vie extra-utérine (PANG *et coll.* 1979, SLOB *et coll.* 1980, RHODA *et coll.* 1984).

IV.2. L'activation surrénalienne néonatale.

Chez les nouveau-nés des deux sexes, l'élévation de la corticostéronémie, au cours des minutes qui suivent la délivrance, est le signe d'une forte stimulation des corticosurrénales qui pourrait être la conséquence d'une activation de la fonction corticotrope hypophysaire par entre autre le CRF hypothalamique. Cependant, nous n'avons observé qu'une modeste augmentation de l'ACTHémie 10 minutes environ après la naissance. Néanmoins, il a été montré qu'à cette période du développement, la stimulation de la sécrétion surrénalienne de corticostérone dépend principalement de l'ACTH (DUPOUY et CHATELAIN 1981, DUPOUY *et coll.* 1987, NAGAYA et WIDMAIER 1993). Cette sécrétion néonatale d'ACTH est un phénomène rapide et fugace. En raison du nombre important de manipulations, les nouveau-nés ont été délivrés puis sacrifiés à des temps légèrement décalés. On peut alors émettre l'hypothèse que notre mode opératoire qui a duré quelques minutes, ne nous a pas permis de réaliser le prélèvement sanguin chez les nouveau-nés au moment précis du pic de sécrétion d'ACTH.

Nous n'avons pas observé de différence liée au sexe pour l'évolution de l'ACTHémie ou celle de la corticostéronémie durant la période étudiée. Chez des rats de 8 jours, l'activation de l'axe corticotrope est en intensité et en durée plus marquée chez la femelle que chez le mâle en réponse à un stress par inhalation de vapeurs d'éther (HARY *et coll.* 1981). Un tel dimorphisme entre mâles et femelles n'a pas été observé dans les minutes qui suivent la délivrance bien qu'une réponse sexuellement dimorphique à l'injection d'entoxines au nouveau-né de 1 jour ait été rapportée par SHANKS *et coll.* (1994). A ce stade, cette réponse semble dépendre des stéroïdes gonadiques puisque la gonadectomie des nouveau-nés supprime, deux jours plus tard, cette différence de réponse entre mâle et femelle (SHANKS *et coll.* 1994).

Le facteur à l'origine de la stimulation de l'axe corticotrope à la naissance n'a pas encore été clairement défini bien que l'hypoglycémie néonate puisse être l'un des stimuli-majeurs (SANN 1990, ARAI et WIDMAIER 1991, NAGAYA et WIDMAIER 1993). Le rôle du CRF dans cette activation est supposé mais non démontré ; ce facteur hypothalamique est néanmoins capable de stimuler la fonction corticotrope hypophysaire du nouveau-né (BOUDOURESQUE *et coll.* 1987).

Chez le rat de 8 jours, la sécrétion basale d'ACTH et de corticostérone ainsi que la réponse de l'axe corticotrope, à de nombreux agents stressants pour l'adulte sont fortement diminuées. Cette période néonatale est appelée « période d'hypo-réponse au stress », elle s'étend du 2ème au 10ème jour après la naissance (SAPOLSKY et MEANEY 1986). Les bases physiologiques de ce phénomène ne sont pas encore clairement élucidées, elles pourraient faire intervenir à la fois une augmentation du feedback négatif exercé par les glucocorticoïdes (WALKER *et coll.* 1986) et une immaturité relative des systèmes neuroniques et/ou neuroendocriniens impliqués dans la stimulation centrale de la sécrétion d'ACTH (GRINO *et coll.* 1989a, GRINO *et coll.*

1989b). Durant cette période particulière du développement, une hypoglycémie induite par une injection d'insuline, stimule la sécrétion d'ACTH via une augmentation de la sécrétion d'AVP hypothalamique et de catécholamines (*in* GRINO et OLIVER 1992b) indépendante du CRF puisque l'immunoneutralisation passive du CRF endogène ne perturbe pas significativement cette réponse (MURET *et coll.* 1992).

En conclusion, l'activation corticotrope hypophysaire qui survient à la naissance pourrait donc faire intervenir différentes neurohormones telles que le CRF et/ou l'AVP mais également d'autres facteurs tels que les catécholamines.

IV.3. Evolution du métabolisme hypothalamique des catécholamines.

Nos résultats montrent que durant la période postnatale précoce, le métabolisme hypothalamique de la dopamine reste stable, alors que celui de la noradrénaline s'élève au cours du temps chez les nouveau-nés des deux sexes. Cependant, la médullosurrénale sécrète des catécholamines dans le sang ; celles-ci peuvent, chez le nouveau-né, atteindre le système nerveux central dans la mesure où la barrière hémato-encéphalique n'est pas complètement établie avant le 10^{ème} jour postnatal chez le rat, elle n'atteindra l'épaisseur de celle de l'adulte qu'à 2 ou 3 semaines post-partum (JOHANSSON 1990). Par ailleurs, chez le jeune rat, les catécholamines médullosurrénaliennes sont sécrétées après une hypoglycémie induite par l'insuline (McCARTY *et coll.* 1989). Les dosages de catécholamines hypothalamiques que nous avons réalisés peuvent donc prendre en compte, en partie tout au moins, des amines d'origine périphérique. Cependant, une telle hypothèse est peu vraisemblable pour deux raisons majeures :

- 1) la surrénale libère principalement de l'adrénaline mais sécrète, en bien plus faible quantité de la noradrénaline et de la dopamine,
- 2) il existe un dimorphisme sexuel en ce qui concerne le métabolisme de la NA, qui paraît plus intense chez les femelles que chez les mâles.

Un tel dimorphisme qui a également été signalé chez l'adulte, s'établit à la suite de la masculinisation périnatale du SNC par la testostérone (SIDDIQUI et GILMORE 1988). Si la présence d'androgènes durant la période périnatale influence le développement du système noradrénergique dans l'hypothalamus, il ne semble pas en être de même pour d'autres structures comme le cortex, le cerveau médian ou le cervelet (SIDDIQUI et GILMORE 1988). L'élévation des taux plasmatiques d'androgènes chez le mâle durant cette période accélère la diminution du contenu du cerveau en monoamines (SIDDIQUI et GILMORE 1988). Nos résultats sont compatibles avec les observations de BORISOVA *et coll.* (1991) selon lesquelles, à ce stade du développement (E21), le système catécholaminergique hypothalamique, bien que non-mature, possède la même organisation que celle de l'adulte.

En conclusion, on peut raisonnablement affirmer que les variations des métabolismes hypothalamiques des catécholamines étudiées sont principalement celles des amines issues des terminaisons neuronales hypothalamiques. En ce qui concerne le dimorphisme sexuel du métabolisme hypothalamique de la NA, puisque celui-ci est présent dès la naissance, c'est vraisemblablement la sécrétion d'androgènes en fin de gestation au voisinage de E19 chez le mâle qui pourrait être responsable de son établissement.

Les variations des métabolismes hypothalamiques de la DA et de la NA pourraient être mises en relation avec l'activation des axes gonadotrope chez le mâle et corticotrope chez les nouveau-nés des deux sexes. Il est en effet bien établi que ces amines participent au contrôle multifactoriel central des fonctions gonadotrope et corticotrope hypophysaire non seulement chez le rat adulte (*revue in* BARRACLOUGH 1992, WHITNALL 1993), mais aussi chez le jeune rat (BOUDOURESQUE 1987, *revue in* BECU-VILLALOBOS et LIBERTUN 1995).

En ce qui concerne la DA, nous n'avons pas trouvé de données de la littérature concernant son action éventuelle sur l'axe corticotrope du fœtus ou du nouveau-né. L'absence de modification de son métabolisme hypothalamique chez les nouveau-nés des deux sexes et, en particulier chez le nouveau-né femelle, nous amène à conclure que chez le nouveau-né comme chez l'adulte, la DA joue un faible rôle pour le contrôle de l'activité de cet axe. En effet, chez l'adulte la DA exerce sur la sécrétion de CRH une action stimulante modeste, via des récepteurs de type D₁ (*in* CALOGERO 1995). Au niveau de l'axe gonadotrope, chez les mâles, l'absence d'élévation du métabolisme de la DA alors que l'activité de cet axe est fortement stimulée, nous conduit logiquement aux mêmes conclusions, à savoir, une non-participation de la DA au contrôle de cet axe. Chez la femelle, au cours des 2 premières semaines de vie extra-utérine, la DA et les peptides opioïdes exercent au contraire une action inhibitrice certaine sur les sécrétions de GnRH, LH et FSH (*revue in* BECU-VILLALOBOS et LIBERTUN C 1995). En conclusion, la DA ne semble pas participer de manière significative au contrôle des fonctions corticotrope et gonadotrope adénohypophysaires, au cours de la période postnatale précoce.

La NA quant à elle est impliquée chez l'adulte dans le contrôle multifactoriel activateur des fonctions gonadotrope (*revue in* BARRACLOUGH 1992) et corticotrope (*revue in* WHITNALL 1993). La NA stimule en effet la sécrétion de GnRH dès les premières semaines de vie extra-utérine (*revue in* BECU-VILLALOBOS et LIBERTUN 1995) et les catécholamines sont capables d'activer l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, et de stimuler la sécrétion d'AVP, via des récepteurs de type β_2 -adrénergiques, chez des rats âgés de 8 jours (GRINO et OLIVER 1992b). L'élévation du métabolisme hypothalamique de la NA, que nous avons observé chez les nouveau-nés des deux sexes durant la période postnatale précoce, suggère une possible implication de la NA dans le contrôle de la fonction corticotrope hypophysaire durant cette période. Cependant, on ne peut pas exclure chez le mâle la participation de la NA dans l'activation centrale de la fonction gonadotrope qui se traduit par une élévation rapide, mais fugace, de la testotéronémie.

IV.4. Evolution du métabolisme hypothalamique de la sérotonine.

Au cours de la deuxième heure postnatale, le contenu de l'hypothalamus en 5HT est plus élevé chez la femelle que chez le mâle ; un tel dimorphisme sexuel est également observé chez l'adulte non seulement dans l'hypothalamus (BORISOVA *et coll.* 1996) mais également dans la presque totalité du cerveau (CARLSSON et CARLSSON 1988). Dans la mesure où la castration du nouveau-né mâle abolit ce dimorphisme ; une action masculinisante où défeminisante sur ce système des androgènes sécrétés après la naissance est suggérée (BORISOVA *et coll.* 1996). D'après nos propres observations, ce dimorphisme existe déjà chez le nouveau-né quand se produit

l'activation testiculaire néonatale, aussi, l'action des androgènes sur le système sérotoninergique pourrait être en majeure partie réalisée avant la naissance plutôt qu'après.

L'augmentation des contenus hypothalamiques en 5HT et 5HIAA chez les nouveau-nés des deux sexes pourrait être mise en relation avec l'activation des fonctions gonadotrope et corticotrope hypophysaires. Pour ce qui est de la fonction gonadotrope de l'animal adulte, des fibres sérotoninergiques établissent des contacts avec des corps cellulaires de neurones à GnRH dans l'aire préoptique et avec des terminaisons axonales de neurones à GnRH dans l'éminence médiane. De plus, la 5HT, dont le métabolisme hypothalamique est accru lors de la sécrétion de LH en phase préovulatoire chez la femelle, stimule *in vitro* la sécrétion de GnRH (*revue in* VITALE et CHIOCCHIO 1993). A des stades plus précoces du développement, au cours des deux premières semaines de vie post-partum, la 5HT est déjà impliquée dans le contrôle multifactoriel des neurones à GnRH chez la femelle (*revue in* BECCU-VILLALOBOS et LIBERTUN 1995).

Par ailleurs, en ce qui concerne la fonction corticotrope, de nombreux résultats suggèrent que la sérotonine peut intervenir, chez le très jeune rat, dans la régulation de la sécrétion d'ACTH. En effet, la sécrétion d'ACTH peut être stimulée par injection de 5HT, de son précurseur le 5-hydroxy-tryptophane (5-HTP), d'un agoniste sérotoninergique (la quipazine) et d'inhibiteurs de sa recapture (fluoxétine ou fluphenazine) chez des rats de 8 jours (BOUDOURESQUE 1987). Pendant la période postnatale, la réponse corticotrope lors d'une inhalation d'éther paraît mettre en jeu les systèmes sérotoninergiques centraux puisqu'elle est bloquée par des antagonistes de la 5HT (BOUDOURESQUE 1987). Chez de jeunes rats âgés de 3 jours, la corticostéronémie est augmentée après injection de 5-HTP (GROTA 1979). Enfin, la sérotonine pourrait agir à des stades encore plus précoces du développement via une action centrale puisqu'elle stimule *in vitro* la sécrétion de CRF par des neurones hypothalamiques foetaux en culture (HU *et coll.* 1992).

En conclusion, d'après nos propres observations, le métabolisme hypothalamique de la 5HT est accru durant la période postnatale précoce, principalement chez le mâle, et, dans une moindre mesure chez la femelle. En associant nos résultats relatifs aux catécholamines à ceux relatifs à la 5HT, nous ne pouvons pas confirmer l'hypothèse émise par BOUDOURESQUE (1987) selon laquelle le système sérotoninergique serait pratiquement le seul impliqué dans la sécrétion corticotrope pendant la vie foetale et à un stade précoce du développement postnatal, laissant par la suite une place prépondérante aux catécholamines. Cette hypothèse, basée sur des données morphologiques concernant la maturation de ces différents systèmes neuroniques centraux et sur des données physiologiques d'expériences réalisées avec des agonistes et/ou des antagonistes de la 5HT et de la NA chez des rats de 8 jours, n'est pas confortée par nos résultats, et en particulier par ceux obtenus chez des nouveau-nés femelles. Enfin, nos mesures réalisées sur l'ensemble de l'hypothalamus de nouveau-né pourraient masquer une régulation fine des neurones à CRF, puisqu'il a été montré que la 5HT pouvait stimuler directement *in vitro* la sécrétion de CRF par des neurones foetaux (HU *et coll.* 1992).

IV.5. Evolution du contenu hypothalamique en NPY.

A la naissance, nos résultats montrent que l'hypothalamus du mâle contient significativement plus de NPY que celui de la femelle. Un tel dimorphisme sexuel a également été rapporté chez l'adulte au niveau de l'éminence médiane (SAHU *et coll.* 1992), comme pour l'expression de ce neuropeptide dans le noyau arqué (URBAN *et coll.* 1993). On peut penser que l'établissement de ce dimorphisme est lié à l'action différentielle des stéroïdes sexuels mâles et femelles au cours du développement prénatal. On peut donc émettre l'hypothèse, à vérifier, que l'augmentation des taux d'androgènes à E19 chez le mâle pourrait être responsable de la sexualisation néonatale de ce système neuropeptidergique central.

Rappelons que, le neuropeptide Y est fréquemment co-localisé avec la noradrénaline dans le système nerveux central et périphérique (HOKFELT *et coll.* 1987) et que de nombreuses fibres noradrénergiques issues du tronc cérébral innervent l'hypothalamus et co-sécrètent de la NA et du NPY (SAWCHENKO *et coll.* 1985). Puisque nous avons noté précédemment qu'un dimorphisme sexuel relatif au métabolisme de la NA est présent à la naissance, il n'est pas surprenant qu'il en soit de même pour le NPY. Ainsi, l'établissement au niveau hypothalamique d'un dimorphisme sexuel du système noradrénergique et du système NPYergique pourrait être la conséquence d'une sécrétion d'androgènes chez le mâle en fin de gestation.

Au cours des minutes qui suivent la délivrance, le contenu hypothalamique en NPY diminue chez le mâle alors qu'il reste stable chez la femelle. L'évolution observée chez le mâle pourrait être liée à une sécrétion accrue de ce neuropeptide dans le sang portal, en relation avec l'activation de son axe gonadotrope. A notre connaissance il n'existe pas d'études relatives à l'action du NPY, sur cet axe, chez le nouveau-né. Par contre chez l'adulte, il est clairement établi que le NPY stimule l'axe gonadotrope d'une part en provoquant la libération de GnRH et d'autre part en potentialisant la sécrétion de LH adénohypophysaire induite par la GnRH (*revue in* SAHU *et coll.* 1992). Chez des femelles prépubères, le NPY stimule la synthèse et la sécrétion de GnRH et participe à la synchronisation de l'activité rythmique et circadienne des neurones à gonadolibérine (*revue in* BECU-VILLALOBOS et LIBERTUN 1995). Il est donc vraisemblable que, chez le nouveau-né mâle, le NPY sécrété durant la période postnatale précoce intervienne dans l'activation de la fonction gonadotrope hypophysaire responsable de la « crise testiculaire ».

Par ailleurs, le NPY est un puissant activateur de l'axe corticotrope de l'adulte, en agissant d'une part au niveau des neurones hypothalamiques à CRF et d'autre part au niveau des cellules corticotropes adénohypophysaires (BLASQUEZ *et coll.* 1995, *revue in* SIMONHANSON et DALLMAN 1995). Chez le fœtus de mouton, l'administration de NPY stimule la sécrétion d'ACTH via une action centrale (BROOKS *et coll.* 1994) ; on ignore à ce jour s'il en est de même chez le fœtus et/ou le nouveau-né de rat. Chez cette espèce, l'action du NPY sur la fonction corticotrope pourrait être indirecte, via divers systèmes neuroniques. Le système NPYergique pourrait ainsi contrôler l'activité et le développement de neurones sérotoninergiques dans certains noyaux hypothalamiques au cours de l'ontogénèse (UEDA *et coll.* 1995) ainsi que, l'activité de neurones noradrénergiques, en particulier dans le NPV de l'adulte (PAVIA *et coll.* 1995).

En résumé, nous avons mis en évidence un dimorphisme sexuel du système NPYergique hypothalamique dès la naissance et une diminution du contenu hypothalamique en NPY chez le mâle à une heure post-partum, ce qui pourrait être le signe d'une sécrétion accrue de ce neuropeptide. Chez la femelle, le contenu de l'hypothalamus en NPY est stable et on remarque l'absence d'activation de l'axe gonadotrope au cours de la période postnatale précoce ; ce qui n'était pas le cas chez le mâle de la même fratrie. Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse émise, à savoir que durant cette période le NPY est impliqué dans l'activation de la fonction gonadotrope hypophysaire exclusivement chez le nouveau-né mâle. Tout ceci n'exclut pas un rôle éventuel de ce neuropeptide dans l'activation de l'axe corticotrope à la naissance, chez les nouveau-nés des deux sexes.

En conclusion, nous avons montré que, chez le nouveau-né, le dimorphisme sexuel pour les contenus hypothalamiques en NA, 5HT et NPY, observé chez l'adulte, est déjà présent à la naissance. Les métabolismes de la NA et de la 5HT sont augmentés respectivement chez les nouveau-nés des deux sexes et chez les nouveau-nés mâles au cours des premières minutes de vie extra-utérine. Le contenu hypothalamique en NPY est, quant à lui, diminué chez le mâle, peut être en raison d'une sécrétion accrue de ce neuropeptide. Puisque ces modifications des métabolismes de neurotransmetteurs sont corrélées, au cours du temps, avec les activations de l'axe corticotrope chez les nouveau-nés des deux sexes et de l'axe gonadotrope chez les mâles, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces neurotransmetteurs peuvent déjà être impliqués à ce stade précoce du développement postnatal dans le contrôle multifactoriel des fonctions corticotrope et gonadotrope de l'adénohypophyse du nouveau-né. Ainsi, chez la femelle principalement la NA serait impliquée dans l'activation de la fonction corticotrope alors que chez le mâle, la 5HT et le NPY interviendraient plus particulièrement pour l'activation de la fonction gonadotrope hypophysaire. Une telle hypothèse mérite néanmoins d'être soumise à une vérification expérimentale.

L'ensemble de ces résultats obtenus chez des nouveau-nés issus de mères indemnes, nous a permis de connaître l'évolution temporelle de divers paramètres neuroendocriniens et neurochimiques après délivrance par césarienne et maintien en survie après la naissance. Les valeurs de ces paramètres nous serviront de référence lors de l'étude des conséquences, chez le nouveau-né, d'une exposition prénatale à la morphine par l'administration répétée de cette drogue à des rates gestantes, ceci dans le but d'obtenir un modèle expérimental permettant de prévoir et/ou de comprendre les effets délétères à court terme et à long terme d'une consommation de drogues opioïdes (héroïne ou morphine) par la femme enceinte toxicomane.

DEUXIEME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur l'évolution des métabolismes hypothalamiques de différents neurotransmetteurs (Sérotonine, Noradrénaline, Neuropeptide Y) en relation avec l'activation des axes gonadotrope et corticotrope au cours de la période postnatale précoce chez le rat.

I. INTRODUCTION

I.1. Les systèmes opioïdes.

I.1.1. Mise en évidence des récepteurs opiacés.

Les opiacés produisent leur action biologique en se fixant de manière spécifique et réversible, à des récepteurs membranaires du système nerveux. L'étude du mode d'action, sur ce système, des dérivés morphiniques a largement contribué à la découverte des opioïdes endogènes. L'existence de ces récepteurs a été mise en évidence dès 1973, par approche pharmacologique en utilisant des composés opiacés radiomarqués dont on a étudié la fixation spécifique et saturable sur des préparations membranaires de cerveaux (PERT et SNYDER 1973, SIMON *et coll.* 1973, TERENIUS 1973). Par la suite, l'utilisation comme ligands d'un grand nombre d'analogues de structure des opiacés a permis de distinguer trois types de récepteurs, appelés μ , δ et κ . Ces récepteurs sont très abondants dans les zones impliquées dans l'intégration des informations nociceptives (douleur), c'est en particulier le cas dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces récepteurs sont aussi largement distribués dans le système nerveux central et particulièrement dans les régions limbiques qui contrôlent les émotions. Bien que tous ces récepteurs soient impliqués dans l'analgésie, chaque type de récepteur présente des propriétés de liaison spécifiques laissant supposer leur contribution, spécifique aux différentes réponses pharmacologiques des opiacés (*revue in KIEFFER et coll.* 1997).

I.1.1.1. Les différents types de récepteurs aux opiacés.

Très longtemps, les protéines membranaires réceptrices des opiacés (exogènes) ou des opioïdes (endogènes), ont constitué une famille mal connue, en dépit de nombreuses études menées dans ce domaine par de multiples équipes internationales.

C'est le clonage récent de l'ADNc du récepteur δ des opiacés (EVANS *et coll.* 1992, KIEFFER *et coll.* 1992) qui a permis le clonage, par homologie, des ADNc des récepteurs μ et κ (*revue in KIEFFER* 1995). L'analyse de la séquence des ADNc et la déduction de la structure primaire des protéines exprimées ont révélé que ces récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, et qu'ils présentent une topologie à sept domaines transmembranaires. Le récepteur de type μ est actuellement le mieux connu ; il se caractérise par sa très haute affinité pour la morphine. Le récepteur de type δ fixe préférentiellement les enképhalines, opioïdes endogènes alors que, le récepteur de type κ lie avec beaucoup d'affinité la dynorphine, un autre opioïde endogène. Cependant, si cette classification des récepteurs en trois types est généralement admise une subdivision de certains d'entre eux est proposée par quelques auteurs ; ainsi, à titre d'exemple, les récepteurs de type μ , comme ceux de type κ , peuvent être divisés en deux sous-types respectivement μ_1/μ_2 et κ_1/κ_2 (*revue in DHAWAN et coll.* 1996) D'une façon générale, une classification précise sur des bases pharmacologiques est d'autant plus difficile à établir que des interactions étroites existent entre les sites, conduisant à une modification de leurs affinités à l'égard de ligands. Ces interactions potentielles entre plusieurs types de récepteurs pourraient

conduire à l'existence hypothétique d'un complexe-récepteur composé de récepteurs distincts pouvant interagir ensemble (*revue in KIEFFER 1995*).

1.1.1.2. Les mécanismes de transduction membranaire.

La liaison de l'agoniste opiacé à son récepteur génère une réponse intracellulaire, (ou second messenger), par l'intermédiaire de mécanismes de transduction faisant intervenir des protéines G. Dans la plupart des cas, la stimulation des récepteurs opiacés provoque une hyperpolarisation de la membrane plasmique liée à des modifications de conductances ioniques. Ainsi les agonistes κ réduisent les courants entrants Ca^{2+} . Les récepteurs de type δ peuvent agir à la fois sur les canaux Ca^{2+} et des canaux K^+ . Enfin, les récepteurs de type μ sont fonctionnellement couplés à des canaux K^+ et leur activation conduit à une inhibition des courants calciques (*revue in PIROS et coll. 1996*).

L'inhibition de l'activité adénylate-cyclase paraît être la réponse la plus fréquente induite par l'interaction ligand-récepteur, en particulier pour les récepteurs de type μ et δ (WANG et GINTZIER 1994 ; *revue in PIROS et coll. 1996*). D'une façon générale, selon les données de la littérature, plusieurs systèmes de transduction membranaire peuvent participer à l'élaboration de la réponse cellulaire à la stimulation des récepteurs aux opiacés. Par ailleurs, la nature du second messenger formé peut varier d'une région à une autre du système nerveux (*revue in KIEFFER 1995 ; revue in DHAWAN et coll. 1996*).

1.1.2. Les peptides opioïdes endogènes.

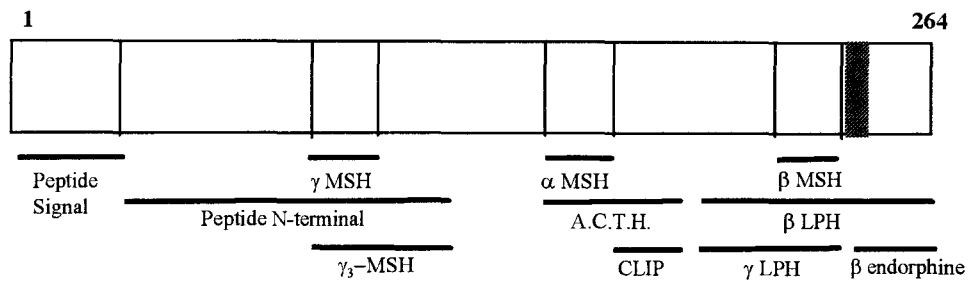
Deux ans après la mise en évidence des récepteurs aux opiacés, HUGUES *et coll.* (1975) montraient l'existence dans le système nerveux central de deux peptides opioïdes endogènes, la Met-enképhaline et la Leu-enképhaline, capables de mimer l'action de dérivés opioïdes. Depuis cette découverte, la pluralité de ces peptides endogènes appelés endomorphines (environ une vingtaine) a été mise en évidence, ils appartiennent à deux principales familles celle de la β -endorphine et celle des enképhalines.

Malgré cette diversité, tous les peptides appartenant à ces deux familles possèdent une même séquence d'acides aminés N-terminale (Tyr-Gly-Gly-Phe). Les endorphines (alpha, bêta, gamma et delta) sont dérivées d'un précurseur, la pro-opiomélanocortine (Fig. 17). Il est intéressant de constater que cette molécule est également le précurseur de l'hormone corticotrope (ACTH). D'une façon générale, les taux circulants de ces deux substances (endorphines et ACTH) varient en fonction du niveau de stress de l'organisme.

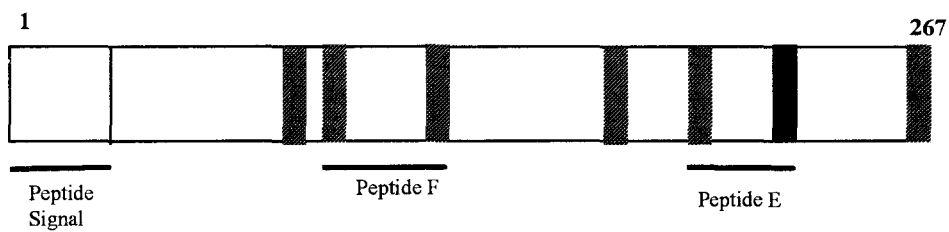
La famille des enképhalines, beaucoup plus complexe, dérive de deux précurseurs, les proenképhalines A et B. Les produits du clivage de la proenképhaline A sont, entre autres, la Met- et la Leu-enképhaline. La proenképhaline B, ou prodynorphine, est le précurseur de la famille des dynorphines (Fig. 17).

Comme les autres neuromédiateurs, les enképhalines sont libérées dans la fente synaptique par un processus calcium-dépendant et se lient à des récepteurs pré-ou postsynaptiques. Cette interaction ligand récepteur est rapidement interrompue par la dégradation enzymatique des peptides, principalement sous l'action de l'enképhalinase, qui dégrade aussi d'autres peptides et de l'aminopeptidase N. Les dynorphines sont,

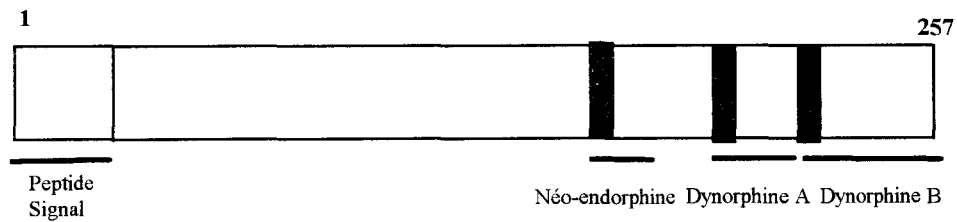
1. Prépro-opiomélanocortine



2. Prépro-enképhaline A



3. Prépro-enképhaline B (Prépro-dynorphine)



Met-enképhaline

Leu-enképhaline

Figure 17 : Les trois précurseurs des endomorphines.

1. La **Prépro-opiomélanocortine** contient notamment une séquence de Met-
enképhaline, d'ACTH et de β -endorphine.

2. La **Prépro-enképhaline** contient 6 résidus Met-enképhaline et 1 résidu Leu-
enképhaline.

3. La **Prépro-enképhaline B** ou **Prépro-dynorphine** contient 3 résidus Leu-
enképhaline et aboutit à la formation de dynorphine A et B.

quant à elles, catabolisées par des carboxypeptidases. Si les enképhalines interviennent de manière privilégiée dans le processus d'analgésie, ces substances, contrairement à la morphine, n'induisent pas de phénomènes de tolérance et/ou de dépendance, probablement parce qu'elles subissent rapidement une dégradation enzymatique (*revue in KIEFFER et coll. 1997*).

Ces peptides et leurs récepteurs forment un système de neurotransmission qui module entre autre la réponse à la douleur, celle au stress, et la manifestation des émotions. Ces peptides sont également impliqués dans le contrôle de fonctions autonomes, endocriniennes et immunitaires (*revue in OLSON et coll. 1996*).

I.2. Mécanisme d'action de la morphine.

La connaissance récente des gènes codant pour les récepteurs des opiacés à ouvert la voie à des études fonctionnelles chez l'animal, dans le but de mieux analyser le rôle respectif de chacun des types de récepteurs dans les effets engendrés par les opioïdes. Par l'utilisation de la méthode de recombinaison homologue, (LEMARCHANDEL et MONTAGUTELLI 1990), MATTHES *et coll.*(1996) ont inactivé chez la souris le gène codant pour le récepteur μ . Ainsi, les souris homozygotes pour la mutation ($\mu^{-/-}$) ne présentent plus de liaison de ligands spécifiques des récepteurs de type μ au niveau cérébral, ni d'expression de ce type de récepteurs. Par ailleurs ces souris, naissent sans anomalies anatomo-morphologiques apparentes grandissent normalement et se reproduisent avec un taux de fertilité comparable à celui du type sauvage ($\mu^{+/+}$). L'absence, chez ces souris de récepteurs de type μ , d'une part, n'affecte pas le nombre et la répartition des récepteurs de type δ et κ et d'autre part ne modifie pas le niveau d'expression des gènes codant pour la proenképhaline, la prodynorphine ou la proopiomélanocortine ainsi que la distribution de ces précurseurs des peptides opioïdes.

Des tests comportementaux ont montré que les souris mutantes homozygotes ($\mu^{-/-}$) sont insensibles à l'action de la morphine agoniste par excellence des récepteurs de type μ . L'analgésie, l'euphorie et la dépendance physique, trois des plus remarquables actions biologiques de cette drogue, sont totalement abolies chez ces animaux (MATTHES *et coll.* 1996). L'absence de réponse résiduelle à ces tests ayant été observée, on peut affirmer raisonnablement que ces effets de la morphine n'impliquent pas les récepteurs δ et κ . Ces expériences, ont prouvé, pour la première fois, que le produit du gène codant pour le récepteur μ représente par excellence la cible moléculaire de la morphine. Il reste cependant à évaluer l'état fonctionnel des récepteurs δ et κ chez ces souris mutantes afin d'interpréter sans ambiguïté la suppression complète d'effets comportementaux de la morphine chez ces animaux.

I.3. But de l'étude.

Dans le but de préciser quelles peuvent être les conséquences physiopathologiques d'une exposition prénatale à des opioïdes (codéine, morphine et héroïne) chez l'homme, nous avons mené une étude expérimentale chez l'animal de laboratoire en utilisant comme modèle des rates gravides injectées de sulfate de morphine au cours de la gestation.

Les foetus ont été délivrés à terme par césarienne et une étude en grande partie comparable à celle réalisée précédemment chez des nouveau-nés de mères indemnes a été réalisée. L'étude des conséquences à court terme d'une exposition prénatale à la morphine est justifiée pour les raisons suivantes :

- 1) les enfants de mères toxicomanes, présentent à la naissance de graves séquelles en particuliers neurologiques. (cf Introduction).
- 2) au cours des premières heures suivant la délivrance, l'apparition de la « crise testiculaire » chez le garçon est comparable à celle observée chez de nombreux animaux de laboratoire et d'animaux domestiques (CORBIER *et coll.* 1992). On peut donc émettre l'hypothèse que l'exposition prénatale à la morphine est susceptible d'affecter la fonction gonadique du nouveau-né et en particulier la « crise testiculaire ». Il est donc vraisemblable qu'une perturbation de cette crise peut déterminer chez l'homme, comme elle le fait chez les animaux, le bon fonctionnement de son axe gonadotrope et son comportement sexuel à l'âge adulte. A l'appui de cette hypothèse on peut rappeler que, chez l'homme adulte, la dépendance à l'héroïne est associée à des phénomènes d'hypogonadisme et/ou d'aménorrhée.
- 3) des études post-mortem, menées chez des enfants de mères héroïnomanes, ont mis en évidence une réduction de la taille et du nombre de cellules dans plusieurs organes ou tissus parmi lesquels les plus affectés sont les surrénales (*revue in* VATHY et KATAY 1992). On peut également émettre l'hypothèse que cette atrophie est le signe clinique d'un hypofonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaires, installé dès la vie foetale.

A la vue de ces observations cliniques ou expérimentales et des hypothèses de travail qu'elles suscitent, il nous a paru primordial d'étudier dans un premier temps à court terme, chez le nouveau-né, les effets d'une exposition prénatale à la morphine avant d'étudier à plus long terme si ces effets ont un caractère provisoire ou permanent. Par ailleurs, certains événements neuro-endocriniens qui surviennent dans la période postnatale précoce ont des effets à long terme sur le fonctionnement d'axes hypothalamo-hypophysaires tels que l'axe gonadotrope et l'axe corticotrope.

Pour toutes ces raisons nous avons étudié, chez le nouveau-né de rat exposé à la morphine durant une partie de la gestation :

- la masse des testicules et l'évolution de la testostéronémie chez le mâle
- l'évolution de l'oestradiolémie chez la femelle.
- la masse surrénalienne et l'évolution de la corticostéronémie chez le mâle et la femelle.
- l'évolution des métabolismes hypothalamiques de la NA, de la 5HT et celle du contenu de l'hypothalamus en NPY au cours de la période postnatale précoce.

I.4. Choix du modèle expérimental et du protocole de traitement.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle établi par VATHY *et coll.* (1985) qui consiste à administrer bi-quotidiennement 3 mg de sulfate de morphine à des rates gravides, du 11ème au 18ème jour de la gestation. Ces doses de morphine sont modérées, comparées à celles utilisées par les héroïnomanes.

L'administration de morphine, au cours de la seconde partie de la gestation, a été faite pour observer principalement ses effets sur la maturation du cerveau en développement. En effet, la première partie de la gestation est surtout marquée chez le fœtus de rat par l'organogénèse, alors que la seconde constitue une période critique au cours de laquelle apparaissent des différences sexuelles dans l'organisation fonctionnelle du système nerveux central. C'est au cours de cette période que l'on observe en particulier :

- la baisse sinon la fin des divisions des cellules au sein de l'hypothalamus et des neurones dans l'aire préoptique (entre E14 et E17) selon JACOBSON et GORSKI (1981).

- l'apparition, dans l'hypothalamus, des récepteurs aux opioïdes (à environ E14) selon CLENDENINN *et coll.* (1976) et des récepteurs aux hormones stéroïdes (à environ E15) d'après VITO et FOX (1981).

- les premières sécrétions d'hormones stéroïdes gonadiques et surrénaliennes (à environ E15) d'après McEWEN (1978), et DUPOUY et CHATELAIN (1981).

Par ailleurs, c'est en utilisant ce modèle expérimental, que VATHY *et coll.* (1985) ont mis en évidence des effets à long terme de ce traitement prénatal sur le comportement sexuel de l'adulte (mâle et femelle), ainsi que sur le fonctionnement des systèmes catécholaminergiques centraux (VATHY et KATAY 1992). Bien que de tels effets à long terme restent à confirmer, on ignorait, quand nous avons commencé notre étude, si de tels effets étaient déjà présents au cours de la période postnatale précoce dont on a souligné l'importance pour la vie adulte. Pour toutes ces raisons, le travail présenté dans ce mémoire demeure focalisé sur cette période critique de l'ontogénèse.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Animaux, traitements et prélèvements.

II.1.1. Les animaux.

Les animaux utilisés et les conditions d'élevage sont identiques à ceux décrits précédemment dans la 1ère partie de ce mémoire. Les femelles fécondées sont placées dans des cages individuelles dès le premier jour de la gestation et élevées, dans les conditions définies précédemment, jusqu'au 21ème jour de la gestation.

II.1.2. Les traitements.

Les rates gestantes dont le poids corporel est environ 330 g sont réparties en 2 groupes expérimentaux :

- un groupe « MORPHINE » dans lequel les femelles reçoivent en injection sous-cutanée du sulfate de morphine (Laboratoires Francopia-Sanofi) du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation, à raison de 6 mg/rate/jour, en injections quotidiennes de 3 mg réalisées à 9h00 et à 17h00, en solution dans un volume de 500µl de solvant (NaCl 0,9%).

- un groupe « SOLVANT », utilisé comme groupe témoin, dans lequel les rates reçoivent deux fois par jour, aux mêmes heures, le même volume (500 µl) de solvant seul.

II.1.3. Prélèvement des foetus, collecte et stockage des échantillons biologiques.

Ces manipulations sont identiques à celles décrites précédemment (paragraphe II.1.2. et II.1.3. de la première partie).

II.2. Dosages radioimmunologiques des hormones dans le sang et du NPY dans l'hypothalamus.

Les protocoles des dosages des hormones circulantes (corticostérone, testostérone et oestradiol) et du Neuropeptide Y hypothalamique ont été décrits antérieurement (paragraphe II.2. de la première partie).

II.2.1. Dosage du contenu testiculaire en testostérone.

Après le sacrifice des nouveau-nés, les testicules sont rapidement prélevés, pesés et broyés par sonication dans 500 µl d'une solution de NaCl 0,9% ; après centrifugation (20 min. à 14000 rpm), le surnageant est congelé à -20°C jusqu'au jour du dosage radioimmunologique de la testostérone.

La teneur du testicule en testostérone est déterminée après extraction de l'hormone (cf 1^{ère} partie : II.2.1.1.) et dosage radioimmunologique (cf 1^{ère} partie : II.2.1.2.).

II.3. Dosage par HPLC de neuromédiateurs et de leurs métabolites.

Les dosages sont effectués selon le protocole précédemment détaillé (chapitre II.3. de la 1^{ère} partie).

II.4. Statistiques.

Les données ont été soumises à une analyse de variance à trois voies (sexe x traitement prénatal x temps), puis à un test de Dunnet. Le test « t » de Student a été utilisé uniquement pour comparer deux groupes. La signification statistique est fixée au seuil $P \leq 0,05$.

III. RESULTATS

III.1. Animaux étudiés.

Un ensemble de 54 portées a été utilisé pour cette étude, 26 ont été traitées au solvant et 28 à la morphine. Le traitement à la morphine n'affecte pas la taille des portées puisque le nombre moyen de fœtus est de $9,38 \pm 0,65$ pour les portées « solvant » (S) et de $8,78 \pm 0,64$ pour les portées « morphine » (M), ($P > 0,05$). Ce traitement n'affecte pas davantage la répartition entre mâles et femelles à l'intérieur des portées (mâles : $4,77 \pm 0,41$ (S) vs $4,19 \pm 0,42$ (M) ; $P > 0,05$; femelles : $4,61 \pm 0,51$ (S) vs $4,89 \pm 0,44$ (M) ; $P > 0,05$). Le poids corporel des nouveau-nés n'a été mesuré que sur quelques animaux de portées de tailles comparables immédiatement après la délivrance ; il n'est pas davantage affecté par le traitement à la morphine.

III.2. Conséquences du traitement prénatal à la morphine sur l'évolution des métabolismes hypothalamiques d'amines biogènes et du NPY.

III.2.1. La Sérotonine (5HT) et le 5HIAA.

Chez les nouveau-nés, issus de mères traitées au solvant, le contenu hypothalamique en 5HT est comparable chez les mâles et les femelles à la naissance ; il ne varie pas significativement au cours des 90 min. qui suivent la délivrance (fig. 18A/18B).

Chez les nouveau-nés exposés à la morphine le contenu de l'hypothalamus en 5HT est, à la naissance comparable dans les deux sexes et non différent de celui observé au même stade chez les animaux de mère injectée de solvant (fig. 18A/18B). Chez les mâles le contenu hypothalamique en 5HT est néanmoins significativement augmenté 60 min. après la naissance (fig. 18A) alors que chez les femelles il ne l'est pas (fig. 18B).

Après la naissance, le contenu hypothalamique en 5HIAA augmente significativement chez les nouveau-nés de mères injectées de solvant, à 60 et 90 min. chez les femelles et à 90 min. chez les mâles (fig. 18C/18D) ; quelque que soit le stade, il n'y a pas de différence entre les sexes.

Chez les nouveau-nés exposés à la morphine, le contenu hypothalamique en 5HIAA est comparable dans les deux sexes à la naissance et il augmente de manière semblable 60 et 90 min. après la délivrance (fig. 18C/18D).

Au cours des 30 premières minutes de vie extra-utérine, le contenu de l'hypothalamus en 5HIAA est significativement plus élevé chez les femelles exposées à la morphine que chez les femelles témoins exposées au solvant (fig. 18D).

Le métabolisme de la sérotonine, qui peut être estimé par le rapport 5HIAA/5HT, reste stable chez les mâles des deux groupes expérimentaux (fig. 19A), mais augmente chez les femelles témoins (90 min. après la naissance) et chez les femelles exposées à la morphine (30 et 90 min) (fig 19B). D'après nos données expérimentales il apparaît qu'une demi-heure après la délivrance, le métabolisme de la

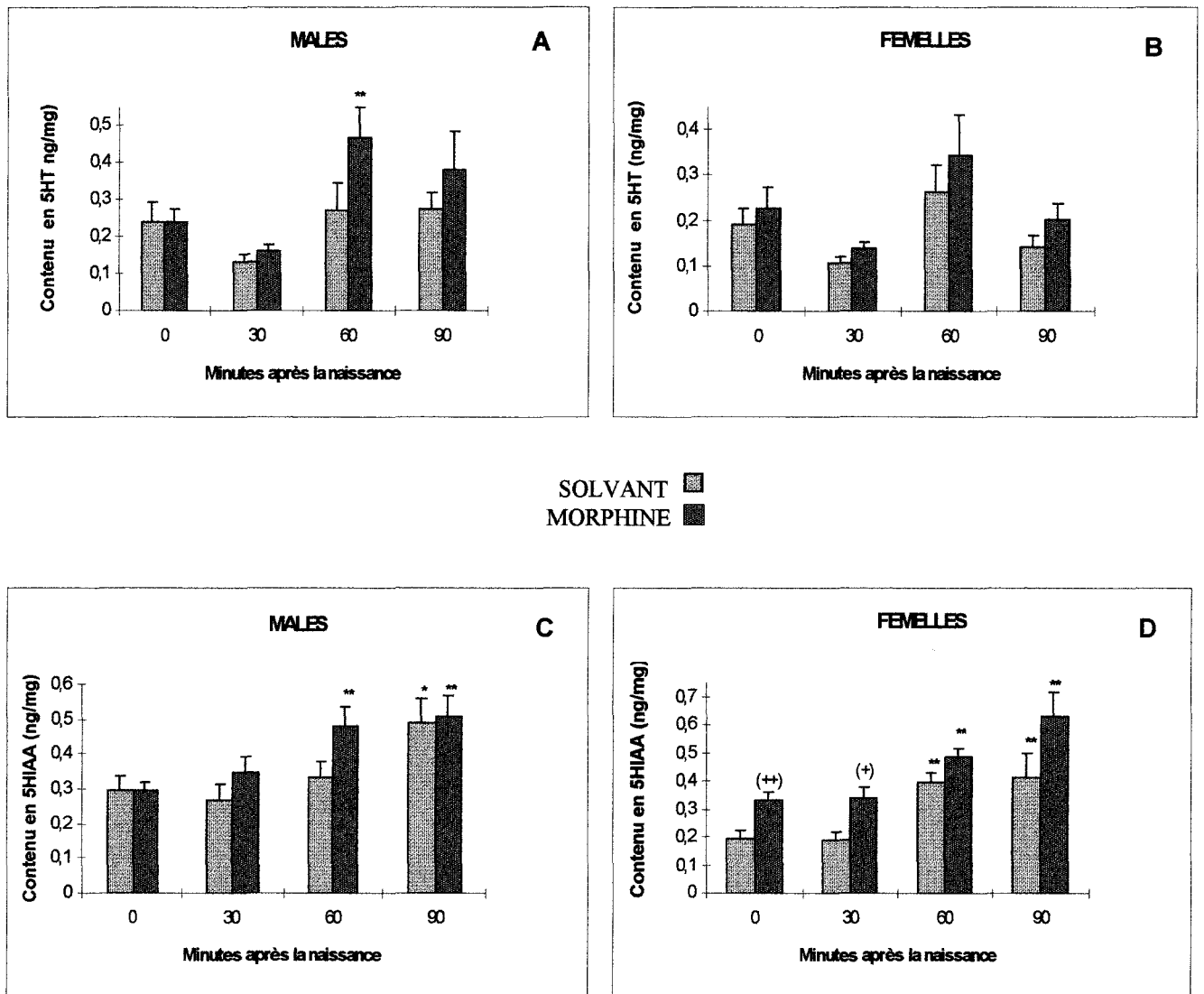


Figure 18: Evolution postnatale du contenu hypothalamique en 5HT (A,B) et en 5HIAA (C,D)) chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères injectées de solvant (■) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=4-11). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01
- Morphine vs solvant (+) P<0,05 (++) P<0,01

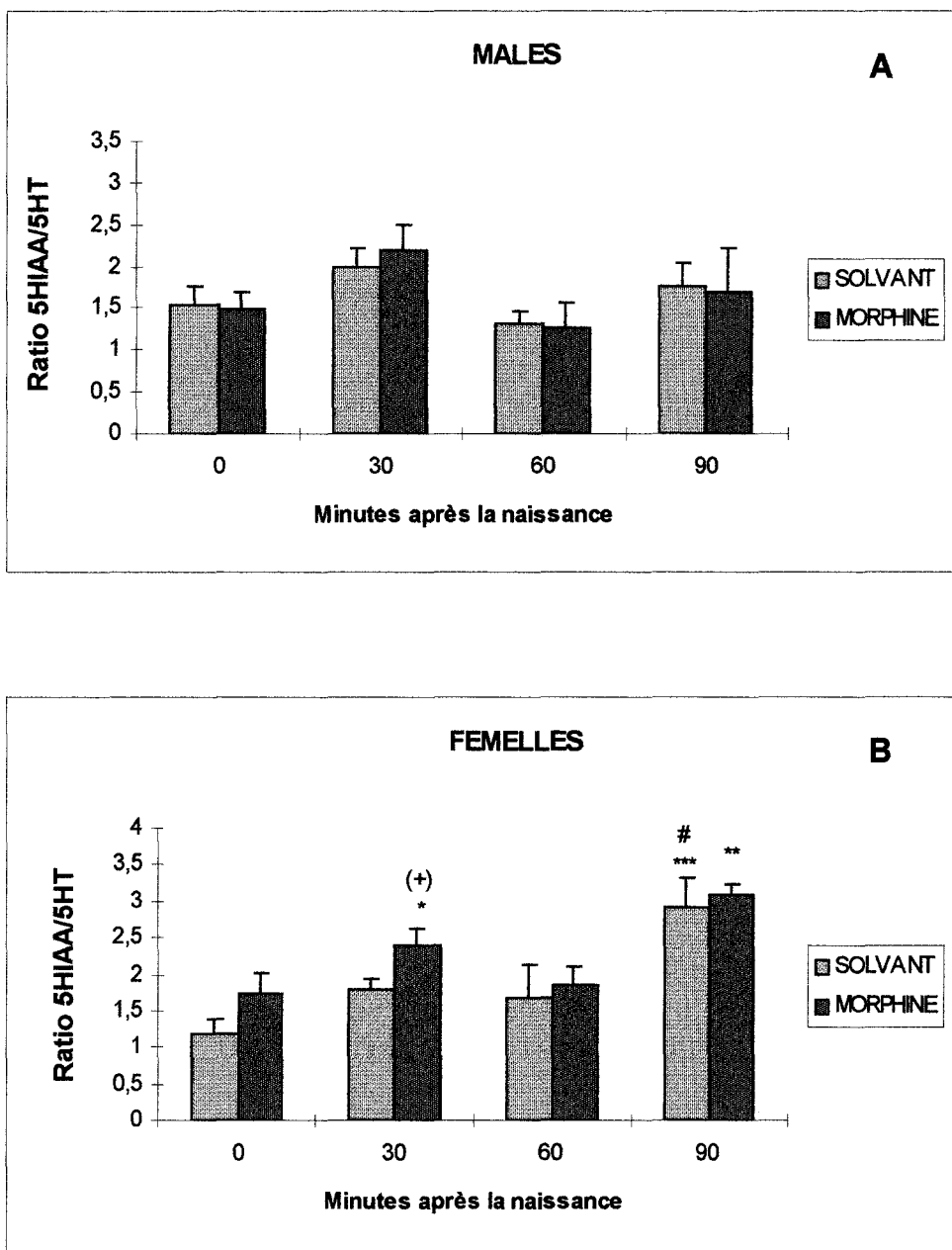


Figure 19 : Evolution postnatale du métabolisme hypothalamique de la sérotonine (ratio 5HIAA/5HT) chez des nouveau-nés mâles (A) et femelles (B) issus de mères injectées de solvant (□) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=5-11). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001
- Morphine vs Solvant (+) P<0,05
- femelles vs mâles # P<0,05

sérotonine est plus intense chez les femelles exposées à la morphine que chez les témoins. (fig. 19B).

Par ailleurs, le métabolisme de la 5HT est 90 min. après la délivrance significativement plus élevé chez les nouveau-nés femelles témoins que chez les mâles des mêmes fratries (fig. 19A/19B).

III.2.2. La noradrénaline (NA) et le MHPG.

Le contenu de l'hypothalamus en NA reste stable chez les nouveau-nés des deux groupes expérimentaux au cours des 90 premières minutes de vie extra-utérine, et aucune différence liée au sexe n'est observée (fig. 20A/20B). Ce contenu est légèrement mais significativement diminué à la délivrance chez les nouveau-nés mâles exposés à la morphine (fig. 20A).

Le contenu hypothalamique en MHPG reste stable et comparable chez les nouveau-nés mâles des deux groupes expérimentaux (fig. 20C) alors qu'il est augmenté chez les femelles exposées à la morphine, 1 heure après la naissance (fig. 20D). A ce stade, il est significativement plus élevé chez ces dernières que chez les femelles témoins (fig. 20D).

Le métabolisme hypothalamique de la noradrénaline qui peut être estimé par le rapport MHPG/NA est augmenté chez les nouveau-nés mâles témoins 90 min. après la naissance (fig. 21A) alors qu'il reste stable chez les mâles exposés à la morphine. Chez les femelles des deux groupes expérimentaux, ce métabolisme est comparable et n'évolue pas significativement au cours des 90 min. qui suivent la naissance (fig. 21B). Il n'existe pas de différence significative entre les mâles et les femelles pour ce paramètre. (fig. 21A/21B).

III.2.3. Le neuropeptide Y.

Chez les nouveau-nés, mâles et femelles, issus de mères injectées de solvant, le contenu hypothalamique en NPY est comparable à la naissance et diminue légèrement mais non significativement 30 et 60 min. après celle-ci (fig. 22A/22B). L'exposition prénatale à la morphine n'a pas d'effet significatif sur ce contenu et sur l'évolution de celui-ci chez les mâles et les femelles (fig. 22A/22B).

III.2.4. Masse surrénalienne et corticostéronémie.

Le poids des surrénales des animaux, mâles et femelles, de mères traitées à la morphine est fortement réduit comparativement à celui des animaux de mères traitées au solvant, ceci qu'elle que soit la période étudiée entre 0 et 90 minutes après la naissance (fig. 23A/23B).

A la naissance, la corticostéronémie est comparable chez les animaux mâles des deux groupes expérimentaux, mais, chez les femelles, elle est significativement diminuée par le traitement prénatal à la morphine (fig. 23C/23D). Par la suite, la corticostéronémie s'élève régulièrement chez les nouveau-nés mâles et femelles témoins, alors qu'elle reste stable chez les nouveau-nés de mères injectées de morphine (fig. 23C/23D).

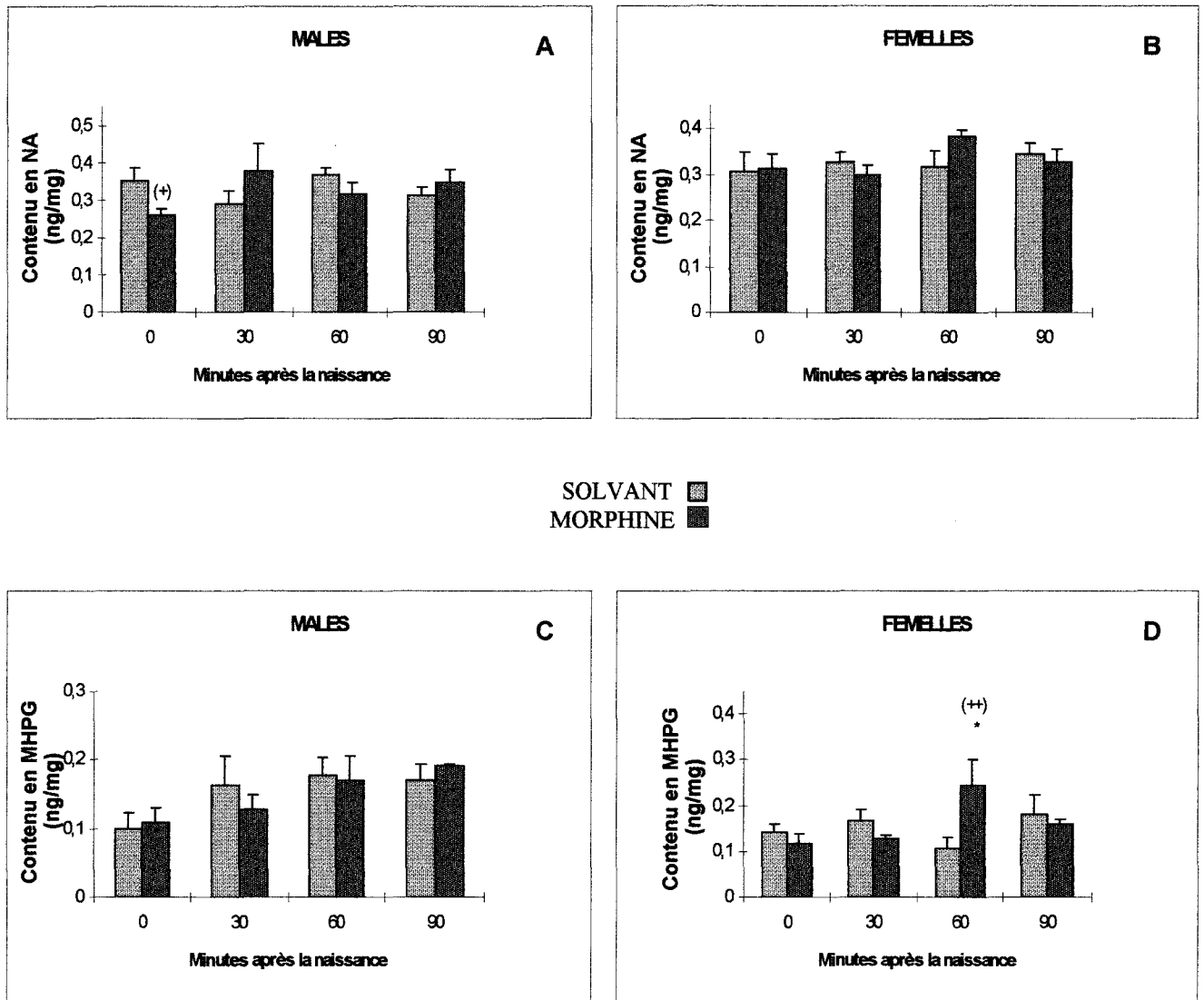


Figure 20: Evolution postnatale du contenu hypothalamique en NA (A,B) et en MHPG (C,D) chez des nouveau-nés mâles et femelles de mères injectées de solvant (■) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=4-12). Analyse statistique :

- versus temps 0 min.

* P<0,05

- Morphine vs solvant

(+) P<0,05 (++) P<0,01

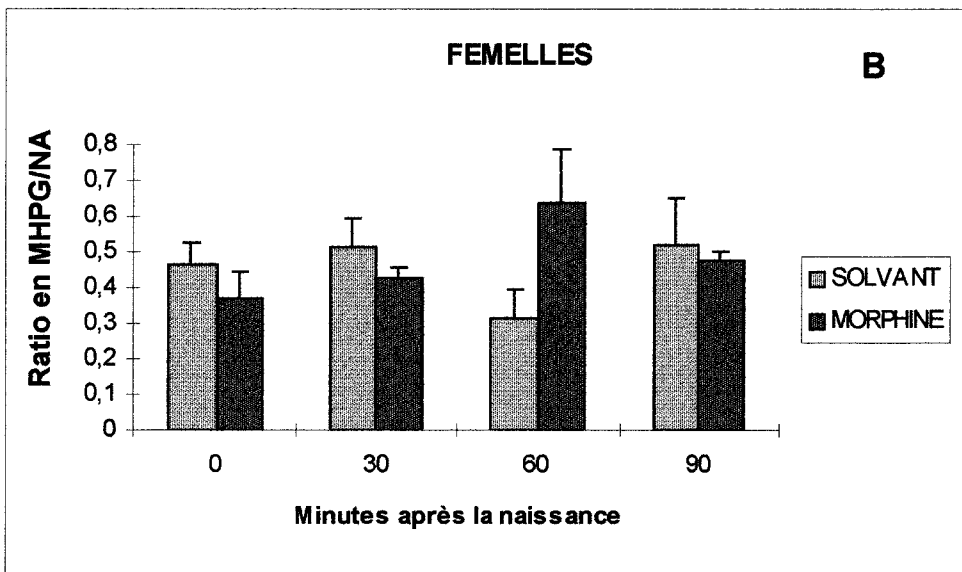
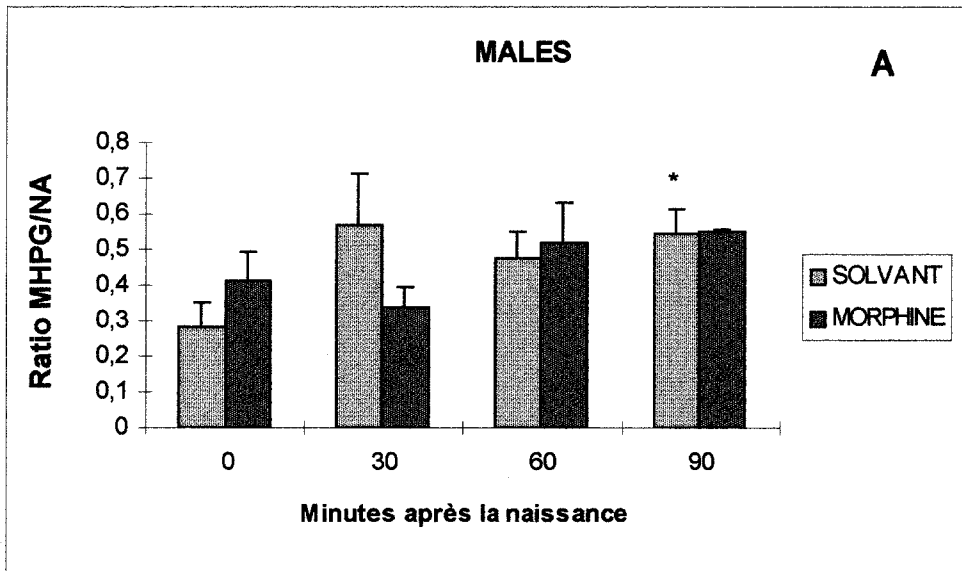


Figure 21 : Evolution postnatale du métabolisme hypothalamique de la noradrénaline (ratio MHPG/NA) chez des nouveau-nés mâles (A) et femelles (B) issus de mères injectées de solvant (◻) ou de morphine (◼) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=5-9). Analyse statistique :
 - versus temps 0 min. * P<0,05

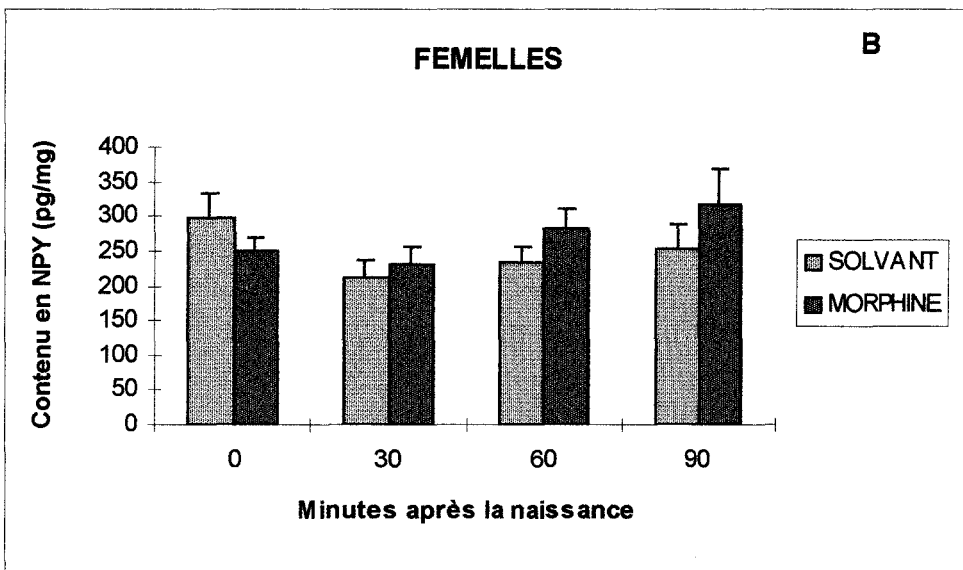
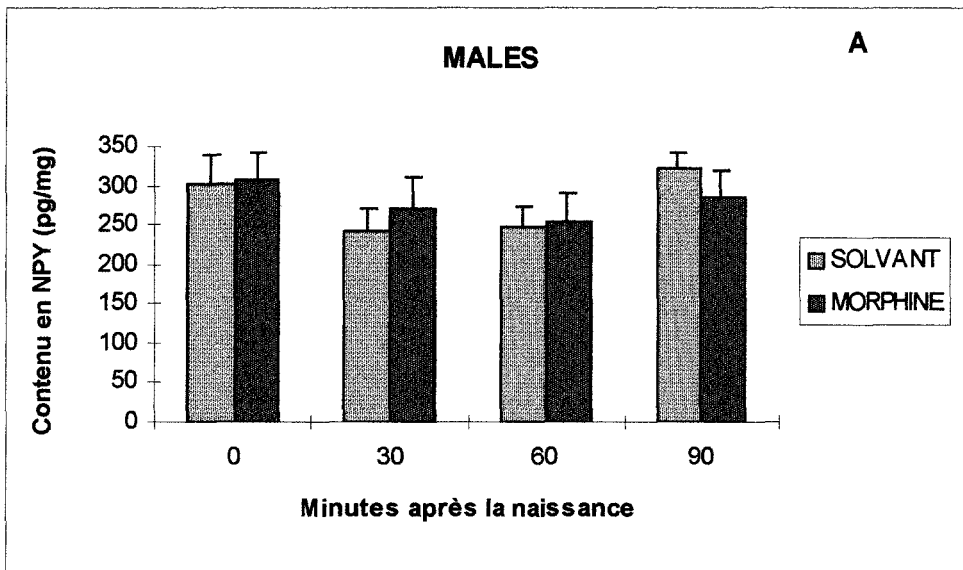


Figure 22 : Evolution postnatale du contenu hypothalamique en NPY chez des nouveau-nés mâles (A) et femelles (B) issus de mères injectées de solvant (■) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=5-14). Il n'y a pas de différences significatives entre les groupes.

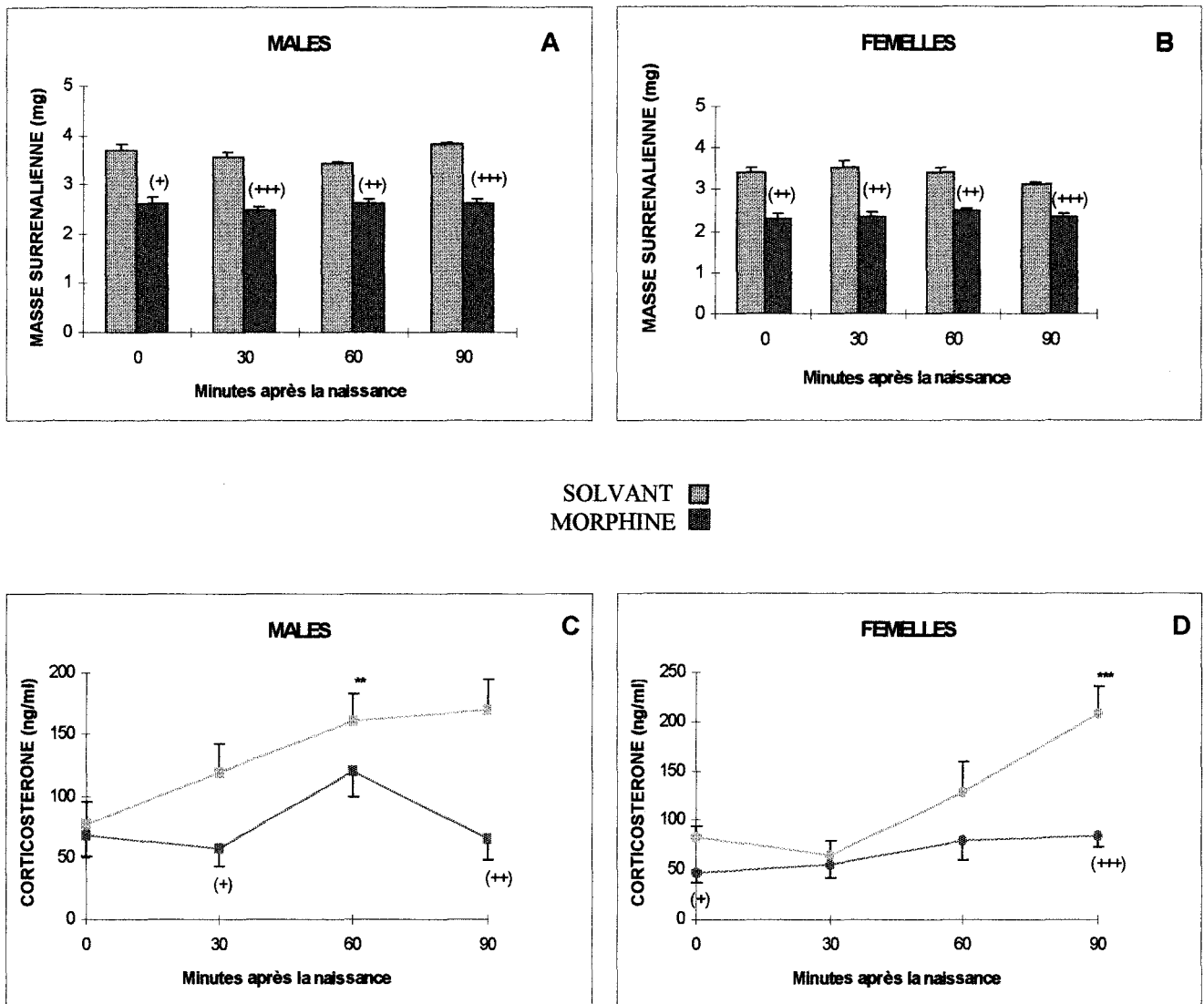


Figure 23: Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur la masse surrénalienne (A,B) et l'évolution de la corticostéronémie (C,D) chez des nouveau-nés mâles (A-C) et femelles (B-D) de mères injectées de solvant (▨) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyenne ± ESM (n=6-13). Analyse statistique :

- versus temps 0 min. * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001
- Morphine vs solvant (+) P<0,05 (++) P<0,01 (+++) P<0,001

La corticostéronémie est significativement diminuée par le traitement à la morphine à 30 et 90 min. chez les mâles et à 0 et 90 min. chez les femelles (fig. 23C/23D).

III.2.5 Masse testiculaire, testostérone tissulaire et plasmatique.

A la naissance et au cours des 90 premières minutes de vie extra-utérine la masse testiculaire et le contenu des testicules en testostérone des nouveau-nés mâles de mères injectées de morphine sont comparables à ceux des mâles de mères injectées de solvant (données non montrées).

La testostéronémie s'élève rapidement et de manière similaire chez les nouveau-nés mâles des deux groupes expérimentaux dès les premières 30 minutes après la naissance et demeure élevée jusqu'à 90 min. (fig. 24A).

III.2.6 Oestradiolémie.

L'oestradiolémie est comparable chez les femelles des deux groupes expérimentaux ; elle s'élève très légèrement mais de manière semblable entre 60 et 90 minutes postpartum ; l'oestradiolémie est alors, significativement plus élevée qu'à la naissance. (fig. 24B).

IV DISCUSSION

Le traitement prénatal à la morphine n'a pas affecté la taille des portées ou la répartition entre mâles et femelles au sein des portées ; ces observations sont en accord avec celles de VATHY *et coll.* (1995) qui ont utilisé le même protocole expérimental.

IV.1. Conséquence sur l'activité testiculaire néonatale.

La « crise testiculaire » observée chez les nouveau-nés témoins (de mères injectées de solvant) est similaire à celle des nouveau-nés de mères non traitées (cf. partie précédente) ; l'exposition à la morphine *in-utero* n'altère pas chez ces nouveau-nés l'activation de la fonction gonadique à la naissance. L'existence d'une « crise testiculaire » chez les nouveau-nés mâles exposés à la morphine avant la naissance est parfaitement conforme avec le développement d'un comportement sexuel de type mâle normal, rapporté par VATHY *et coll.* (1985, 1992), lorsque ces animaux ont atteint l'âge adulte. La consommation de drogues opiacées par l'homme a des effets délétères sur sa fonction gonadique (hypogonadisme) ; de tels effets ne sont pas observés ici chez le nouveau-né de rat après exposition *in-utero* à la morphine. Ceci est à priori surprenant puisque, le système opioïde endogène joue un rôle majeur dans la maturation et le contrôle de l'axe gonadotrope du fœtus de rat (*revue in* GENAZZANI *et coll.* 1995) et que la morphine peut atteindre directement le fœtus puisqu'elle diffuse librement au travers du placenta et de la barrière hémato-encéphalique (SANNER et WOODS 1965). En effet, l'injection intrapéritonéale de 20mg/kg de morphine à des rates gestantes induit, après 10 minutes, une élévation de sa concentration plasmatique deux fois plus grande chez le fœtus que chez la mère (BOIKO *et coll.* 1995). Enfin l'exposition prénatale à la morphine perturbe l'ontogenèse de la barrière hémato-encéphalique (BANKS *et coll.* 1996).

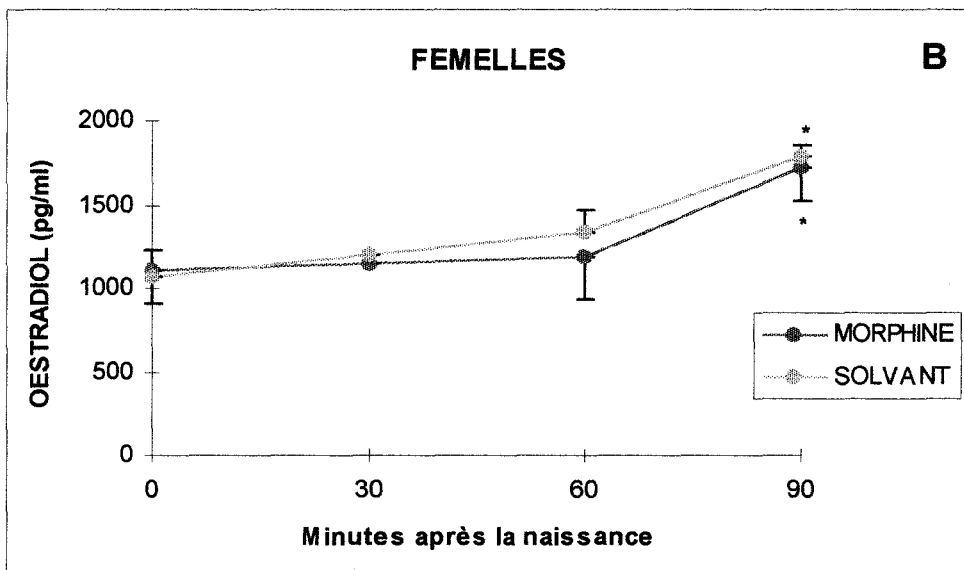
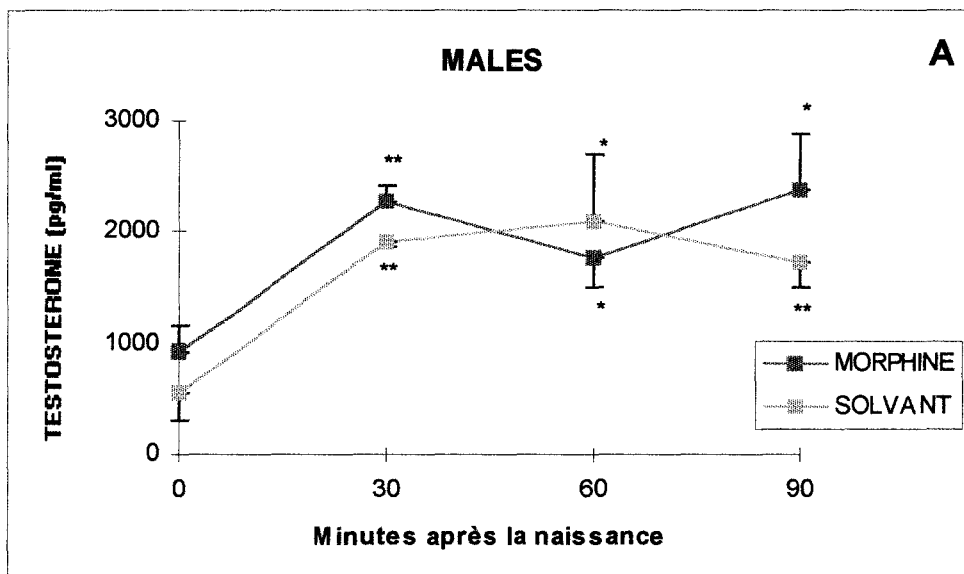


Figure 24 : Evolution postnatale de la testostéronémie chez des nouveau-nés mâles (A) et de l'oestradiolémie chez des nouveau-nés femelles (B) issus de mères injectées de solvant (●■) ou de morphine (●■) durant la gestation.

Moyenne \pm ESM (n=5-9). Analyse statistique :
 - versus temps 0 min. * P<0,05 **<P0,01

L'ensemble de nos données suggèrent donc que la morphine, bien qu'elle soit capable de diffuser du compartiment maternel au comportement foetal ne perturbe pas, tout au moins lorsqu'elle est administrée du 11ème au 18ème jour de sa gestation, l'activation testiculaire néonatale chez le rat. On ignore à ce jour s'il en est de même lorsque l'exposition à la morphine se prolonge jusqu'au terme de la grossesse voire au-delà.

IV.2. Conséquence sur l'oestradiolémie durant la période néonatale.

L'oestradiolémie augmente légèrement mais significativement entre 60 et 90 minutes après la délivrance chez les nouveau-nés femelles des deux groupes expérimentaux (mères injectées de solvant et mères injectées de morphine). Chez des nouveau-nés de mères non traitées, (cf. partie précédente), une augmentation discrète quoique non significative de l'oestradiolémie a été observée au même stade, de la vie extra-utérine. L'exposition prénatale à la morphine ne perturbe donc pas, au cours des premières minutes de la vie extra-utérine, les fonctions gonadiques du nouveau-né femelle.

IV.3. Conséquences sur la masse des surrénales et l'activation surrénalienne néonatale.

Chez les nouveau-nés témoins (mères injectées de solvant), la masse surrénalienne et l'évolution de la corticostéronémie au cours de la période postnatale précoce, sont semblables à celles observées chez les nouveau-nés de mères non traitées, (cf. partie précédente).

Par contre, chez les nouveau-nés des deux sexes l'exposition *in-utero* à la morphine, a deux conséquences majeures, sur la fonction corticotrope, à savoir une sévère atrophie et une hyperactivité des glandes surrénales. L'élévation de la corticostéronémie, signe indubitable d'une activation surrénalienne observée chez les nouveau-nés de mères indemnes ou injectées de solvant, est absente chez ceux dont la mère a été injectée de morphine.

En fin de gestation, le développement pondéral des surrénales et leur activité sont tributaires de l'ACTH adénohypophysaire, dont la synthèse et la sécrétion sont en grande partie sous la dépendance du CRF hypothalamique foetal (DUPOUY et CHATELAIN 1981, COHEN *et coll.* 1983). L'atrophie et l'hypofonctionnement des surrénales observés chez les nouveau-nés exposés à la morphine avant la naissance pourraient donc être associés soit à une défaillance de la production et/ou de la sécrétion d'ACTH durant la période foetale et néonatale, soit à une insensibilité des surrénales à l'action trophique et stéroïdogénique de l'ACTH.

L'atrophie surrénalienne observée chez nos animaux traités évoque celle observée chez le nouveau-né humain de mère consommatrice d'opiacés pendant la grossesse (*revue in* VATHY et KATAY 1992). Bien qu'une action directe de la morphine sur le développement des surrénales foetales ne puisse être écartée, il n'existe pas à notre connaissance de données de la littérature susceptibles de confirmer ou d'infirmer une telle hypothèse. Par contre, il a été montré qu'au niveau du SNC, l'apport d'opiacés durant l'ontogenèse, perturbe la croissance d'éléments nerveux et non-nerveux (*revue in* HAMMER et HAUSER 1992). L'hypothèse d'éventuels effets

d'une exposition prénatale aux opiacés sur la sensibilité des surrénales à l'ACTH, doit être soumise à la vérification expérimentale.

On peut aussi émettre l'hypothèse que la production d'ACTH foetale ait été perturbée par la morphine au cours de l'ontogenèse soit par inhibition directe de l'activité des cellules corticotropes adénohypophysaires par la drogue, soit par inhibition centrale des systèmes impliqués dans le contrôle multifactoriel de la sécrétion d'ACTH (CRF, AVP, NA, 5HT et NPY entre autres). A l'appui de cette dernière hypothèse on peut rappeler que, les systèmes opioïdes endogènes sont particulièrement affectés par un traitement prénatal aux opiacés. En effet, l'administration de morphine ou d'agoniste de type μ à des femelles gestantes diminue le nombre des récepteurs de type μ aux opiacés chez des animaux âgés de 1 à 5 jours (BELCHEVA *et coll.* 1994, TEMPEL 1991), réduit la concentration cérébrale en enképhalines chez des nouveau-nés à terme (TIONG et OLLEY 1988) et perturbe les mécanismes de transcription et de traduction associés à la synthèse des peptides opioïdes endogènes cérébraux chez des nouveau-nés et des rats âgés de 6 jours (TEMPEL *et coll.* 1995 ; ZAGON et McLAUGHLIN 1995).

Les systèmes opioïdes endogènes centraux sont impliqués dans le contrôle multifactoriel de l'activité de l'axe corticotrope aussi bien chez le rat adulte que chez le jeune (*revue in* ADAMSON *et coll.* 1991). La stimulation des récepteurs de type κ stimule l'activité de cet axe chez des rats de 2 jours, alors que celle des récepteurs de type μ ne la stimule que chez des animaux de 5 jours (ADAMSON *et coll.* 1991). On peut donc émettre l'hypothèse que la morphine, administrée au cours de la gestation, par ses effets sur le système nerveux central du fœtus inhiberait la mise en place d'un contrôle activateur exercé par les peptides opioïdes sur l'activité de l'axe corticotrope foetal et néonatal. Cette hypothèse doit faire l'objet d'une vérification expérimentale. Une autre hypothèse peut être émise à savoir que l'atrophie et l'hypoactivité des surrénales néonatales est la conséquence d'une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien du fœtus par la corticostérone provenant de la mère et sécrétée en plus grande quantité par les surrénales de rates injectées de morphine. Cette hypothèse sera testée prochainement (cf. partie IV du présent mémoire). Dans un premier temps, il nous a paru nécessaire d'approfondir nos investigations sur d'autres perturbations susceptibles d'être engendrées par la morphine, au niveau de différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien des nouveau-nés..

IV.4. Conséquences sur le système sérotoninergique.

L'augmentation des contenus hypothalamiques en 5HT (chez les mâles) et en 5HIAA (chez les animaux des deux sexes) durant la période postnatale précoce, et, à un degré moindre chez les témoins (mères injectées de solvant) suggère que la naissance s'accompagne d'une hausse du métabolisme de la 5HT plus importante chez les mâles que chez les femelles. Une élévation du métabolisme de la 5HT a précédemment été observée chez des nouveau-nés de mères non traitées. Néanmoins, l'évolution de ce métabolisme et la différence liée au sexe observées lors de cette étude préliminaire, ne sont pas rigoureusement identiques à celles décrites ici chez les nouveau-nés issus de portées traitées au solvant.

La différence entre ces deux séries d'expériences pourraient être dues aux effets du stress maternel occasionné par l'injection biquotidienne de NaCl 0,9%. En effet,

selon NISHIKOURI (1995) ce type de solvant injecté quotidiennement par voie sous-cutanée à des femelles gravides, du 7ème au 21ème jour de la gestation, s'accompagne chez les nouveau-nés d'une diminution des contenus cérébraux en 5HT et 5HIAA. Ceci pourrait rendre compte de différences observées entre nouveau-nés de mères indemnes et nouveau-nés de mères injectées au solvant.

L'exposition prénatale à la morphine augmente le métabolisme hypothalamique de la 5HT, principalement chez les nouveau-nés femelles. A notre connaissance, peu d'études ont été réalisées quant aux effets des opiacés sur le système sérotoninergique. Les résultats de ces études sont néanmoins assez contradictoires. Selon BARDO *et coll.* (1982) une exposition pré-ou postnatale à la morphine n'affecte pas le contenu cérébral en 5HT, pour d'autres au contraire ce type de traitement inhibe la maturation des neurones sérotoninergiques (*revue in KUHN et coll.* 1992). Cette dernière observation est compatible avec le fait qu'une inhibition du développement de neurones sérotoninergiques foetaux en culture est provoquée par la Leu-enképhaline et que cet effet implique des récepteurs de type μ et/ou κ . (DAVLIA-GARCIA et AZMITIA 1989 ; *in KUHN et coll.* 1992) Ces observations qui méritent d'être confirmées ainsi que les nôtres suggèrent bien que le système sérotoninergique central en général ou hypothalamique en particulier pourrait être une des cibles privilégiées des opiacés au cours de l'ontogénèse. Une perturbation de la morphogénèse des neurones à 5HT par une exposition prénatale à la morphine est hautement probable (*revue in KUHN et coll.* 1992, *revue in HAMMER et HAUSSER* 1992).

IV.5. Conséquences sur le système noradrénergique.

Chez les nouveau-nés témoins de mères injectées de solvant, le métabolisme hypothalamique de la NA demeure stable chez les femelles mais augmente légèrement chez les mâles, 90 min. après la délivrance. Lors de notre étude préliminaire chez des nouveau-nés de mères non traitées, nous avons observé une augmentation de ce métabolisme au cours du temps et un métabolisme plus important chez la femelle que chez le mâle.

Ces différences de résultats pourraient, comme indiqué précédemment à propos de la 5HT être liées aux injections de solvant aux mères. Il a été en effet montré que les systèmes catécholaminergiques centraux sont sensibles au stress maternel durant la gestation (SLOTKIN *et coll.* 1992) et que le métabolisme des catécholamines peut être perturbé chez le nouveau-né par l'injection quotidienne de sérum salé aux femelles gestantes (NISHIKOURI 1995).

L'exposition prénatale à la morphine n'affecte pas le contenu hypothalamique en NA ou le métabolisme de ce neurotransmetteur. Ces résultats sont en accord avec ceux de VATHY *et coll.* (1995) qui ont montré que ce traitement prénatal à la morphine modifie le contenu hypothalamique en NA, seulement à partir du 23ème jour postpartum mais non à des stades plus précoces. Par contre, lorsque ces animaux, prénatalement exposés à la morphine ont atteint l'âge adulte d'importantes modifications du contenu hypothalamique en NA sont observées ; elles sont de plus sexuellement dimorphiques. Ainsi, chez le mâle ce contenu est augmenté de 60% alors que chez la femelle il est diminué de 30% ; quant au métabolisme de la NA dans l'hypothalamus, il est augmenté de 50% chez le mâle mais diminué d'environ 50% chez

la femelle (VATHY *et coll.* 1994). Des expériences sont actuellement conduites au laboratoire pour confirmer ou non ces résultats de l'équipe de VATHY.

La morphine pourrait agir directement sur les neurones en développement, au cours de l'organogénèse prénatale. En effet, chez le fœtus, les opiacés inhibent la synaptogénèse, l'activité des enzymes de biosynthèse de la DA et de la NA et le fonctionnement des récepteurs α -adrénergiques (*revue in* KUHN *et coll.* 1992). Chez l'adulte les opiacés inhibent aussi l'activité des neurones noradrénergiques localisés dans le locus coeruleus (*revue in* VAN BOCKSTAELE *et coll.* 1996).

On peut donc envisager que l'exposition prénatale à la morphine ait des effets à long terme sur le fonctionnement des neurones catécholaminergiques qui innervent en particulier l'hypothalamus. Comme, l'ontogénèse de ces neurones se poursuit jusqu'à des stades tardifs du développement postnatal, il est possible que ces perturbations soient peu ou pas visibles à un stade précoce de la vie extra-utérine, mais qu'elles apparaissent par la suite.

IV.6. Conséquences sur l'évolution du contenu hypothalamique en NPY.

A la naissance, le contenu hypothalamique en NPY chez les nouveau-nés témoins est comparable chez les mâles et les femelles, alors que nous avons noté précédemment un contenu plus élevé chez les mâles de mères non traitées. Chez l'adulte, le NPY est fréquemment colocalisé avec la NA dans les corps cellulaires de neurones et les terminaisons axonales au sein du système nerveux central et périphérique (HOKFELT *et coll.* 1987). Il n'est donc pas surprenant d'observer chez nos animaux, l'absence de dimorphisme sexuel à la fois pour le contenu hypothalamique en NPY et pour celui de la NA. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les différences observées entre les mâles de mères indemnes et les mâles de mères injectées de solvant, pourraient être la conséquence du stress maternel provoqué par les injections répétées de sérum salé.

Durant la période postnatale précoce, le contenu hypothalamique en NPY diminue légèrement chez les nouveau-nés des deux sexes une heure après la délivrance ; l'exposition prénatale à la morphine n'affecte en rien ce contenu et son évolution temporelle. A notre connaissance il n'existe pas d'étude relative aux effets des opiacés *in-utero* sur le système NPYergique. Seule, une étude menée chez le rat adulte a montré que l'administration chronique de morphine provoque une diminution de la concentration en NPY dans l'hypothalamus et dans la médullosurrénale (PAGES *et coll.* 1991).

Au vu des résultats rapportés par VATHY *et coll.* (1992, 1994), concernant le système noradrénergique hypothalamique du rat adulte prénatalement exposé à la morphine, on peut émettre l'hypothèse que le système NPYergique est lui aussi, altéré à long terme. Cette hypothèse est en cours de vérification au laboratoire.

En conclusion, l'exposition prénatale à la morphine induit chez le nouveau-né femelle une augmentation du métabolisme hypothalamique de la 5HT durant la période postnatale précoce et, dans les deux sexes une atrophie et une hypoactivité des surrénales. Cette dernière, caractérisée par l'absence d'augmentation de la sécrétion de corticostérone au cours des minutes qui suivent la délivrance pourrait être, avec l'atrophie des surrénales, le signe d'une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysio-

surrénalien durant la vie foetale. Par contre, la morphine n'a pas affecté chez ces nouveau-nés l'apparition de la « crise testiculaire néonatale » ou le métabolisme hypothalamique de la NA et le contenu de l'hypothalamus en NPY.

TROISIEME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde de la surrénale du rat nouveau-né.

I. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'exposition prénatale à la morphine induit une atrophie et une hypoactivité de la fonction glucocorticoïde des surrénales à la naissance. Notre modèle expérimental permet donc de reproduire l'atrophie surrénalienne observée chez des enfants de mères toxicomanes dont il reste à déterminer les causes. L'objet de ce chapitre est de rechercher si l'exposition prénatale à la morphine affecte aussi la fonction minéralocorticoïde de la surrénale qui se traduit par la synthèse et la sécrétion d'aldostérone.

I.1. La fonction minéralocorticoïde surrénalienne.

Parmi les trois zones, histologiquement distinctes, qui composent le cortex surrénalien, la zone glomérulée est la plus externe et la moins épaisse puisqu'elle se compose d'un petit nombre de cellules. Son importance biologique n'en est pas moins considérable puisqu'elle synthétise et sécrète l'aldostérone principale hormone de régulation de la composition ionique du plasma et secondairement des tissus. L'aldostérone, nommée pour cette raison minéralocorticoïde, est une hormone stéroïdienne dérivée du cholestérol.

Le maintien de l'équilibre hydrominéral du sang est lié à plusieurs hormones dont les deux principales sont l'aldostérone et l'ADH (hormone anti-diurétique). L'aldostérone agit principalement au niveau du rein (réabsorption de sodium et d'eau par les néphrons), mais aussi au niveau du SNC, des épithéliums et de l'intestin.

La sécrétion d'aldostérone obéit à un contrôle multifactoriel, les deux stimuli essentiels sont l'angiotensine II (A II) et une élévation des taux plasmatiques de potassium (K^+). Cependant, bien d'autres substances peuvent stimuler ou inhiber la sécrétion d'aldostérone (Fig. 25) de façon autocrine (production d'A II), paracrine (endothélium vasculaire, tissu médullaire) ou nerveuse (innervation directe).

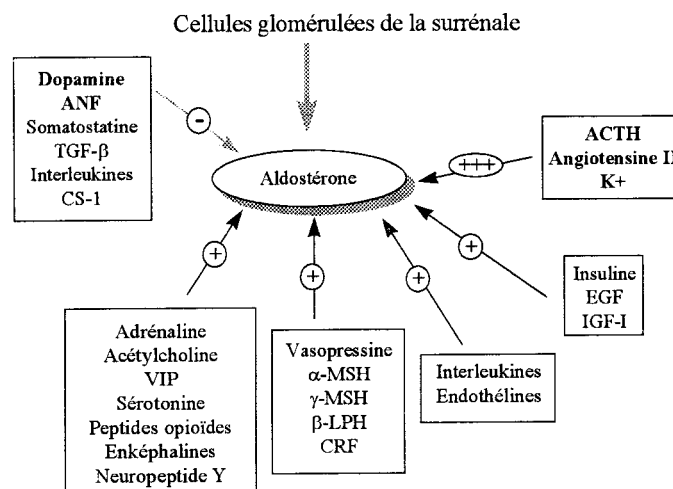


Figure 25 : Les principaux facteurs agissant sur la sécrétion d'aldostérone.

ACTH : hormone corticotrope ; ANF : facteur natriurétique cardiaque ; CRF : facteur de libération de l'hormone corticotrope ; CS : corticostatine ; EGF : facteur de croissance épidermique ; IGF-1 : facteur de croissance insulinique ; K^+ : ion potassium ; LPH, hormone lipotrophique ; MSH : hormone mélanostimulante ; TGF : facteur de croissance transformant ; VIP : peptide intestinal vaso-actif ; D'après Gallo-Payet N. (1993).

1.1.1. Régulation systémique de la sécrétion d'aldostérone.

L'angiotensine II est le principal stimulus physiologique de la sécrétion d'aldostérone ; elle se lie à un récepteur de type AT1, à la surface des cellules glomérulées, et entraîne la production d'inositolphosphates, de diacylglycérol, et la mobilisation de calcium (*revue in* QUINN et WILLIAMS 1992). Bien que l'ion K^+ ne soit pas un stimulus physiologique habituel, les cellules glomérulées sont très sensibles aux variations des concentrations de cet ion dans le milieu extracellulaire (K^+). L'élévation de K^+ , dépoliarise la membrane plasmique, et permet l'ouverture de canaux voltage-dépendants ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une sécrétion d'aldostérone.

Chez le rat, l'ACTH est, *in vitro*, un des plus puissants sécrétagogues connus ; l'AMPc et le calcium agissent en étroite synergie comme médiateurs (DURROUX *et coll.* 1991 ; QUINN et WILLIAMS 1992). Les deux principaux facteurs inhibiteurs de la sécrétion d'aldostérone sont le facteur natriurétique atrial d'origine cardiaque (ANF) et la dopamine (DA). L'ANF diminue la sécrétion d'aldostérone induite par l'ACTH ou l'A II. Son action serait assurée à la fois via une phosphodiesterase sensible au GMPc et via un effet direct sur les canaux calciques (QUINN et WILLIAMS 1992). La DA inhibe la sécrétion d'aldostérone induite par l'A II. Cette action qui s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs de types D_2 , implique une diminution conjointe de la production d'inositolphosphates et de l'influx calcique stimulés par l'A II (GALLO-PAYET *et coll.* 1991). Cependant, les cellules glomérulées possèdent aussi des récepteurs de type D_1 dont l'activation induit la production d'AMPc et la sécrétion d'aldostérone (GALLO-PAYET *et coll.* 1991). En fonction du niveau d'expression de ces deux sous-types de récepteurs à la DA, cette catécholamine pourrait donc inhiber, stimuler ou ne pas affecter la sécrétion d'aldostérone induite par l'A II.

1.1.2. Régulation paracrine et nerveuse de la sécrétion d'aldostérone.

Le cortex surrénalien reçoit une importante innervation sympathique. Les corps cellulaires à l'origine de ces fibres sont localisés soit à l'extérieur de la glande, soit dans la *medulla*.

Selon les travaux de HOLZWARTH *et coll.* (1987) la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale est riche en fibres catécholaminergiques formant une arborisation développée autour des vaisseaux sanguins et des cellules glomérulées. Ces observations morphologiques ont conduit à envisager l'existence d'une régulation paracrine et/ou nerveuse de la sécrétion d'aldostérone. En effet, la plupart des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs agissant sur la sécrétion d'aldostérone ont été identifiés, non seulement dans la *medulla* mais aussi dans les zones corticales de la surrénale. C'est en particulier le cas de la vasopressine, du CRF, des dérivés de la proopiomélanocortine, du VIP, du FGF, de l'ANF, du NPY, de la substance P, de la sérotonine et de la DA (*revue in* GALLOT-PAYET 1993).

La présence de rayons ou d'amas de cellules chromaffines ectopiques à l'intérieur du cortex surrénalien, et plus particulièrement à proximité des cellules de la zone glomérulée, a été démontrée en microscopie photonique et électronique. Ces rayons médullaires contiennent non seulement des cellules chromaffines, mais aussi quelques fibres nerveuses. Cellules chromaffines et fibres nerveuses sont en étroite

contact, avec des cellules stéroïdiennes de la zone glomérulée et la libération de neurotransmetteurs à leur voisinage immédiat a été montrée (BORNSTEIN et EHRHART-BORNSTEIN 1992). Actuellement, on pense que ces rayons médullaires jouent un rôle physiologique important dans le contrôle par la médullosurrénale de la sécrétion des stéroïdes des différentes zones de la corticosurrénale.

La liste précédemment citée des substances agissant sur la sécrétion d'aldostérone n'est pas exhaustive ; parmi les autres substances dont une action est prouvée, figurent : l'IGF 1, l'EGF, des facteurs d'origine vasculaire comme le PDGF ou les endothélines, plusieurs facteurs du système immunitaire comme le TNF et l'interleukine I ou encore des peptides corticostatiques comme en particulier le CS I leucocytaire (*revue in* GALLOT-PAYET 1993).

1.1.3. Régulation autocrine de la sécrétion d'aldostérone.

La zone glomérulée contient tous les composants du système rénine-angiotensine. Les cellules glomérulées synthétisent et sécrètent de la rénine après stimulation par l'ACTH ou élévation de la concentration extracellulaire en K^+ (WANG *et coll.* 1992). La rénine libérée permet la transformation de l'angiotensinogène présent dans la zone glomérulée en A I ; celui-ci est transformé en A II grâce à l'enzyme de conversion également présente dans cette zone de la surrénale. Le taux de production locale d'A II serait suffisant pour assurer un contrôle de la sécrétion d'aldostérone (ODA *et coll.* 1991).

Parmi les facteurs de croissance, le TGF- β (facteur de croissance transformant) est un puissant inhibiteur de la stéroïdogénèse. FEIJE et BAIRD (1992) ont démontré que le TGF- β , produit par les cellules corticosurrénaliennes, agit de façon autocrine/paracrine pour moduler l'action de stimuli locaux ou périphériques.

De même, le FGF (facteur de croissance fibroblastique), produit par les cellules du cortex surrénalien, pourrait agir de manière autocrine/paracrine sur la prolifération cellulaire (SCHWEIGERER *et coll.* 1987).

En guise de conclusion, la figure 26 résume de manière sûrement non exhaustive l'ensemble des facteurs susceptibles de moduler la sécrétion d'aldostérone. Ceux-ci pouvant exercer leurs effets à travers les cellules chromaffines des rayons médullaires, l'innervation médullocorticale, de façon autocrine ou paracrine. La sécrétion de glucocorticoïdes (corticostérone, cortisol) pourrait également être modulée de manière fine par des mécanismes intrinsèques similaires.

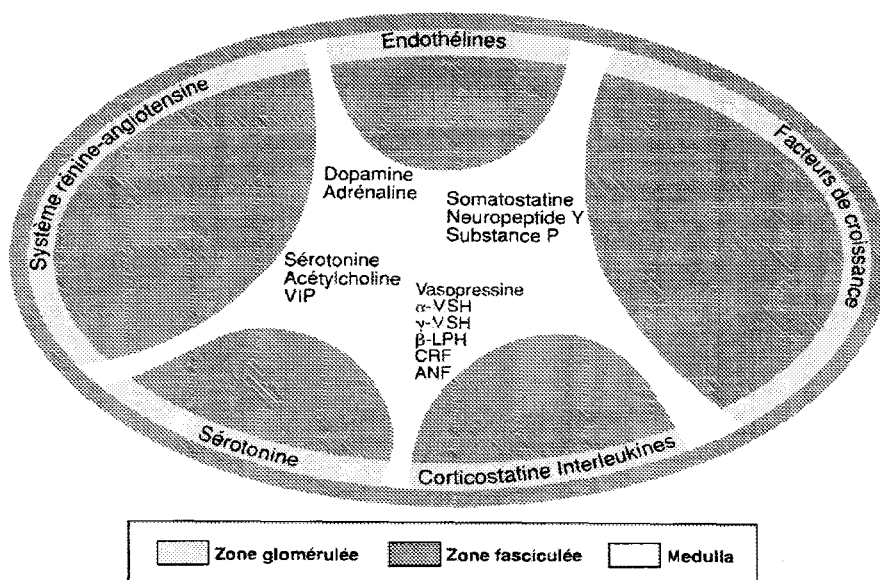


Figure 26 : Régulation intrinsèque de la sécrétion d'aldostérone. D'après GALLOT-PAYET (1993).

I.2. But de l'étude.

L'objectif de la présente étude est de rechercher les conséquences de l'exposition prénatale à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde surrénalienne chez les nouveau-nés de rat,

- en mesurant l'aldostéronémie et la teneur des surrénales en aldostérone, à la délivrance et 90 min. plus tard.
- en déterminant la kaliémie et la natrémie des nouveau-nés et de leurs mères à la délivrance.

En ce qui concerne la fonction minéralocorticoïde des surrénales des nouveau-nés l'objectif a été de tester *in-vitro*, la sécrétion d'aldostérone par ces glandes en réponse à l'ACTH et à l'A II

II. MATERIEL ET METHODES.

II.1 Animaux, traitements, prélèvements et stockage des échantillons.

Les expériences ont été réalisées sur des rats de souche WISTAR, élevés dans les mêmes conditions que précédemment décrites dans la 1ère partie. De même, la reproduction de ces animaux et les traitements auxquels ils ont été soumis sont identiques à ceux décrits dans la 2ème partie.

Au terme de la gestation (E 21), le sang des mères est collecté après décapitation et les nouveau-nés sont prélevés par césarienne puis sacrifiés immédiatement ou 90 min. plus tard.

Sur chaque nouveau-né, on a prélevé le sang et les surrénales. Le sang est centrifugé à 3.500g durant 15 min. à 4°C ; le plasma est réparti en fractions aliquotes rapidement congelées à - 30°C pour les dosages d'aldostérone, et la mesure des concentrations en Na⁺ et K⁺.

Les surrénales des nouveau-nés utilisées pour la détermination du contenu surrénalien en aldostérone sont broyées dans 500 µl de NaCl 0,9% à 4°C. Après centrifugation (14 000 rpm à 4°C durant 20 min.), le surnageant est congelé à -30°C jusqu'au jour du dosage.

Pour les études *in-vitro*, les surrénales de nouveau-nés sont prélevées à la naissance.

II.2. Etudes *in-vitro*.

Les surrénales des nouveau-nés sont incubées sous agitation dans 1ml d'une solution Krebs-Ringer, bicarbonates, à pH 7,4 ; contenant 0,2% (w/v) de glucose et 0,2% (w/v) de BSA, maintenue à 37°C, dans une atmosphère à 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Après une période de préincubation de 1 heure, le milieu est remplacé par 1ml de milieu frais (témoins) contenant soit de l'ACTH₁₋₂₄ (Ciba-Geigy, France) à des concentrations variables de 10⁻¹⁰ à 10⁻⁶ M, soit de l'angiotensine II (Sigma) à des concentrations variables de 10⁻¹¹ à 10⁻⁶ M. A la fin de la période d'incubation (1 heure à 37°C, sous atmosphère 95% O₂/5% CO₂), des fractions aliquotes sont congelées à - 30°C jusqu'au jour du dosage de l'aldostérone.

II.3. Détermination des concentrations plasmatiques en Na⁺ et K⁺.

Les concentrations des plasmas en sodium et en potassium ont été déterminées par spectrométrie de flamme (IL 543, Instrumentation laboratory, Milan, Italie)

II.4. Dosage radioimmunologique de l'aldostérone.

Le dosage de l'aldostérone dans le milieu d'incubation (études *in-vitro*) est réalisé sans extraction préalable.

a) Extraction.

Le protocole d'extraction de l'aldostérone tissulaire est comparable à celui décrit précédemment pour les stéroïdes du plasma (cf. 1ère Partie). Le rendement d'extraction est ≥ à 95%.

b) Réactifs du dosage.

Le tampon utilisé pour la remise en suspension du résidu sec d'extraction et le dosage radioimmunologique est du tampon borate 0,05 M, pH 7,8 (Solution A : HCl 0,05 M ; Solution B : Na₂B₄O₇, 10H₂O 0,05 M ; mélangées dans les proportions 45,75 A/ 54,25 B, le pH est ajusté à 7,8 par quelques gouttes de HCl 1 N) additionné de BSA (0,1%). Le standard de référence est l'aldostérone (Sigma) et le traceur de l'aldostérone [1,2,6,7]³H (Amersham) dont la RAS est de 72,1 Ci/mmol ; le traceur est stocké à -20°C dans de l'éthanol absolu. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin, anti-aldostérone conjugué à la BSA (Sigma). Il a été couramment utilisé à la

dilution finale de 1/4000ème. Le volume final d'incubation qui est de 500 µl comprend 300 µl de tampon, 100 µl de la solution standard d'aldostérone (gamme de 0,975 pg à 2000 pg/tube) ou 100 µl de l'échantillon, 100 µl d'une solution d'aldostérone ³H et 100 µl d'immunsérum.

c) Séparation.

Après une incubation de 16 heures à 4°C, les complexes aldostérone /anticorps sont séparés de l'aldostérone libre selon un protocole comparable à celui décrit pour la corticostérone, à ceci près que le tampon utilisé pour la préparation du milieu de séparation est différent.

d) Caractéristiques du dosage.

Le pourcentage de liaison de l'aldostérone ³H en absence de compétition avec l'aldostérone froide est de 29% (n=25). Le pourcentage de réaction croisée est de 100% avec l'aldostérone, de 0,03% avec la 11 α hydroxy-progestérone, de 0,0017% avec la 18 hydroxy-corticostérone, de 0,0002% avec la déoxycorticostérone, la corticostérone, l'hydrocortisone, le 21 déoxycortisol, la progestérone et la testostérone, de 0,00007% avec le 11 déoxycortisol et moins de 0,00001% avec la pregnénolone, la 17 hydroxy-progestérone et la déhydroépiandrosterone. La variabilité intra-dosage est de 4% (n=15) et inter-dosage de 12% (n=5).

II.5. Analyse statistique.

De même que précédemment, une analyse de variance (ANOVA) à voie multiple a été utilisée suivie du test de Dunnet. Le degré de signification est fixe à $P \leq 0,05$.

III. RESULTATS.

III.1. Animaux étudiés

Cette étude porte sur 16 portées, 8 femelles gravides ont été injectées de solvant et 8 de morphine du 11ème au 18ème jour de la gestation. Chaque portée comprend 8 à 12 foetus, ceux-ci ont été prélevés à terme par césarienne puis sacrifiés selon le protocole décrit précédemment.

Pour chacun des paramètres étudiés, un nombre restreint de nouveau-nés a été utilisé par portée afin de diminuer au maximum les variations physiologiques susceptibles d'exister d'une portée à l'autre.

Les résultats concernant les nouveau-nés mâles et femelles ont été confondus puisque nous n'avons pas observé de différences liées au sexe pour l'ensemble des paramètres étudiés.

III.2. Effets de l'exposition prénatale à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde surrénalienne du rat nouveau-né.

Les surrénales des nouveau-nés exposés à la morphine sont significativement atrophiées par rapport à celles des animaux témoins (versus M : $2,47 \pm 0,09$ mg ; S : $3,52 \pm 0,16$ mg ; $P < 0,001$).

III.2.1. Aldostérone plasmatique et surrénalienne au cours de la période postnatale précoce.

A la naissance, l'aldostéronémie (Fig. 27A) ainsi que le contenu surrénalien en aldostérone (Fig. 27B) chez les nouveau-nés exposés à la morphine sont très significativement augmentés par rapport à ceux des animaux témoins de mères exposées au solvant. Ces deux paramètres ne sont pas significativement modifiés 90 min. après la naissance chez les nouveau-nés exposés à la morphine alors qu'ils s'élèvent significativement chez ceux exposés au solvant (Fig. 27A/B). Une heure et demie après la délivrance aldostéronémie et contenu des surrénales en aldostérone sont comparables dans les deux groupes expérimentaux (Fig. 27A/B).

III.2.2. Natrémie et kaliémie.

L'exposition prénatale à la morphine n'affecte pas significativement la natrémie des nouveau-nés à la naissance ou celle de leurs mères (Tableau 1). Par contre, une légère mais significative augmentation de la kaliémie est notée chez les nouveau-nés exposés à la morphine, mais non chez leurs mères (Tableau 1).

Néanmoins, le rapport Na^+/K^+ est comparable chez les nouveau-nés et leurs mères quel que soit le traitement subi avant la naissance (Tableau 1).

III.2.3. Sécrétion d'aldostérone par les surrénales in-vitro.

III.2.3.1. En réponse à l'ACTH₁₋₂₄.

La quantité d'aldostérone sécrétée par les surrénales des animaux des deux groupes expérimentaux est comparable en absence de sécrétagogue (Fig. 28A). Les surrénales des nouveau-nés de mères exposées au solvant répondent de manière dose-dépendante à l'ACTH₁₋₂₄ pour des doses comprises entre 10^{-8} à 10^{-6} M alors que celles de nouveau-nés de mères traitées à la morphine ne répondent pas à ce sécrétagogue pour des doses comprises entre 10^{-10} à 10^{-6} M (Fig. 28A).

La réponse à l'ACTH₁₋₂₄ est significativement différente entre les deux groupes expérimentaux pour les concentrations les plus élevées de ce peptide (10^{-7} à 10^{-6} M) (Fig. 28A).

III.2.3.2. En réponse à l'angiotensine II.

L'angiotensine II stimule de manière dose-dépendante la sécrétion d'aldostérone par les surrénales des nouveau-nés témoins à des concentrations comprises entre 10^{-11} et 10^{-10} M ; à cette concentration et au-delà, l'effet maximum est atteint (Fig. 28B). Par contre, les surrénales des animaux exposés à la morphine ne répondent pas à l'A II, quelle que soit la dose utilisée (de 10^{-11} à 10^{-6} M) (Fig. 28B). La différence de réponse entre les deux groupes expérimentaux est significative pour les concentrations d'A II comprises entre 10^{-10} et 10^{-6} M (Fig. 28B).

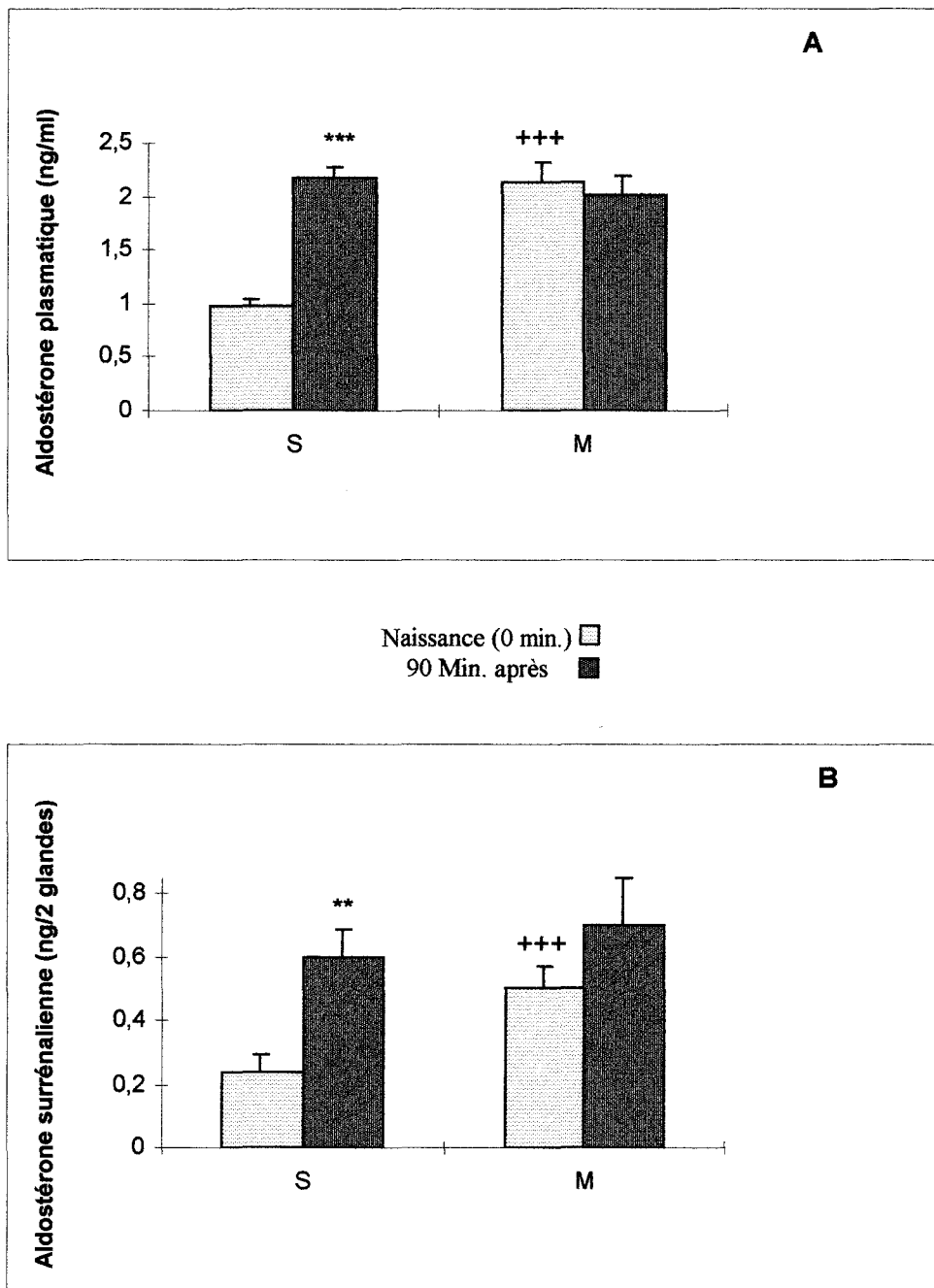


Figure 27: Aldostéronémie (A) et contenu surrénalien en aldostérone (B), à la naissance (□) et 90 minutes après (■) chez des nouveau-nés de mères traitées au solvant (S) ou à la morphine (M) au cours de la gestation.

Moyennes \pm ESM (n=13-17). Analyse statistique :

- Versus naissance : ** P<0,01 *** P<0,001
- morphine vs solvant à la naissance +++ P<0,001

Traitement maternel	Nouveau-nés		Mères	
	Solvant	Morphine	Solvant	Morphine
Na ⁺ (mEq/l)	151,4 ± 5,9	155,8 ± 9,4	128,3 ± 14,5	125,4 ± 19,5
K ⁺ (mEq/l)	9,00 ± 0,22	9,67 ± 0,14 *	8,32 ± 0,20	8,62 ± 0,28
Na ⁺ /K ⁺	16,67 ± 0,68	16,25 ± 0,75	15,53 ± 1,80	14,71 ± 2,42

Tableau 1 : Effets de l'exposition prénatale à la morphine sur les concentrations plasmatiques en sodium (Na⁺) et potassium (K⁺) chez des nouveau-nés (NN) à terme et chez leurs mères traitées à la morphine ou au solvant durant la gestation..

Moyennes ± ESM (n=7-10). Analyse statistique :

- NN morphine versus NN solvant : * P<0,05

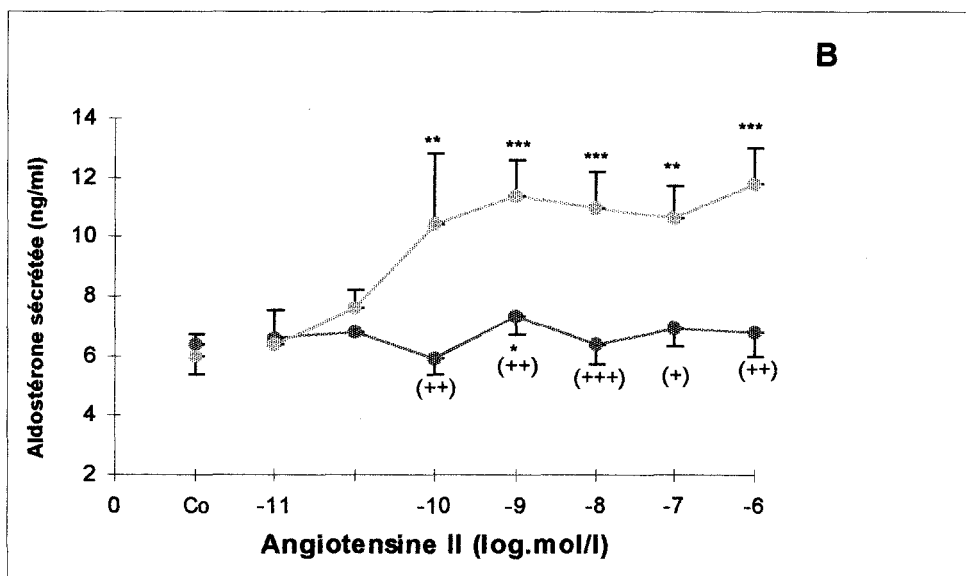
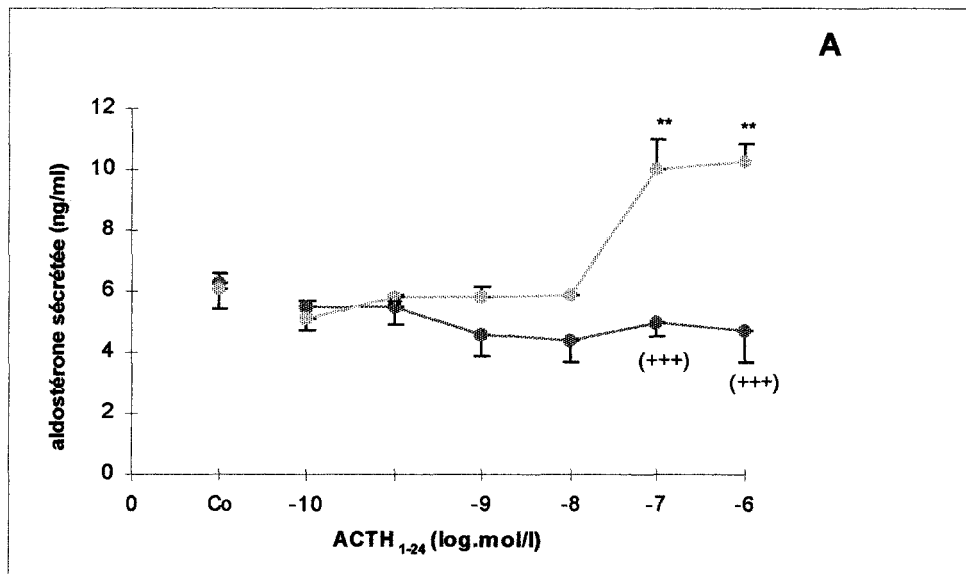


Figure 28 : A : Effet de l'ACTH₁₋₂₄ sur la sécrétion *in-vitro* d'aldostérone par des surrénales de rats nouveau-nés issus de mères injectées de solvant (○) ou de morphine (●) durant la gestation.

B : Effet de l'angiotensine II sur la sécrétion *in-vitro* d'aldostérone par des surrénales de nouveau-nés des deux groupes expérimentaux.

Co = Contrôles absence de sécrétagogue. Moyennes ± ESM (nombre de glandes par concentration testée, n=7-31)

Analyse statistique : - morphine vs solvant (+) P<0,05 (++) P<0,01 (+++) P<0,001
- vs contrôles . * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

IV DISCUSSION

Contrairement à la fonction glucocorticoïde, la fonction minéralocorticoïde de la surrénale des nouveau-nés exposés à la morphine avant la naissance est fortement stimulée, puisqu'on assiste à la fois à une élévation de l'aldostéronémie néonatale et à une forte augmentation du contenu surrénalien en aldostérone en dépit d'une atrophie de la glande.

Une si importante activation de la fonction minéralocorticoïde, suite à une exposition à la morphine *in-utéro*, peut avoir plusieurs causes. La morphine qui, est capable de traverser le placenta et d'atteindre le fœtus (SANNER et WOODS 1965, BOIKO *et coll.* 1995), pourrait agir directement sur la surrénale foetale puisque chez l'adulte, cet opiacé est capable de stimuler la sécrétion d'aldostérone via sa liaison à des récepteurs de type μ présents à la surface des cellules glomérulées de la surrénale (KAPAS *et coll.* 1995). Il convient néanmoins de signaler que les données de la littérature relatives à l'action des opiacés sur la synthèse et la sécrétion d'aldostérone sont très disparates (*revue in* TOTH et HINSON 1995). De plus, dans notre modèle d'étude *in-vitro*, quelques tests préliminaires ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet direct de la morphine sur la sécrétion d'aldostérone par des surrénales de nouveau-nés de mères indemnes, c'est à dire non traitées par la morphine ou le solvant. Un effet indirect de la morphine paraît donc plus probable qu'un effet direct pour expliquer l'hyperactivité de la fonction minéralocorticoïde de la surrénale observée dans nos conditions expérimentales. En particulier, on peut envisager une perturbation du contrôle multifactoriel de la production d'aldostérone suite à l'exposition à la morphine.

Malheureusement, les facteurs susceptibles d'être mis en cause sont légions (cf. Introduction). Chez le rat de 7 jours, la sécrétion d'aldostérone *in-vitro* est, comme celle de l'adulte, stimulable par l'ACTH, l'AII et une augmentation de la concentration extracellulaire en potassium (PHILBRICK-FEULLAN et AGUILERA 1996). Or, d'après nos expériences ni l'ACTH, ni l'AII ne sont capables d'accroître la sécrétion d'aldostérone par les surrénales de nouveau-nés exposés à la morphine ce qui n'est pas le cas avec les surrénales d'animaux témoins de mères traitées au solvant. La présence de morphine au cours du développement pourrait avoir perturbé le développement des récepteurs des cellules glomérulées à l'ACTH et à l'AII, ce qui reste à vérifier, et/ou les mécanismes de transduction du signal de ces hormones. Cependant, tout ceci n'explique pas l'importante augmentation de la production et de la sécrétion d'aldostérone par ces surrénales par ailleurs atrophiées. De plus, bien que le taux plasmatique en K^+ soit augmenté à la naissance, chez les nouveau-nés exposés *in-utéro* à la morphine, le ratio Na^+/K^+ reste inchangé. Ces données suggèrent que les concentrations ioniques du plasma bien que légèrement modifiées, ne peuvent expliquer les conséquences de l'exposition à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde du rat nouveau-né.

Les opiacés stimulent chez l'adulte, via une action centrale sur le système nerveux, la sécrétion de catécholamines par la surrénale (APPEL *et coll.* 1986). Par ailleurs, noradrénaline et adrénaline stimulent *in-vitro* la sécrétion d'aldostérone par des cellules glomérulées isolées, via la mise en jeu de récepteurs α - et/ou β -adrénergiques (HORIUCHI *et coll.* 1987). On peut donc envisager que la morphine puisse activer la fonction minéralocorticoïde de la surrénale foetale et néonatale via les catécholamines

de la médullosurrénale ou celles associées à l'innervation de la zone capsulo-glomérulaire maternelle et/ou foetale. Une telle hypothèse doit être soumise à une vérification expérimentale.

Enfin, de nombreux neuropeptides, tels que le NPY et/ou le VIP, colocalisés avec les catécholamines au sein de fibres nerveuses innervant le cortex surrénalien (*revue in* TOTH et HINSON 1995) pourraient être impliqués dans l'activation de la fonction minéralocorticoïde. En effet, le NPY et le VIP stimulent la sécrétion d'aldostérone par des zones capsulo-glomérulaires de surrénales adultes isolées, via des mécanismes complexes impliquant les catécholamines et des récepteurs β_1 adrénergiques (BERNET *et coll.* 1994 a,b). Au cours du développement, le NPY est bien colocalisé avec des catécholamines au sein de cellules chromaffines et de fibres innervant le cortex surrénalien du rat dès le 15ème ou le 16ème jour de gestation (MAUBERT 1993). Dès lors, bien que les effets stéroïdogéniques du NPY, du VIP et des catécholamines restent à prouver, chez le foetus, tout comme les effets de la morphine sur la sécrétion de ces neuropeptides, on peut émettre l'hypothèse que les effets de l'exposition prénatale à la morphine, sur la production d'aldostérone, résultent d'une sécrétion de catécholamines et/ou de neuropeptides associés. Cette hypothèse mérite aussi d'être vérifiée.

Les effets stimulants de la morphine sur la fonction minéralocorticoïde de la surrénale pourraient aussi résulter d'une diminution de la production d'inhibiteurs de la biosynthèse d'aldostérone tels que la somatostatine, la dopamine ou l'ANF, et/ou d'une insensibilité de la zone glomérulée à ces inhibiteurs potentiels. L'injection de morphine chez le rat adulte stimule fortement la sécrétion d'ANF (LAULIN et BRUDIEUX 1990), mais celui-ci, ne traverse pas la barrière placentaire (DELOOF *et coll.* 1995). D'après nos résultats, l'ANF nous paraît donc devoir être exclu de la liste des facteurs inhibiteurs de la production d'aldostérone dont la sécrétion pourrait être réduite par la morphine puisque celle-ci stimule plus probablement sa sécrétion, tel qu'il l'a été rapporté chez l'adulte.

A ce stade de l'expérimentation, on ignore encore si la morphine affecte chez le foetus la sécrétion d'ANF et/ou la population des récepteurs surrénaux à ce peptide régulateur de la sécrétion d'aldostérone.

En conclusion, nous avons montré que l'exposition prénatale à la morphine induit une atrophie surrénalienne à la naissance. Cependant, la fonction minéralocorticoïde surrénalienne des nouveau-nés est fortement stimulée comme en témoignent l'élévation de l'aldostéronémie et du contenu de la surrénale en aldostérone ; bien que les surrénales de ces nouveau-nés ne répondent pas à l'ACTH et à l'AIII puissants stimulants de la fonction minéralocorticoïde. La cause de l'activation de cette fonction surrénalienne demeure à déterminer.

QUATRIEME PARTIE

Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur l'axe corticotrope et la CBG plasmatique du rat nouveau-né.

I. BUT DE L'ETUDE

Dans la 2ème partie, nous avons émis l'hypothèse que l'exposition à la morphine *in-utéro* pourrait avoir inhibé le fonctionnement de l'axe corticotrope au cours de la vie foetale et néonatale. Aussi, pour déterminer quelle est la cause de l'atrophie des surrénales et de l'hypoactivité de la fonction glucocorticoïde chez les nouveau-nés nous avons testé, chez ceux-ci :

- 1) - Les réponses *in-vitro* des surrénales à l'ACTH et des adénohypophyses au CRF.
- 2) - Le contenu de leur adénohypophyse en ARNm de la POMC, - les contenus de leur hypothalamus en CRF et en ARNm de ce neuropeptide, et puis plus spécifiquement, par hybridation *in situ*, les ARNm du CRF dans le NPV.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé si la morphine affecte également le développement du foie foetal, et son fonctionnement apprécié dans le contexte de notre étude par les taux plasmatiques de CBG, protéine liant la corticostérone.

II. MATERIEL ET METHODES.

II.1 Animaux, traitements, prélèvements et stockage des échantillons.

Les expériences ont été réalisées sur des rats de souche WISTAR, élevés dans les mêmes conditions que précédemment décrites (dans la 1ère partie). De même, la reproduction de ces animaux et les traitements auxquels ils ont été soumis sont identiques à ceux décrits dans la 2ème partie.

Au terme de la gestation (E 21), le sang des mères est collecté après décapitation et les nouveau-nés sont prélevés par césarienne puis sacrifiés immédiatement ou 90 min. plus tard.

Sur chaque nouveau-né, on a prélevé le sang, les surrénales, l'hypothalamus, le foie et les adénohypophyses. Le sang est centrifugé à 3.500g durant 15 min. à 4°C, le plasma est réparti en fractions aliquotes rapidement congelées à - 30°C pour le dosage de la CBG.

Pour les études *in-vitro*, les surrénales et les adénohypophyses de nouveau-nés sont prélevées à la naissance. Les hypothalamus destinés au dosage du CRF ou à l'étude par Northern blot des ARN messagers du CRF sont prélevés et immédiatement, congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à - 80°C.

Pour les études des ARNm du CRF et de la POMC par hybridation *in-situ*, les têtes entières des nouveau-nés décapités à la naissance, sont rapidement congelées sur de la carboglace puis conservées à -80°C.

II.2. Etudes *in-vitro*.

Les surrénales des nouveau-nés sont incubées sous agitation dans 1ml d'une solution Krebs-Ringer, bicarbonates à pH 7,4 ; contenant 0,2% (w/v) de glucose et 0,2% (w/v) de BSA, maintenue à 37°C, dans une atmosphère à 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Après une période de préincubation de 1 heure, le milieu est remplacé par 1ml de milieu frais (témoins) ou de milieu contenant de l'ACTH₁₋₂₄ (Ciba-Geigy, France) à des concentrations variables de 10⁻¹⁰ à 10⁻⁶ M. A la fin de la période d'incubation (1 heure à 37°C, sous atmosphère 95% O₂/5% CO₂), des fractions aliquotes sont congelées à -30°C jusqu'au jour du dosage de la corticostérone.

Les adénohypophyses sont préincubées de la même manière dans 1ml de milieu Krebs-Ringer bicarbonate comme indiqué ci-dessus auquel on a ajouté 0,006% d'acide ascorbique. Après 1 heure, le milieu est remplacé par 1ml de milieu frais (témoins) ou de milieu contenant du CRF (CRH humain/rat, UCB Bioproducts, Belgium) à des concentrations variables de 0,25 à 100 nM. A la fin de la période d'incubation (1 heure à 37°C), des fractions aliquotes du milieu sont prélevées, mélangées avec un inhibiteur de protéases (INIPROL, Choay Laboratories, France) et congelées à -30°C jusqu'au jour du dosage de l'ACTH.

II.3. Hybridation *in-situ*.

II.3.1. Coupe des tissus.

Les têtes sont coupées à l'aide d'un cryostat (Microm) à -20°C. Nous avons pratiqué des coupes frontales de 12 µm d'épaisseur passant par les noyaux paraventriculaires (NPV) et l'éminence médiane au niveau de l'hypothalamus et par l'adénohypophyse au niveau hypophysaire.

Les coupes sont recueillies sur des lames préalablement recouvertes de gélatine et d'alun de chrome (2,5 g de gélatine et 250 mg d'alun de chrome pour 1 litre d'eau bidistillée). Les lames sont ensuite séchées à 37°C pendant une minute sur une plaque chauffante puis conservées à -80°C jusqu'au traitement approprié pour l'hybridation *in situ*.

II.3.2. Les sondes d'hybridation.

II.3.2.1. Nature des sondes

- La sonde CRF est un oligonucléotide de 48 bases, complémentaire des bases 496-543 de l'ARNm du CRF de rat. Sa séquence est la suivante :

3' CAG TTT CCT GTT GCT GTG AGC TTG

CTG AGC TAA CTG CTC TGC CCT GGC 5'

Les bases G+C représentent 56% du total des bases.

- La sonde POMC est un oligonucléotide de 48 bases, complémentaire des bases 349-396 de l'ARNm de la POMC de rat. Sa séquence est la suivante :

3' GCG AGG ATG AGG TAC CTC GTG AAG

GCG ACC CCG TTC GGC CAC CCG TTC 5'

Les bases G+C représentent 66% du total des bases.

La spécificité de ces sondes a été précédemment étudiée par GRINO *et coll.* (1995)

II.3.2.2. Marquage des sondes

Une petite quantité d'oligonucléotide (80 ng dans 1 μ l) de chacune des sondes (solution mère à 80 μ g/ml) est marquée par addition à l'extrémité 3' de résidus α^{35} -S-dAPT (1300 Ci/mmole ; NEN, les Ullis) en utilisant un kit de marquage du commerce (3'-end labelling kit ; NEN-100, NEN). La réaction de marquage est réalisée à 37°C durant 5 min. Un volume approprié de phénol-chloroforme-isoamylalcool (50/49/1) est ajouté ; le tube est ensuite agité au vortex et enfin centrifugé 5 min. à 15 000g. La phase aqueuse est récupérée, additionnée de 150 μ l d'une solution d'acétate d'ammonium 7,5 M et de 900 μ l d'éthanol, avant d'être placée à -70°C pendant 30 min. Le tube est ensuite centrifugé pendant 30 min. à 15 000g et à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et dilué dans 50 μ l d'eau auquel on ajoute 1 μ l d'une solution de Dithiothreitol (DTT) 1M. La radioactivité de 1 μ l de cette solution est mesurée par un compteur à scintillation. L'activité spécifique des sondes est d'environ 5000 Ci/mmole. Les sondes marquées sont conservées à -70°C.

II.3.3. Réalisation de l'hybridation in-situ.

II.3.3.1. Prétraitement

Les lames de verre gélatinées portant les coupes à congélation sont placées à -20°C pendant 1 heure puis les coupes sont décongelées 10 min à température ambiante. Elles sont fixées 5 min. dans une solution à 4% de formaldéhyde dans du PBS (tampon phosphate salin 0,1M pH 7,4 contenant : 11,47 g de Na_2HPO_4 ; 2,30 g de NaH_2PO_4 ; 9 g de NaCl par litre), rincées deux fois dans le PBS, puis incubées 10 min. dans une solution de triéthanolamine additionnée de 0,25% d'anhydride acétique. Les coupes sont ensuite déshydratées et délipidées par passages successifs dans de l'éthanol et du chloroforme (éthanol 70% : 1 min. ; 80% : 1 min. ; 95% : 2 min. ; 100% : 1 min. ; chloroforme : 5 min. puis éthanol 100% : 1 min. ; éthanol 95% 1 min.). Les lames sont placées verticalement sur un portoir et séchées à température ambiante.

II.3.3.2. Hybridation

Chaque coupe est recouverte de 35 μ l de tampon d'hybridation (composé de SSC 4X (SSC 1X représente une solution de NaCl 0,15 M et de citrate de sodium 0,015 M, pH 7,2), 50% (v/v) de formamide, 10% (w/v) de sulfate de dextran, 50 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon (préalablement dénaturé par ébullition), 25 μ g/ml d'ARNt de levure, 100 μ g/ml d'albumine sérique de boeuf, 100 μ g/ml de polyvinylpyrrolidone, 100 μ g/ml de Ficoll 400, 100 mM DTT) contenant 1×10^6 dpm de sonde radioactive. Certaines lames ont été hybridées avec une sonde radioactive seule, d'autres avec la sonde non radioactive seule, d'autres enfin avec les deux types de sonde. Les coupes sont recouvertes d'un carré de parafilm et incubées pendant 24 h à 37°C dans une chambre humide.

II.3.3.3. Lavages

Les lames sont plongées dans une solution de SSC 1X afin de décoller le parafilm, rincées 4 fois dans une solution de SSC 1X, puis lavées 4 fois 15 min. dans une solution de SSC 4X, 50% formamide à 40°C, puis 30 min. dans une solution de SSC 1X à température ambiante (2 fois pour les coupes hybridées avec une sonde radioactive, une seule fois pour les autres).

II.3.3.4. Révélation du signal radioactif

Les lames sont placées tout contre un film d'autoradiographie (X-OMAT AR5, Kodak) pendant 2 semaines (pour l'hybridation CRF) ou 3h (pour l'hybridation POMC) à température ambiante. L'analyse des films par mesure de densité optique permet la quantification des signaux obtenus. Pour les illustrations photographiques de ces signaux, les lames sont ensuite recouvertes de parlodion (3% dans l'acétate d'isoamyle) puis séchées. Cette étape permet d'éviter une interaction chimique entre le chromogène et l'émulsion autoradiographique. Les lames sont ensuite trempées dans de l'émulsion photographique liquide (Ilford K5, diluée au demi dans l'eau). Elles sont mises à sécher 24h à température ambiante, avant d'être rangées dans des boîtes hermétiquement closes contenant du silicagel, placées à 4°C. Après une exposition de 4 semaines (pour l'hybridation CRF) ou de 1jour (pour l'hybridation POMC), les lames sont développées à 17°C pendant 2 min. 30 dans du Dektol dilué au demi, rincées et fixées 5 min. dans de l'Unifix.

II.3.4. Quantification du signal.

La quantification des signaux a été effectuée à l'aide d'un système d'analyse d'images informatisé (Biocom 200, Biocom, Les Ullis).

Une courbe étalon a été préalablement établie à l'aide des standards de radioactivité, obtenus en déposant sur des lames gélatinées des coupes de pâte de cerveau de rat contenant des quantités croissantes de ³⁵S. La relation entre la densité optique du signal présent sur le film et la quantité de radioactivité présente dans les standards est calculée. Les signaux présents au niveau des NPV sont mesurés, puis convertis en copies de sonde/μm³ de tissu selon la méthode décrite par YOUNG *et coll.* (1986). Quatre sections par animal ont été mesurées. Les valeurs moyennes de chaque animal ont été comparées.

II.4. Analyse par Northern blot des ARNm du CRF hypothalamique.

II.4.1. Extraction et mesure de la concentration en ARN totaux.

Les solutions préparées sont toutes filtrées et autoclavées.

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode de CHOMCZYNSKI et SACCHI (1987).

Environ 40 mg de tissu (3 hypothalamus de nouveau-nés) sont broyés dans un potter stérile avec 700 μl de solution DMCE (contenant 4M de guanidine, 0,025 M de citrate de sodium, 0,5% de sarcosyl et 0,0072% de β-mercaptoéthanol ajouté au dernier moment). L'axe du potter est rincé soigneusement entre les broyages avec de l'eau contenant du DEPC (diéthylpyrocarbonate : 500 μl par litre d'eau).

A chaque échantillon sont ajoutés successivement :

- 70 μ l d'une solution d'acétate de sodium 2M, pH 4,1
- 140 μ l d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (49 : 1)
- 700 μ l de phénol saturé en eau.

Les échantillons sont agités vigoureusement au Vortex pendant 2 min. puis maintenus 15 min. dans la glace. Après une centrifugation de 35 min. à 12000 t/min. à 4°C, la phase aqueuse supérieure contenant les ARN en solution est soigneusement séparée de la phase organique et d'une interface contenant l'ADN et les protéines.

Les ARN sont alors précipités par adjonction à la phase aqueuse de 1ml d'isopropanol à -20°C, suivie d'une incubation toute une nuit à -20°C. Après centrifugation 35 min. à 12000 t/min. et à 4°C, les culots contenant les ARN sont solubilisés par 0,3 ml de solution DMCE et 0,3 ml d'isopropanol. Après agitation au Vortex, les tubes sont placés à -20°C durant 2 heures.

Afin de quantifier les ARN contenus dans les échantillons, les culots obtenus après centrifugation (35 min. à 12000 t/min.) sont lavés par 400 μ l d'éthanol à 75% et conservés à -20°C. Après recentrifugation durant 10 min ; les culots sont asséchés par évaporation au Speed Vac durant 5 min. avant d'être solubilisés par apport de 100 μ l d'eau DEPC, puis agités au Vortex durant 2 min. ils sont ensuite placés à 65°C pendant 5 min. avant de subir une nouvelle agitation pendant 1 min. Un volume approprié (10 μ l) de chaque extrait est alors dilué avec 990 μ l d'eau DEPC ; un volume adéquat de ce mélange est introduit dans la microcuve d'un spectrophotomètre afin de mesurer l'absorbance (DO) à 260 nm (A_{260}) et à 280 nm (A_{280}).

Sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 40 μ g/ml d'ARN, la concentration en ARN de chaque extrait est obtenue par simple calcul.

La qualité des extraits est vérifiée par la mesure du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm qui doit être compris entre 1,8 et 2.

A partir des extraits, des fractions aliquotes contenant 20 μ g d'ARN sont préparées, asséchées puis reconstituées dans 5 μ l de solution de formamide désionisée, avant d'être stockées à -20°C.

II.4.2. Séparation des ARN totaux par électrophorèse et transfert sur membrane.

II.4.2.1. Préparation des échantillons

Après décongélation des fractions de 20 μ g d'ARN, le volume de chaque extrait est amené à 1000 μ l avec du tampon de dénaturation (TpD) contenant 10% de MOPS 10X (MOPS 0,2 M ; EDTA 0,01 M ; acétate de sodium 0,05 M ; pH = 7), 25% de formamide désionisée et 17,8% de formaldéhyde désionisée. Les échantillons sont alors chauffés 5 min. à 68°C puis posés sur de la glace.

II.4.2.2.Électrophorèse

Le gel d'agarose à 1,2% est préparé dans un Erlenmeyer stérile. A cet effet 1,8g d'agarose sont introduits dans 15 ml de tampon MOPS 10X et 110 ml d'eau DEPC ; le

mélange est porté à ébullition et, après refroidissement, 25,5 ml de formaldéhyde désionisée sont ajoutés sous hotte aspirante. Le gel coulé dans la cuve d'électrophorèse, polymérise en 40 minutes.

Le tampon de migration est une solution 1,5 litre de tampon MOPS 1X ; il est versé dans la cuve d'électrophorèse où le support de gel est installé. On évite la formation de bulles d'air et le peigne est retiré.

Avant le dépôt des échantillons, une prémigration est effectuée sous une tension de 30V pendant 30 min.

Deux échantillons d'ARN sont utilisés comme marqueurs de taille des ARN ; pour cela, dans des tubes traités comme précédemment, sont ajoutés 2 µl de bromure d'éthidium (BET) à 1%. Avant de déposer l'ensemble des échantillons, 3 µl de Bleu THOMAS, utilisé comme marqueur de migration, sont ajoutés dans chaque tube ; après agitation les tubes sont centrifugés quelques secondes et les échantillons déposés dans le gel.

Une tension de 30V est alors appliquée pendant 16 heures.

Après séparation des ARN par électrophorèse, la bande de gel contenant les marqueurs de taille est découpée et observée sous UV ; la distance de migration des ARN ribosomiaux 18S et 28S est alors mesurée et utilisée pour tracer la droite donnant la taille des ARN (en kilobases, kb) en fonction de leur distance de migration dans le gel.

La partie du gel contenant les échantillons est lavée pendant 1 heure dans une solution de 10 SSC (NaCl 1,5 M, citrate de sodium 0,15 M ; pH 7).

II.4.2.3. Transfert des ARN totaux

Sur un support de Plexiglas sont empilés :

- une feuille de papier Whatman W3 de 40cm de long et 16 cm de large, imbibée de 20 SSC (NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3 M), les extrémités du papier doivent plonger dans du 20 SSC,
- le gel,
- une membrane de nylon (Hybon-N+, Amersham) imbibée de 20 SSC et découpée aux dimensions du gel,
- deux feuilles de papier Whatman W1 de mêmes dimensions, imbibée de 20 SSC,
- 5 cm d'épaisseur de papier buvard,
- un couvercle de Plexiglas ; sur l'ensemble on place un poids de 500 g.

Un cadre de parafilm est installé pour éviter tout contact direct entre la solution de 20 SSC et le papier absorbant. Le transfert des ARN sur la membrane de nylon se fait par capillarité dans du tampon 20 SSC. Le système est maintenu en place 16 heures. Après transfert, la membrane est séchée et placée dans une étuve chauffée à 80°C pendant 2 heures pour fixer les ARN.

II.4.3. Hybridation des membranes.

II.4.3.1. Marquage des sondes ADNc.

Nous disposons au laboratoire des sondes ADNc du CRF (don du Docteur Kelly E. MAYO, Northwestern University, Evanston, USA) et de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ; don du Professeur J.J. CURGY, centre de Biologie cellulaire, USTL).

Environ 30 ng de chacune des sondes ont été utilisés pour la réaction de marquage.

Les fragments d'ADNc des sondes du CRF et de la GAPDH ont été marqués par *random priming* à l'aide d'un kit de marquage (Multiprime DNA Labelling Systems Amersham) utilisant la Klenow Polymérase et du ^{32}P - α -dCTP. (Déoxy-cytidine 5'-triphosphate, 3000 Ci/mmol ; NEN-Dupont).

II.4.3.2. Préhybridation et hybridation

Les membranes sont préhybridées 5 heures à 42°C dans des sacs d'hybridation avec 20 ml d'une solution contenant 50% de formamide, 5X de Denhardt's, 1% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 5X de SSPE (Saline Sodium Phosphate, EDTA) et de l'ADN de sperme de saumon dénaturé (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

L'hybridation proprement dite est réalisée ensuite dans 20 ml de ce même milieu contenant la sonde marquée ADNc du CRF durant 16 heures à 42°C. La sonde marquée est préalablement dénaturée par chauffage à 100°C pendant 5 minutes, avant d'être introduite dans le milieu d'hybridation à raison de $1,5 \cdot 10^6$ cpm/ml.

II.4.3.3. Lavages

Pour diminuer au maximum l'hybridation non spécifique de la sonde, les membranes sont lavées rapidement une première fois dans une solution de 2 SSC/0,1% SDS à température ambiante et une seconde fois pendant 20 min., puis deux autres fois 10 min. dans des solutions de 2 SSC/0,1% SDS et 0,1% SSC/0,1% SDS à la température de 65°C.

II.4.4. Autoradiographie.

Les complexes ARNm/sonde ADNc marquée sont détectés par autoradiographie, dans ce but, les membranes des *Northern Blots* sont placées durant 8 jours au contact de films (hyperfilms MP, Amersham) à -80°C en présence de deux écrans intensificateurs.

II.4.5. Deshybridation et réhybridation avec la sonde témoin.

Les complexes ARNm/sonde ADNc du CRF sont dissociés (dés hybridés) après 8 jours d'exposition, en plaçant les membranes dans une solution de 0,1% SSPE/0,1% SDS à 100°C durant 15 min. Après séchage, les membranes sont réutilisées comme précédemment pour l'hybridation de la sonde témoin, ADNc de la GAPDH. Les films sont développés après 5 heures d'exposition des membranes.

II.4.6. Mesure du signal d'hybridation.

Le signal d'hybridation est mesuré par quantification des spots obtenus sur les films d'autoradiographie par analyse densitométrique à l'aide d'un scanner (SAMBA 200, Alcatel, France).

Pour chaque signal obtenu après hybridation avec la sonde ADNc du CRF, on mesure la hauteur du pic de densité, exprimée en unités arbitraires. Une estimation de la quantité d'ARN déposés est effectuée par la lecture des spots obtenus après hybridation avec la sonde ADNc de la GAPDH. La quantité relative d'ARNm spécifiques qui se sont hybridés avec la sonde ADNc du CRF est appréciée en calculant le rapport entre la hauteur du premier pic (CRF) et celle du second (GAPDH). Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires.

II.5. Marquage immunocytochimique du CRF dans l'éminence médiane (EM).

Les coupes de cerveau contenant l'éminence médiane des nouveau-nés ont été utilisées pour le marquage immunocytochimique des terminaisons à CRF, dans cette région. Les coupes sont décongelées à température ambiante puis fixées 15 min. dans une solution de 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate (PB), pH 7,4. Après 3 lavages dans du PB, elles sont recouvertes par une solution de ce tampon contenant 3% d'immunsérum normal de mouton (NSS) et 0,1% de Triton X₁₀₀, durant 30 min. Les coupes sont ensuite incubées toute une nuit à température ambiante et en atmosphère humide, dans une solution de PB contenant 1% de NSS, 0,1% de Triton X₁₀₀ (PB/NSS/TX) et l'immunsérum anti-CRF (CRF-IS) dilué au 1/1000ème. Le CRF-IS a été produit chez le lapin par immunisation avec du CRF de rat/homme (Peninsula, Meyerside, UK) couplé avec la carbodiimide à la BSA. Ce CRF-IS utilisé ne présente pas de réactions croisées avec les peptides suivants (dilués à 1 µg/ml dans le tampon d'incubation) : AVP, substance P, TSH, GHRH, NPY, NT, GnRH, Somatostatine, VIP, Leu-et Met-enképhaline. Les coupes sont ensuite lavées 3 fois 5 min. dans une solution de PB/NSS/TX et incubées de nouveau durant 3 heures dans cette même solution additionnée de l'anticorps secondaire (immunsérum de chèvre anti-IgG de lapin), conjugué à la fluoresceine, (Jackson Immunoresearch Laboratories, distribué par Immunotech, Marseille, France) et dilué au 1/200ème. Les coupes sont de nouveau lavées 3 fois 10 min. dans du PB, puis montées dans une solution à 25% (w/v), de mowiol et 25% de glycérol, dans du tampon Tris, pH 8,5.

Les coupes sont examinées à l'aide d'un microscope Zeiss équipé d'une lampe à mercure de 50W et de filtres appropriés pour l'observation de la fluorescence puis photographiées (pellicule AGFA, 400 ASA).

Nous avons vérifié que l'omission de l'immunsérum CRF-IS ou de l'anticorps secondaire induit une perte du signal de marquage.

II.6. Mesure de la capacité de liaison de la CBG plasmatique.

Une fraction de 200 µl de plasma a été diluée au 1/10ème dans du tampon phosphate 50mM, pH 7,4, puis incubée avec 2,4 pmol de corticostérone tritiée (1,2,6,7-³H corticostérone, Amersham, AS : 94 Ci/mmol), sans ou en présence de corticostérone froide (non marquée) à des concentrations variables de 3 à 384 pmol

tube. Le volume final d'incubation est de 300 μ l. La liaison non spécifique a été déterminée en ajoutant dans quelques tubes de la série un excès de corticostérone froide, en quantité 500 fois plus importante que celle de traceur.

Les tubes sont placés 20 min. à 30°C puis 2 heures à 4°C. Les complexes corticostérone-CBG sont séparés de la corticostérone libre par apport dans chacun des tubes de 50 μ l d'un mélange Charbon/Dextran (5% de Charbon et 0,5% de Dextran T70 dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4).

Les tubes sont centrifugés 10 min. à 5000 rpm ; 150 μ l de surnageant sont mélangés avec 4 ml de liquide scintillant afin de mesurer la radioactivité liée à la CBG au compteur β . Les caractéristiques de la liaison CBG-corticostérone (K_d et B_{max}) sont obtenus en traçant la droite de Scatchard (B/F en fonction de B ; B = corticostérone liée, F = corticostérone libre).

II.7. Dosages radioimmunologiques.

Le protocole et les caractéristiques des dosages RIA de la corticostérone et de l'ACTH ont été décrit précédemment (cf. 1ère partie). Le dosage des hormones dans le milieu d'incubation (études *in-vitro*) est réalisé sans extraction préalable.

II.7.1. Dosage du CRF hypothalamique.

L'hypothalamus néonatal est désagrégé par sonication dans 1 ml d'une solution à 0,1 M d'acide chlorhydrique 1 M d'acide acétique, puis placé à 90°C pendant 5 min. pour inactiver les enzymes protéolytiques. Les broyats tissulaires acides sont ensuite centrifugés 30 min. à 14000 t/min. Des fractions de 200 μ l du surnageant sont asséchés au Speed-Vac ; les résidus secs sont ensuite remis en suspension dans 300 μ l de tampon de dosage. Celui-ci est du tampon TRIS 0,1 M, pH 7,4 contenant 0,1% de Triton_{x100} et 0,1% de BSA. Le standard de référence est du R-41-CRF (Novabiochem, Suisse) et le traceur du ¹²⁵I N-tyr-R-CRF (NEN, France) dont la RAS est de 2200 Ci/mmol. L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin dirigé contre le CRF de rat (TOPON *et coll.* 1985) utilisé à la dilution finale de 1/30000ème. Le volume total d'incubation qui est de 600 μ l est constitué de tampon (300 μ l), de la solution standard de CRF (100 μ l), pour établir une gamme de 14 à 896 pg/tube ou de l'échantillon (100 μ l), de la solution de ¹²⁵I-CRF (100 μ l) et d'immunsérum (100 μ l). Le traceur n'est ajouté qu'après 24 heures d'incubation à 4°C des échantillons ou des standards avec l'antisérum, puis l'incubation est poursuivie 24 heures supplémentaires.

La séparation des complexes CRF/anticorps et du CRF libre, est réalisée par apport dans chaque tube de 200 μ l de tampon TRIS 0,1 M, pH 7,4 après ajout extemporané de 0,1 ml de sérum de lapin normal et 0,1 ml de sérum anti gamma-globulines de lapin au milieu d'incubation.

Après homogénéisation au Vortex puis centrifugation 15 min. à 4000 t/min. et à 4°C, la radioactivité du culot est mesurée au compteur gamma LKB.

Dans ces conditions, la sensibilité du dosage est de 3 pg/ml et l'IC₅₀ de 20 pg/ml. Le pourcentage de réaction croisée est de 100% avec le CRF de rat et inférieur à 0,001% avec l'arginine vasopressine, l'ocytocine, la TRH, la somatostatine, la GHRH,

le VIP, l' α et la γ MSH, l'ACTH et la β -endorphine. La variabilité intra-dosage est de 7% et inter-dosage de 10%.

II.8. Analyse statistique.

De même que précédemment, une analyse de variance (ANOVA) à voie multiple a été utilisée suivie du test de Dunnet. Le degré de signification est fixé à $P \leq 0,05$.

III. RESULTATS.

III.1. Animaux étudiés

Cette étude porte sur 16 portées : 8 femelles gravides ont été injectées de solvant et 8 de morphine du 11^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation. Chaque portée comprend de 8 à 12 foetus, ceux-ci ont été prélevés à terme par césarienne puis sacrifiés selon le protocole décrit précédemment.

Pour chacun des paramètres étudiés, un nombre restreint de nouveau-nés a été utilisé par portée afin de diminuer au maximum les variations physiologiques susceptibles d'exister d'une portée à l'autre.

Les résultats concernant les nouveau-nés mâles et femelles ont été confondus puisque nous n'avons pas observé de différences liées au sexe pour l'ensemble des paramètres étudiés.

III.2. Effets de l'exposition prénatale à la morphine sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Les surrénales des nouveau-nés exposés à la morphine sont significativement atrophiées par rapport à celles des animaux témoins (versus M : $2,47 \pm 0,09$ mg S : $3,52 \pm 0,16$ mg ; $P < 0,001$).

III.2.1. Sécrétion surrénalienne de corticostérone en réponse à l'ACTH₁₋₂₄ in vitro.

En l'absence de sécrétagogue les taux de corticostérone sécrétés par les surrénales des animaux des deux groupes expérimentaux sont comparables (Fig. 29A). En présence d'ACTH₁₋₂₄, les surrénales des deux groupes répondent de manière similaire et dose-dépendante, pour des concentrations en ACTH comprises entre 10^{-10} et 10^{-8} M. Pour les concentrations plus élevées d'ACTH (10^{-7} et 10^{-6} M), les surrénales des nouveau-nés exposés à la morphine sécrètent significativement moins de corticostérone que celles des animaux témoins (Fig. 29A).

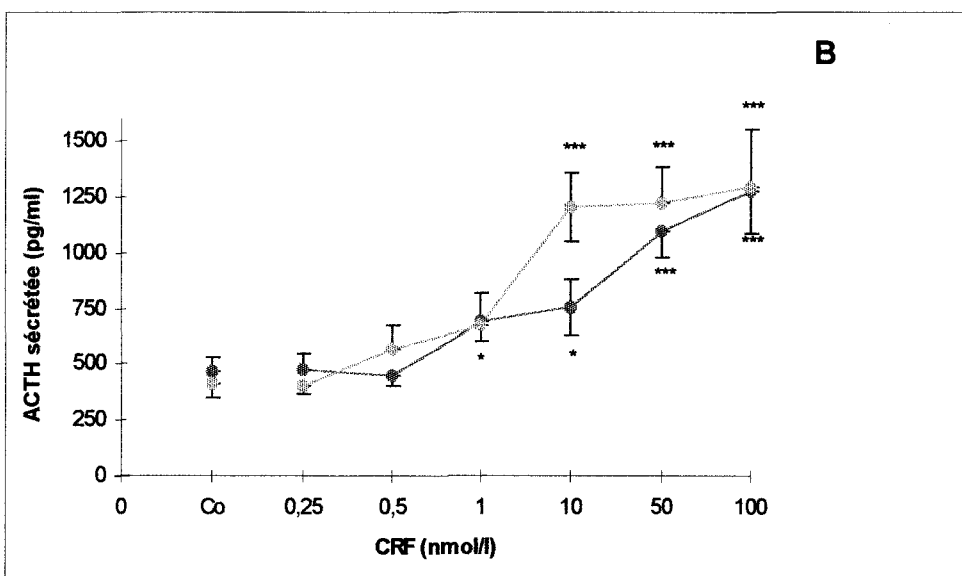
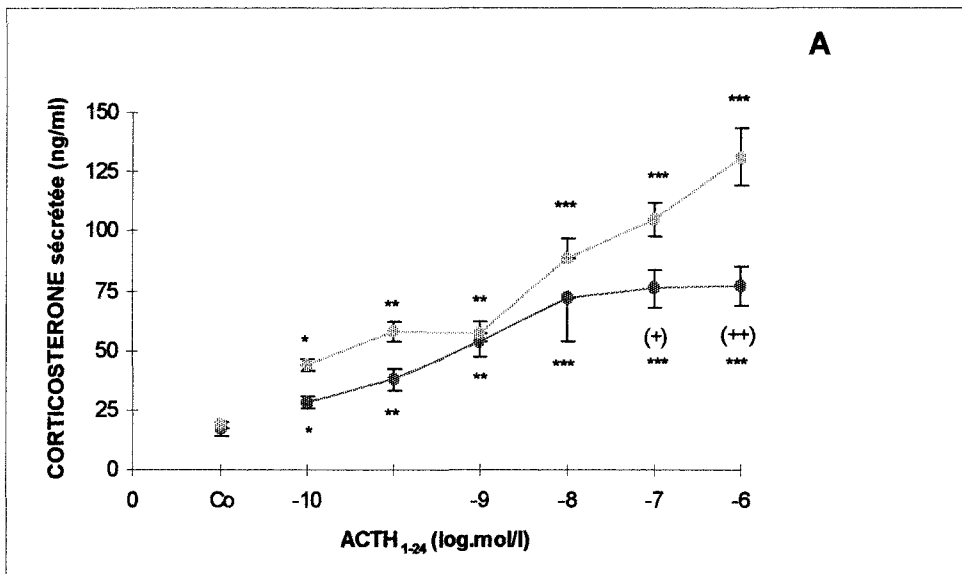


Figure 29 : A : Effet de l'ACTH₁₋₂₄ sur la sécrétion *in-vitro* de corticostérone par des surrénales de rats nouveau-nés issus de mères injectées de solvant (○) ou de morphine (●) durant la gestation.
 B : Effet du CRF sur la sécrétion *in-vitro* d'ACTH par des adénohypophyses de nouveau-nés des deux groupes expérimentaux.

Co = contrôles ; absence de sécrétagogue. Moyennes ± ESM (nombre de glandes par dose d'ACTH ou de CRF, n=7-17)

Analyse statistique : - morphine vs solvant (+) P<0,05 (++) P<0,01
 - vs contrôles . * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

III.2.2. Sécrétion adénohypophysaire d'ACTH en réponse au CRF *in-vitro*.

La sécrétion *in-vitro* d'ACTH par des adénohypophyses de nouveau-nés en réponse ou non au CRF est dose-dépendante et similaire chez les animaux des deux groupes expérimentaux. (Fig. 29B).

III.2.3. Contenu adénohypophysaire en ARNm de la POMC.

L'analyse par hybridation *in-situ* des ARN messagers de la POMC dans les adénohypophyses des nouveau-nés montre une importante réduction de ceux-ci chez les animaux exposés à la morphine avant leur naissance (Fig. 30A/B).

III.2.4. Contenu en CRF et en ARNm du CRF dans l'hypothalamus, et immunoréactivité CRF dans l'éminence médiane.

A la naissance, chez les animaux exposés *in-utero* à la morphine, le contenu hypothalamique en CRF est significativement diminué (Fig. 31A), de même que l'immunoréactivité des terminaisons à CRF dans l'éminence médiane (Fig. 33).

Par contre, la quantité d'ARNm du CRF dans l'hypothalamus (Fig. 32) ou plus spécifiquement dans le NPV (Fig. 31B) n'est pas significativement diminuée par l'exposition prénatale à la morphine.

III.3. Effets de l'exposition prénatale à la morphine sur la CBG, sur la masse du foie du nouveau-né, et sur la corticostéronémie maternelle.

L'exposition prénatale à la morphine n'affecte pas significativement la masse du foie des nouveau-nés (Tableau 2). La capacité de liaison (B_{max}) de la CBG pour la corticostérone et l'affinité (K_d) des sites de liaison pour l'hormone ne sont pas affectées, à la naissance, par le traitement prénatal à la morphine (Tableau 2).

Chez les mères, le traitement à la morphine n'a pas affecté à la délivrance, le B_{max} pour la CBG plasmatique (Tableau 2), ce traitement a cependant diminué légèrement mais significativement l'affinité des sites de liaison (Tableau 2).

Au moment de la délivrance la corticostéronémie maternelle est comparable dans les deux groupes expérimentaux (M : 38,5 ± 9,7 ng/ml, n=7 vs S : 31,2 ± 5,1 ng/ml, n=8 ; P>0,05).

IV DISCUSSION

IV.1. Effets de la morphine sur l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien.

Nous avons montré précédemment que l'exposition prénatale à la morphine induit à la naissance une atrophie surrénalienne et une non augmentation de la corticostéronémie au cours des 90 minutes qui la suivent. Nous venons de montrer que les surrénales des nouveau-nés, exposés à la morphine au cours de la gestation, répondent *in-vitro* à l'ACTH de manière pratiquement comparable à celle observée chez les témoins. Sur la base de ces données, on peut émettre l'hypothèse que

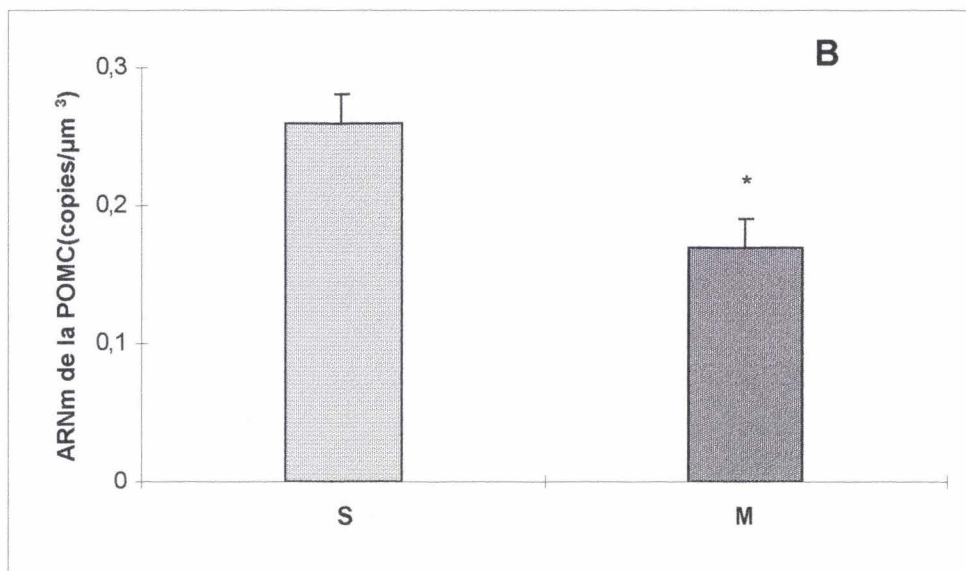
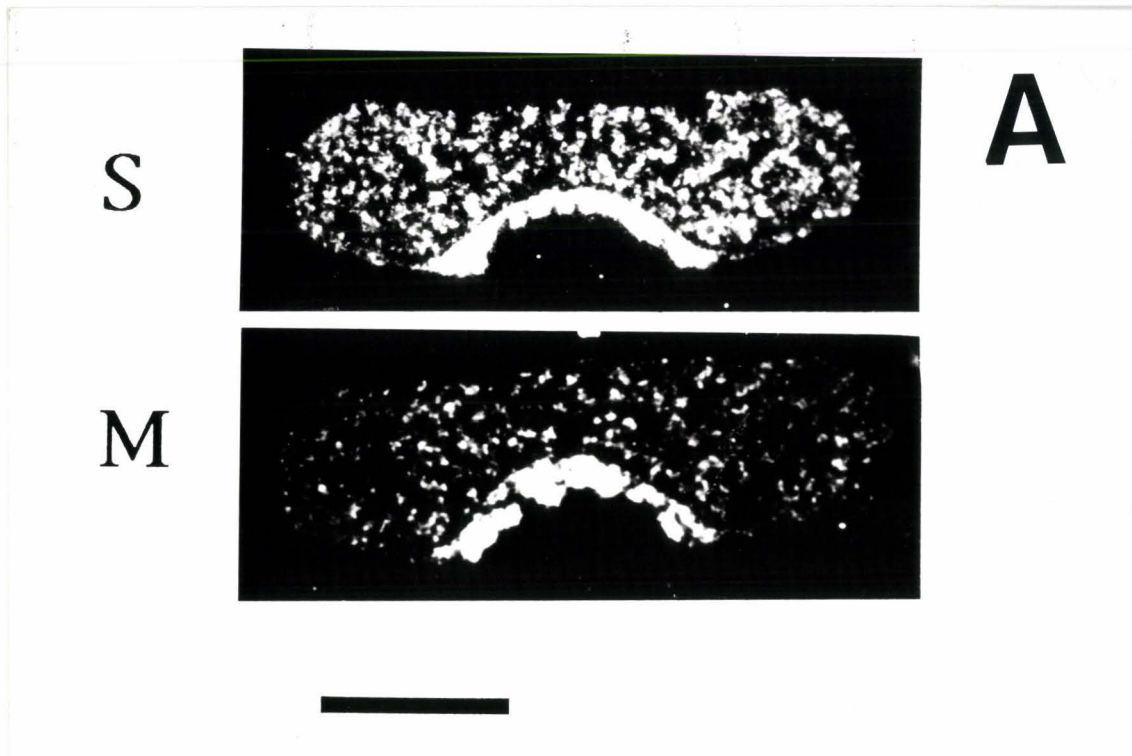


Figure 30 : A : Microphotographie en fond sombre montrant le signal d'hybridation de la sonde oligonucléotidique pour la POMC au niveau hypophysaire chez les nouveau-nés issus de mères traitées au solvant (□) ou à la morphine (■). Noter l'important marquage des ARNm au niveau de la pars distalis (en haut) et de la pars intermedia (en bas). Longueur de la barre = 500μm.
 B : Quantification du signal dans l'adénohypophyse par analyse d'image, chez les nouveau-nés issus de mères traitées au solvant (S) ou à la morphine (M) au cours de la gestation.

Moyennes ± ESM (n=7-8)

Analyse statistique : - morphine vs solvant* P<0,05

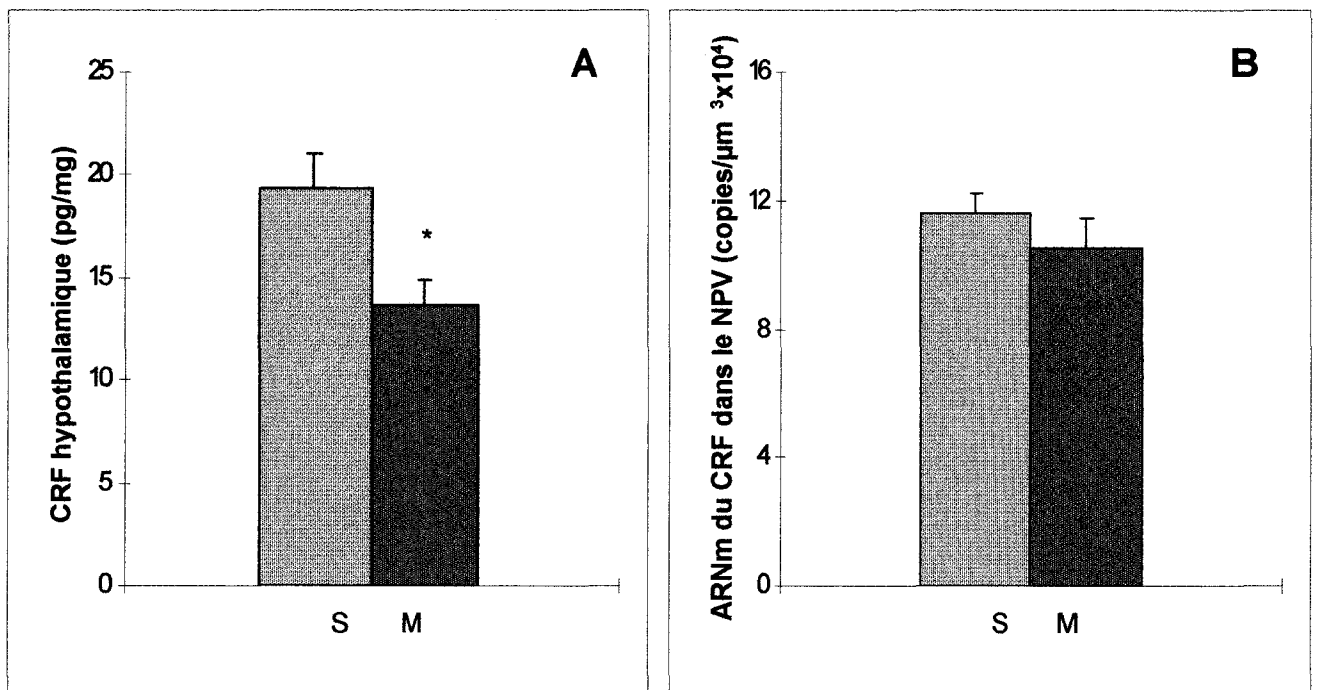


Figure 31: Contenus de l'hypothalamus en CRF (A) et du NPV en ARNm du CRF (B), chez des nouveau-nés issus de mères injectées de solvant (S) ou de morphine (M) au cours de la gestation.

Moyennes \pm ESM (n=7-9). Analyse statistique :
 - morphine vs solvant : * $P < 0,05$

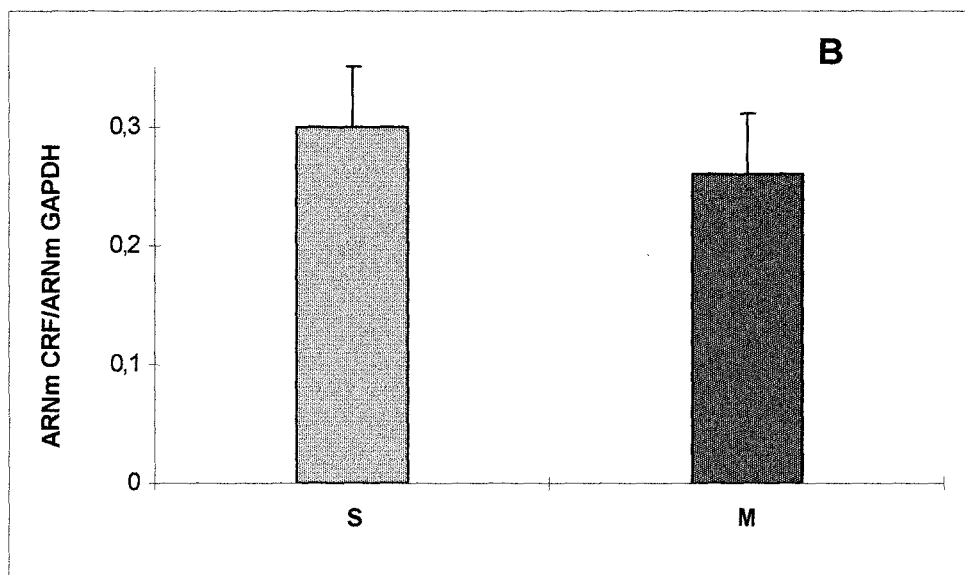
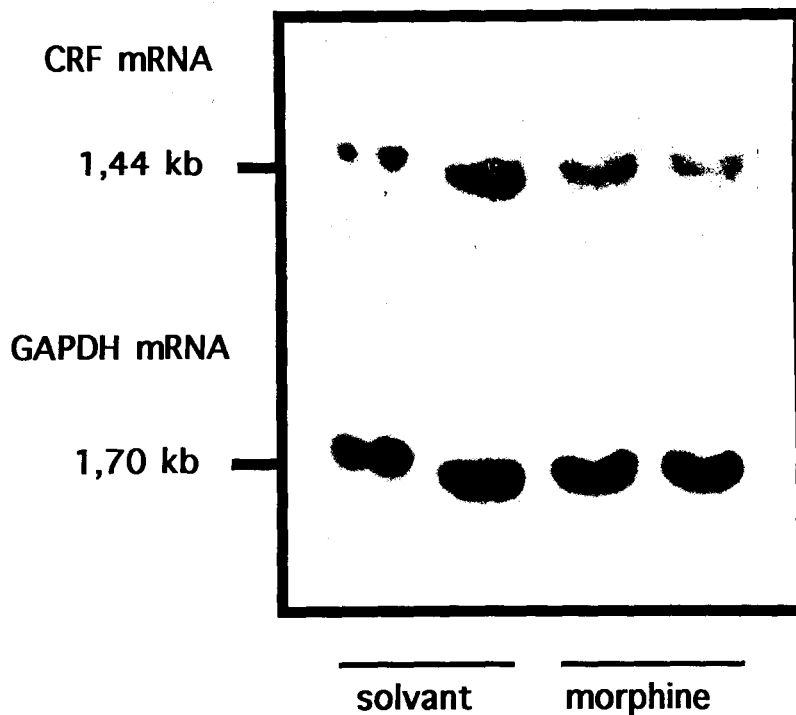
A

Figure 32 : A : Exemple d'un autoradiogramme relatif à l'analyse par Northern Blot des ARNm du CRF hypothalamique chez des nouveau-nés à terme issus de mères injectées de solvant (■) ou de morphine (■) durant la gestation. La taille (nombre de bases) des fragments d'ARNm hybridés est indiquée à gauche. L'hybridation avec la sonde ADNc de la GAPDH permet de corriger les variations de quantité d'ARN déposée dans chaque puits. B : Quantification normalisée des ARNm du CRF hypothalamique par analyse d'image des autoradiogrammes obtenus, analogue à celui montré en A.

Moyennes \pm SEM (n=9). Il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les deux groupes expérimentaux S et M.

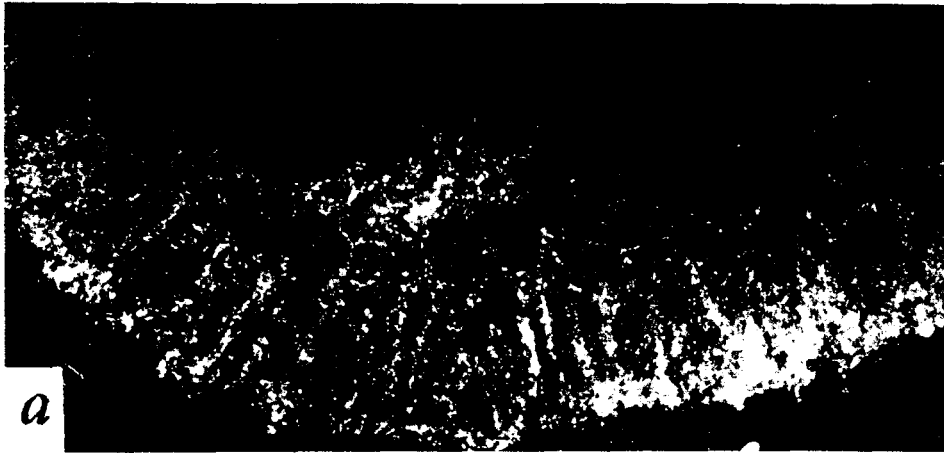


Figure 33 : Marquage immunocytochimique des terminaisons à CRF dans l'EM chez des nouveau-nés issus de mères traitées au solvant (A) ou à la morphine (B) au cours de la gestation.
Longueur de la barre = 50 μ m.
Notez la diminution du signal chez les animaux exposés à la morphine durant la gestation.

		Nouveau-nés		Mères	
Traitement maternel		Solvant	Morphine	Solvant	Morphine
Masse du foie (mg)		291,7 ± 9,2	288,0 ± 5,4	nd	nd
Capacité de liaison de la CBG pour la corticostérone	Bmax (ng/ml)	36 ± 9	43 ± 2	247 ± 47 ***	212 ± 30 ***
	Kd (nM)	65 ± 7	74 ± 17	82 ± 6 ***	52 ± 5 (++)

Tableau 2 : Effets d'une exposition prénatale à la morphine sur la masse du foie et sur la capacité de liaison de la CBG plasmatique chez des nouveau-nés à terme et leurs mères traitées à la morphine ou au solvant durant la gestation.

Moyennes ± ESM (n=6-8). Analyse statistique :

- mère morphine versus mère solvant : (++) P<0,01

- *** P<0,001 mère traitée vs progéniture respective

nd : non déterminé

l'atrophie des surrénales et la réduction de la fonction glucocorticoïde ne sont pas la conséquence d'une défaillance de la sensibilité à l'ACTH.

Par ailleurs, chez les nouveaux-nés exposés à la morphine, la réponse *in-vitro* de l'adénohypophyse au CRF est normale, bien que son contenu en ARNm de la POMC, précurseur de l'ACTH soit diminué. Ceci laisse présager une possible réduction *in-vivo* de la synthèse et/ou de la sécrétion d'ACTH. De plus, l'exposition prénatale à la morphine provoque une baisse du contenu hypothalamique en CRF et de l'immunoréactivité CRF-like au niveau de l'éminence médiane, où sont regroupées de nombreuses fibres à corticolibérine (CRF) émanant de neurones parvocellulaires localisées principalement dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus. Néanmoins, le contenu hypothalamique en général, et du NPV en particulier en ARNm du CRF ne paraît pas être significativement affecté par ce traitement. Ces observations suggèrent que la morphine agit au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire de l'axe corticotrope, au cours du développement. Elle pourrait affecter prioritairement la biosynthèse et/ou la sécrétion du CRF et, secondairement, l'expression de la POMC adénohypophysaire, contrôlées en partie par ce neuropeptide. L'absence d'effet de la morphine sur le contenu des NPV en ARNm du CRF suggère que cette drogue pourrait entraîner une inhibition des mécanismes post-transcriptionnels. On peut aussi envisager que la levée d'inhibition de l'action de la morphine, depuis le dernier jour de traitement (E18), concerne dans un premier temps davantage les mécanismes de la transcription que ceux de la traduction. Les effets de la morphine chez le nouveau-né s'ils sont directs, ce qui reste à prouver, contrastent avec ceux rapportés chez l'adulte.

En effet, de nombreuses données de la littérature signalent au contraire, une action stimulatrice de la morphine sur l'activité de l'axe corticotrope de l'adulte (*revue in PECHNIK 1993*), via le système catécholaminergique et la mise en jeu de récepteurs α et β -adrénergiques (MARTINEZ-PINERO *et coll.* 1994). Chez le jeune rat une action stimulatrice de la morphine sur l'activité de cet axe a également été rapportée (ADAMSON *et coll.* 1991, LITTLE et KUHN 1995).

L'hypotrophie et la réduction de l'activité glucocorticoïde des surrénales chez les nouveau-nés exposés à la morphine avant leur naissance, pourraient donc ne pas être liées à un effet direct de cette drogue chez le fœtus mais, pourraient être la conséquence de la production induite par la morphine d'un facteur.

Puisque l'administration aiguë de morphine chez l'adulte stimule la sécrétion de CRF au niveau de l'éminence médiane, celle d'ACTH par l'adénohypophyse, et provoque une élévation de la corticostéronémie (*revue in PECHNIK 1993*), il pourrait en être de même chez la rate gravide. Par ailleurs, lors d'une administration chronique de morphine, la réponse de l'axe corticotrope à la morphine pourrait s'atténuer par un phénomène de désensibilisation, mais néanmoins, persister puisque l'on sait depuis longtemps que cette drogue, en traitement chronique, induit chez l'adulte une augmentation du volume du cortex surrénalien, témoin vraisemblable d'une stimulation prolongée de la surrénale par l'ACTH et donc d'une hyperactivité de l'axe corticotrope (McKAY 1931). Si la morphine administrée à la rate gravide avait stimulé l'axe corticotrope fœtal, nous aurions dû observer à la naissance une hypertrophie surrénalienne, ce qui n'est pas le cas bien au contraire puisque les nouveau-nés ont des surrénales atrophiées. Il est donc peu probable que l'axe corticotrope du fœtus soit stimuable par la morphine, contrairement à celui de la mère.

Il est établi qu'une hypersécrétion de glucocorticoïdes par les surrénales maternelles où qu'une administration de glucocorticoïdes exogènes, (corticostérone ou dexaméthasone) à des femelles gravides, induisent chez les foetus *in-utero* une atrophie surrénalienne et une réduction de la stéroïdogénèse dues à une diminution de l'ACTHémie associée à une baisse du contenu hypothalamique en CRF (FAMELI *et coll.* 1994, HRISTIC *et coll.* 1995, DUPOUY *et coll.* 1987). L'ensemble de ces données expérimentales suggèrent donc que la corticostérone maternelle sécrétée en réponse aux injections répétées de morphine pourrait traverser le placenta et inhiber l'axe corticotrope foetal. Nos observations relatives à l'absence d'effets directs ou indirects de la morphine sur les ARNm du CRF dans le NPV alors que le contenu de l'hypothalamus en CRF est diminué, plaident en faveur d'une inhibition post-transcriptionnelle de la synthèse du CRF. Nos données sont donc compatibles avec celles de la littérature selon lesquelles la corticostérone au cours du développement n'exerce pas de rétrocontrôle négatif sur l'expression du gène du CRF (BARAM et SCHULTZ 1992). Cette hypothèse fera l'objet d'une vérification expérimentale dans une partie suivante.

IV.2. Effets de la morphine sur le foie et la CBG plasmatique.

La masse du foie des nouveau-nés exposés à la morphine n'est pas significativement différente de celle des nouveau-nés exposés au solvant ; notre modèle expérimental ne permet donc pas de reproduire la réduction de cet organe observée chez des enfants de mères héroïnomanes (*revue in* VATHY et KATAY 1992). Par ailleurs, la morphine n'a pas affecté la capacité de liaison de la CBG circulante pour la corticostérone ; aussi bien chez les nouveau-nés que chez leurs mères.

A ce stade de notre étude, la diminution du K_d , donc de l'affinité, de la CBG pour la corticostérone chez les mères injectées de morphine ne peut être raisonnablement expliquée.

En conclusion, nous avons montré que l'exposition prénatale à la morphine inhibe chez le foetus le fonctionnement de l'axe corticotrope, mis en évidence au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire, ce qui entraîne chez le nouveau-né une atrophie surrénalienne et une réduction de la sécrétion de corticostérone.

CINQUIEME PARTIE

Effets de la surrénalectomie maternelle sur les conséquences d'une exposition prénatale à la morphine sur l'axe corticotrope et la surrénale du rat nouveau-né.

I. INTRODUCTION

I.1. Transfert placentaire des glucocorticoïdes au cours de la gestation.

Nous avons précédemment émis l'hypothèse que la morphine pourrait stimuler la sécrétion de corticostérone chez les femelles gestantes et que cette hormone pourrait traverser le placenta et venir inhiber l'axe corticotrope du nouveau-né. En effet, il a été prouvé expérimentalement que la corticostérone est capable de passer au travers du placenta, du compartiment maternel au compartiment foetal, et réciproquement (DUPOUY *et coll.* 1975 ; CHATELAIN *et coll.* 1980). Cependant, au cours de la gestation, la corticostéronémie est plus élevée chez la mère que chez les foetus (DUPOUY *et coll.* 1975). Par ailleurs, au cours de son transfert placentaire, la corticostérone peut subir une transformation biochimique sous l'action d'une enzyme : la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD-2) dont l'activité a été démontrée dans des fragments de placentas de nombreuses espèces dont le rat et l'homme (BROWN *et coll.* 1993, BURTON et WADDELL 1994). L'inactivation placentaire de la corticostérone pourrait ainsi protéger le foetus des effets délétères d'un excès de glucocorticoïdes en provenance de la mère. Cette enzyme transforme rapidement la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone chez le rat ou le cortisol en cortisone chez l'homme. Ces métabolites de la corticostérone ou du cortisol ne sont plus capables de se lier aux récepteurs de type I (MR) ou de type II (GR) des hormones corticostéroïdes (*revue in* SECKL 1997), supprimant ainsi leurs effets biologiques.

De plus, la 11 β -HSD-2 est non seulement capable d'inactiver la corticostérone (activité 11- β -déshydrogénase), mais aussi de la former (activité 11-oxoréductase).

On peut signaler à ce propos que l'inhibition de l'activité de la 11 β -HSD-2 placentaire induit à court terme un retard de croissance foetale manifeste à la naissance et, à long terme, une élévation de la pression sanguine chez ces animaux lorsqu'ils atteignent l'âge adulte (LINDSAY *et coll.* 1996). Retard de croissance intra-utérine et hypertension chez l'adulte, sont deux des conséquences les mieux connues d'une exposition prénatale à un excès de glucocorticoïdes (*revue in* SECKL 1994 ; LEVITT *et coll.* 1996).

Les activités enzymatiques 11 β -deshydrogénase et 11-oxoréductase de la 11 β HSD-2 sont modulées au cours de la gestation ; elles s'expriment surtout dans la deuxième moitié de la vie intra-utérine qui représente pour le foetus une période critique du développement au cours de laquelle les effets des glucocorticoïdes maternels et/ou exogènes sont les plus manifestes (*revue in* LEVITT *et coll.* 1996).

Au cours des derniers jours de gestation, l'activité 11 β -déshydrogénase de la 11 β -HSD-2 augmente alors que l'activité 11-oxoréductase diminue (BURTON et WADDELL 1994) alors qu'au 16ème jour, l'activité 11-oxoréductase était plus importante que l'activité 11 β -déshydrogénase, ce qui peut rendre compte à ce stade d'un transfert net de corticostérone de la mère au foetus (BURTON et WADDELL 1994). L'évolution inverse de ces deux activités enzymatiques, du 16ème au 21ème jour de la gestation, pourrait contribuer à réduire le transfert de corticostérone de la mère au foetus, à une période où l'axe corticotrope foetal se met en place et où le

foetus est capable de produire les glucocorticoïdes dont il a besoin, tout en se protégeant d'un excès de glucocorticoïdes d'origine maternelle (revue in BURTON et WADDELL 1994). On peut néanmoins signaler qu'en fin de gestation, l'expression de la 11 β -HSD-2 placentaire diminue fortement (BROWN *et coll.* 1996).

En résumé, les glucocorticoïdes maternels et/ou exogènes sont susceptibles d'atteindre sans difficulté majeure le foetus avant le 16ème jour de la gestation et vraisemblablement à terme, alors que entre le 16ème jour et la fin de la gestation, la 11- β -HSD-2 pourrait jouer un rôle de barrière enzymatique placentaire capable de limiter l'apport de corticostérone d'origine maternelle tant qu'il n'y a pas saturation.

Dès lors, si l'administration de morphine à des rates gravides, du 11ème au 18ème jour de la gestation, élève la corticostéronémie comme elle le fait chez des mâles adultes (MARTINEZ-PINERO *et coll.* 1994), on peut émettre l'hypothèse que les foetus soient alors exposés à un excès de corticostérone d'origine maternelle.

I.2. But de l'étude.

Les conséquences sur l'axe hypothalamo-hypophyso-glucocorticosturrénalien des nouveau-nés exposés *in-utero* à la morphine pouvant être attribuables à la corticostérone maternelle, libérée sous l'action de la morphine, notre premier objectif a été de démontrer que l'injection de morphine aux femelles gestantes stimule bien l'activité de l'axe corticotrope maternel et entraîne une élévation de la corticostéronémie. Dans un deuxième temps, nous avons étudié si cette hypercorticostéronémie maternelle pouvait rendre compte des effets observés chez les nouveau-nés. Si tel est bien le cas, une surrénalectomie maternelle juste avant le traitement à la morphine devrait abolir les effets observés chez les nouveau-nés ; par ailleurs, ceux-ci devraient être reproduits par administration conjointe de corticostérone et de morphine aux rates surrénalectomisées.

Enfin, en ce qui concerne les effets de la morphine sur la fonction minéralocorticoïde de la surrénale néonatale, nous avons recherché si ce traitement pouvait altérer différents facteurs impliqués dans le contrôle multifactoriel de cette fonction. L'exposition prénatale à un excès de glucocorticoïdes induit chez le rat devenu adulte une hypertension artérielle (revue in SECKL 1994 ; LEVITT *et coll.* 1996) pouvant être imputable en partie tout au moins à une hyperaldostéronémie (BRODY et JOHNSON 1980 ; JANIAK et BRODY 1988 ; GOMEZ-SANCHEZ et GOMEZ-SANCHEZ 1992) et/ou à une diminution des récepteurs aux minéralocorticoïdes de type I ou MR (ARRIZA *et coll.* 1988 ; ROLAND *et coll.* 1995 ; NARAGHI *et coll.* 1995 ; LEVITT *et coll.* 1996). On peut donc envisager que la corticostérone maternelle en excès puisse être impliquée dans les perturbations de la fonction minéralocorticoïde observée chez les nouveau-nés de mères exposées à la morphine.

Pour toutes ces raisons, la femelle gestante surrénalectomisée, juste avant le traitement à la morphine, nous a paru être un bon modèle expérimental pour tester si des facteurs surrénaux d'origine maternelle sont responsables des effets de la morphine sur la croissance et l'activité de la surrénale néonatale.

II. MATERIEL ET METHODES.

II.1 Animaux : opérations, traitements et prélèvements.

Les rats de souche Wistar sont élevés dans des conditions identiques à celles décrites dans la 1ère partie. Les femelles fécondées sont placées dans des cages individuelles dès le premier jour de gestation.

Pour l'étude de l'effet de la morphine sur l'activité de l'axe corticotrope maternel, quelques femelles gravides sont injectées de solvant ou de morphine selon le protocole décrit précédemment (cf. 2ème partie) ; elles sont sacrifiées par décapitation 90 minutes après la dernière injection quotidienne, le matin du 14ème, du 16ème ou du 18ème jour de gestation. Leur sang est collecté, centrifugé 15 minutes à 5000 rpm ; le plasma est congelé à -30°C jusqu'au jour du dosage de la corticostérone. L'hypothalamus de ces femelles est également prélevé et congelé à -80°C pour déterminer son contenu en CRF.

D'autres femelles gravides (n=32) sont réparties, au 10ème jour de gestation, en deux groupes expérimentaux :

- les femelles du premier groupe sont surrénalectomisées bilatéralement (SX) par approche dorso-lombaire sous anesthésie à l'éther, le matin du 10ème jour. Une solution de NaCl (0,9%) leur est offerte comme boisson ;
- les femelles du second groupe sont pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX), le 10ème jour de gestation sous anesthésie à l'éther.

Dans chacun de ces deux groupes expérimentaux, la moitié des femelles sont injectées de solvant (S) l'autre moitié de morphine (M) suivant le protocole décrit précédemment (cf. 2ème partie).

Quelques femelles surrénalectomisées (n=3) sont injectées de corticostérone (0,05 mg/injection) en association avec la morphine dans un volume total d'injection de 0,5 ml.

Le matin du 21ème jour de gestation, après sacrifice des mères par décapitation et, collecte de leur sang, les nouveau-nés sont prélevés par césarienne et sacrifiés immédiatement ou 90 minutes après la délivrance en fonction du paramètre que l'on souhaite étudier. Le foie de ces animaux est prélevé et pesé. Tous les autres organes prélevés (surrénales, cerveau) sont traités comme indiqué précédemment (cf. 4ème partie).

II.2. Dosages radioimmunologiques des hormones.

Les surrénales des nouveau-nés sont broyées dans 500 µl de solution saline (NaCl 0,9%). Après centrifugation (15 min. à 14 000 rpm à 4°C), le surnageant est congelé jusqu'au jour du dosage de l'aldostérone et de la corticostérone.

Ces deux hormones sont dosées dans le plasma et les surrénales par méthodes radioimmunologiques selon les protocoles décrits antérieurement (cf. 3ème et 1ère partie).

L'hypothalamus des mères est broyé dans 1 ml d'une solution d'HCl 0,1M. Les homogénats sont ensuite placés 30 min. à 70°C, pour inactiver les enzymes protéolytiques, puis centrifugés 15 min. à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant est alors congelé à -30°C jusqu'au jour du dosage du CRF. Le contenu hypothalamique en CRF est déterminé par dosage radioimmunologique selon le protocole décrit précédemment (cf. 4ème partie).

II.3. Quantification des ARNm du CRF et de la POMC par hybridation *in-situ* et marquage immunocytochimique du CRF.

La quantification des ARNm de la POMC dans l'adénohypophyse et du CRF dans les NPV des nouveau-nés à la naissance est réalisée selon le protocole antérieurement décrit (cf. 4ème partie).

La révélation par immunocytochimie du CRF dans l'éminence médiane de ces nouveau-nés a été décrite dans la 4ème partie de ce mémoire.

II.4. Statistiques.

Les données ont été soumises à une analyse de variance à voies multiples (ANOVA), suivie du test de Dunnett. La signification statistique est fixée à $P < 0,05$.

III. RESULTATS.

III.1. Contenu hypothalamique en CRF et corticostéronémie chez les mères.

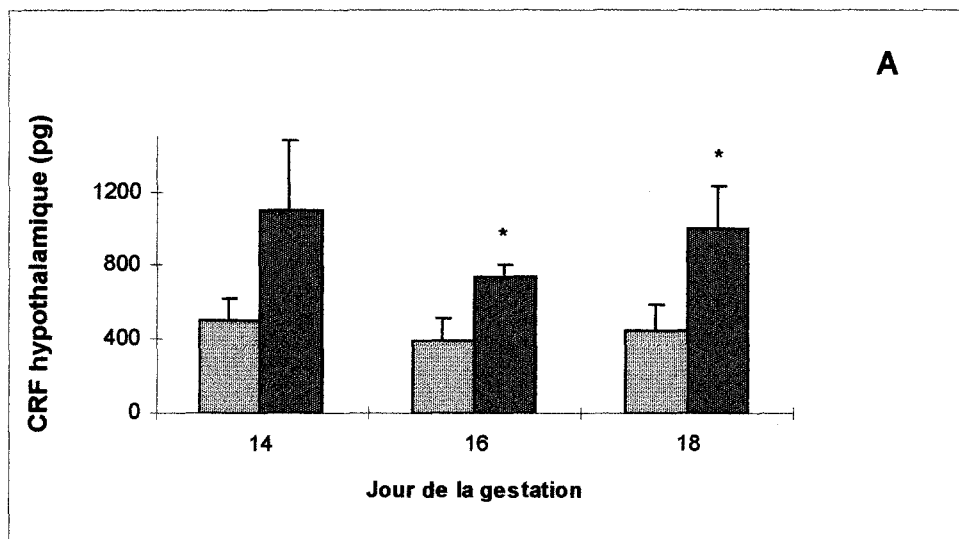
L'injection biquotidienne de morphine à partir du 11ème jour de gestation augmente le contenu hypothalamique en CRF chez les femelles gestantes, 90 minutes après l'injection du matin, aux 14ème, 16ème et 18ème jour de la gestation (Fig. 34A).

De même, la corticostéronémie de ces femelles est significativement augmentée à tous les stades testés (Fig. 34B).

III.2. Masse surrénalienne.

L'exposition prénatale à la morphine induit à la naissance une atrophie des surrénales chez les nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées mais non chez les nouveau-nés de mères surrénalectomisées (Fig. 35). Chez ces derniers les surrénales sont par ailleurs significativement plus grosses que celles des nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées, injectées de morphine (Fig. 35).

L'injection conjointe de corticostérone et de morphine chez des mères surrénalectomisées provoque une atrophie des surrénales chez les nouveau-nés à terme (Fig. 36). Celles-ci sont significativement plus petites que celles des nouveau-nés de mères surrénalectomisées injectées seulement de morphine (Fig. 36).



Solvant ■
Morphine ■

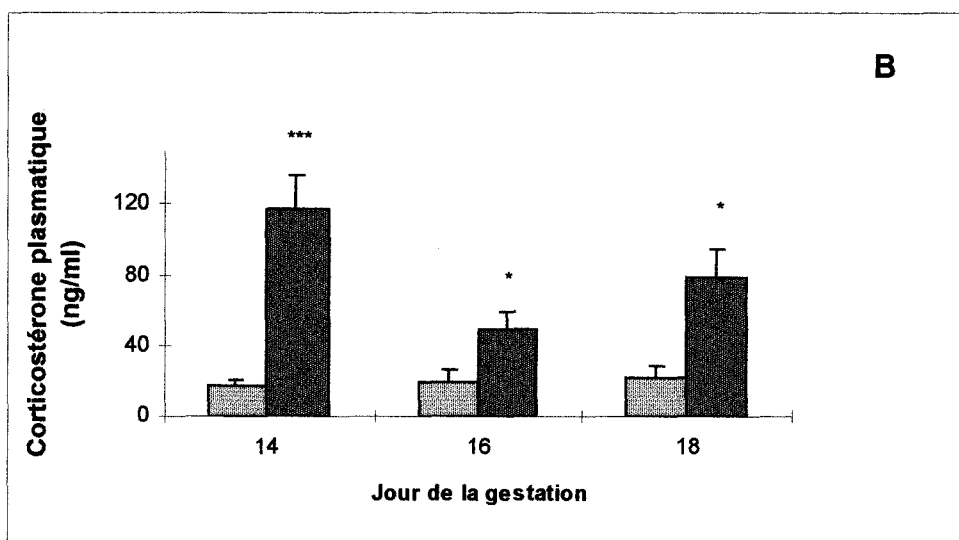


Figure 34 : Effets d'un traitement au solvant ou à la morphine du 11 au 18ème jour de la gestation (injections biquotidiennes de 3mg de sulfate de morphine), sur le contenu hypothalamique en CRF (A) et la corticostéronémie (B) chez des femelles gestantes, 90 min. après l'injection du matin.

Moyenne \pm ESM (n=3-5). Analyse statistique :

- Morphine versus solvant : * P < 0,05 *** P < 0,001.

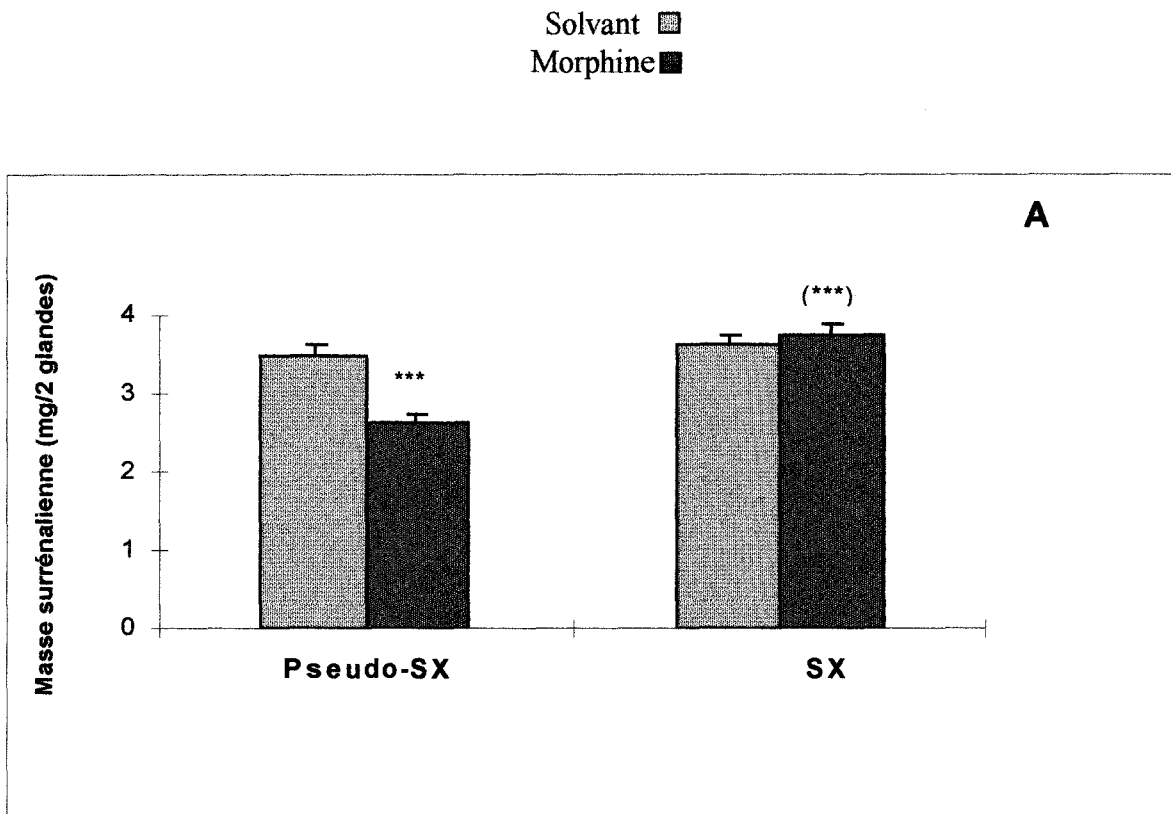


Figure 35 : Masses surrénaliennes à la naissance, chez des nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant (▨) ou de morphine (■) au cours de la gestation.

- . Moyennes \pm ESM (n=37-44) Analyse statistique :
- Pseudo-SX/morphine vs Pseudo/SX solvant : *** P<0,001
 - SX/morphine vs Pseudo/SX morphine : (***) P<0,001

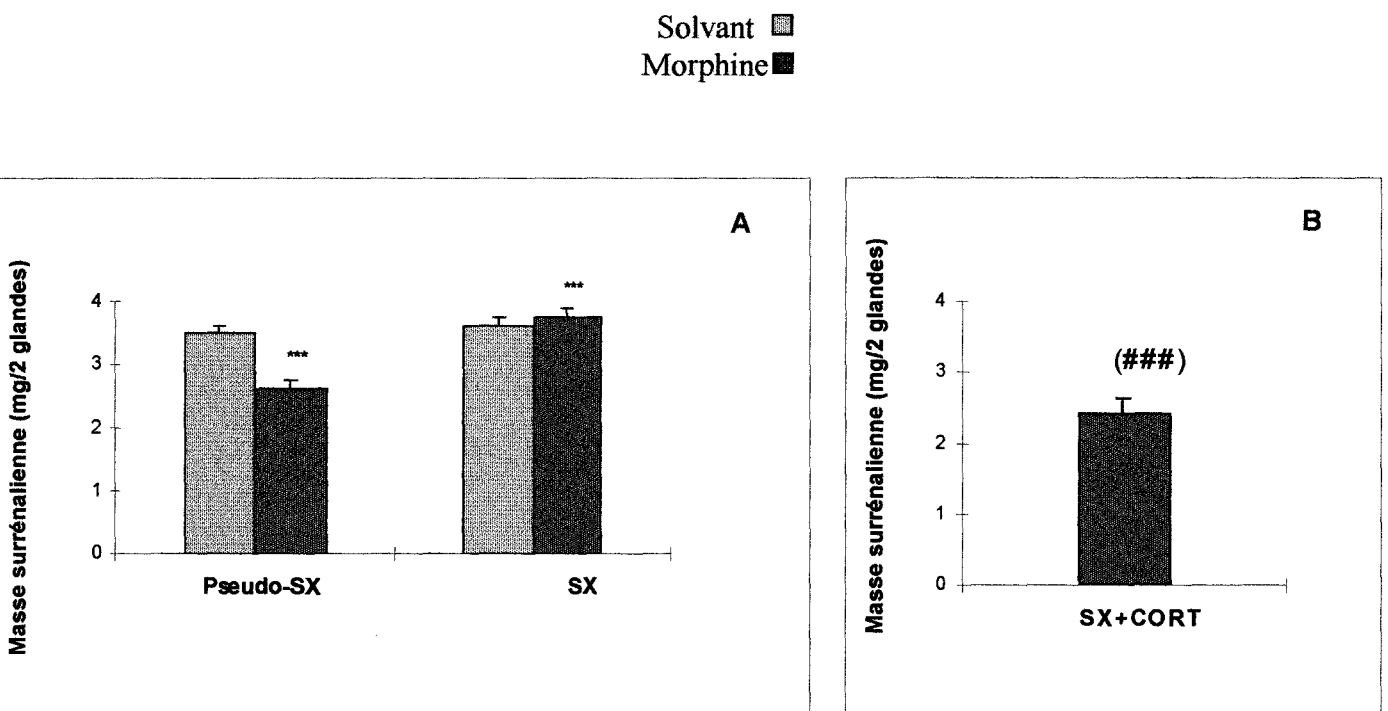




Figure 36 : (A) Rappel de la masse surrénalienne à la naissance, chez des nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant () ou de morphine () au cours de la gestation (Cf. figure 35).

(B) Effet de l'injection conjointe de 0,05mg de corticostérone (CORT) et de morphine du 11 au 18ème jour de la gestation à des femelles gravides, sur la masse surrénalienne des nouveau-nés à terme.

. Moyennes \pm ESM (n=22-44) Analyse statistique :

-SX+CORT/morphine vs SX/morphine : (###) $P < 0,001$

- Pseudo-SX/morphine vs Pseudo-SX/solvant : *** $P < 0,001$

- SX/morphine vs Pseudo-SX/morphine : (***) $P < 0,001$

III.3. Corticostérone surrénalienne et plasmatique.

Chez les nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées, le traitement prénatal à la morphine empêche l'élévation de la corticostéronémie qui survient 90 min. après la naissance chez les nouveau-nés de mères injectées de solvant (Fig. 37A) mais n'affecte pas le contenu surrénalien en corticostérone qui demeure stable (Fig. 37B).

Chez les nouveau-nés de mères surrénalectomisées, injectées de solvant ou de morphine, la corticostéronémie s'élève de manière comparable 90 min. après la délivrance (Fig. 37A). A la naissance, le contenu surrénalien en corticostérone est comparable chez les nouveau-nés des deux groupes expérimentaux, il est significativement plus élevé que celui des nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées injectées soit de morphine soit de solvant (Fig. 37B). Le contenu surrénalien en corticostérone reste stable au cours de la période postnatale précoce, sauf chez les nouveau-nés de mères surrénalectomisées injectées de morphine qui présentent une diminution 90 min. après la délivrance.

III.4. Contenu adénohypophysaire en ARNm de la POMC.

Le contenu adénohypophysaire en ARNm de la POMC chez les nouveau-nés n'est pas significativement affecté par les traitements des mères ou par les opérations qu'elles ont subies (Fig. 38).

III.5. Contenu hypothalamique en CRF et ARNm du CRF.

Le contenu hypothalamique en CRF est significativement diminué chez les nouveau-nés de mères pseudo-opérées traitées à la morphine mais non chez ceux qui proviennent de mères surrénalectomisées également injectées de morphine (Fig. 39A).

Le contenu en ARNm du CRF des NPV de l'hypothalamus n'est pas affecté par l'exposition prénatale à la morphine que la mère soit surrénalectomisée ou pseudo-surrénalectomisée (Fig. 39B).

III.6. Aldostérone plasmatique et surrénalienne.

Chez les nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées injectées de solvant, les taux d'aldostérone s'élèvent dans le plasma et les surrénales 90 min. après la naissance (Fig. 40A/B).

L'exposition prénatale à la morphine s'accompagne chez les nouveau-nés d'une augmentation importante et significative de l'aldostéronémie et du contenu des surrénales en aldostérone au moment de la naissance et d'une stabilité de ces deux paramètres 90 min. après la délivrance (Fig. 40A/B).

A la naissance, l'aldostéronémie des nouveau-nés de mères surrénalectomisées injectées de solvant est significativement plus faible que celle de nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées également injectées de solvant (Fig. 40A). A l'inverse leur contenu surrénalien en aldostérone est fortement augmenté (Fig. 40B). Ces nouveau-nés présentent 90 min. après la délivrance une élévation de l'aldostéronémie (Fig. 40A) sans modification du contenu surrénalien en aldostérone (Fig. 40B).

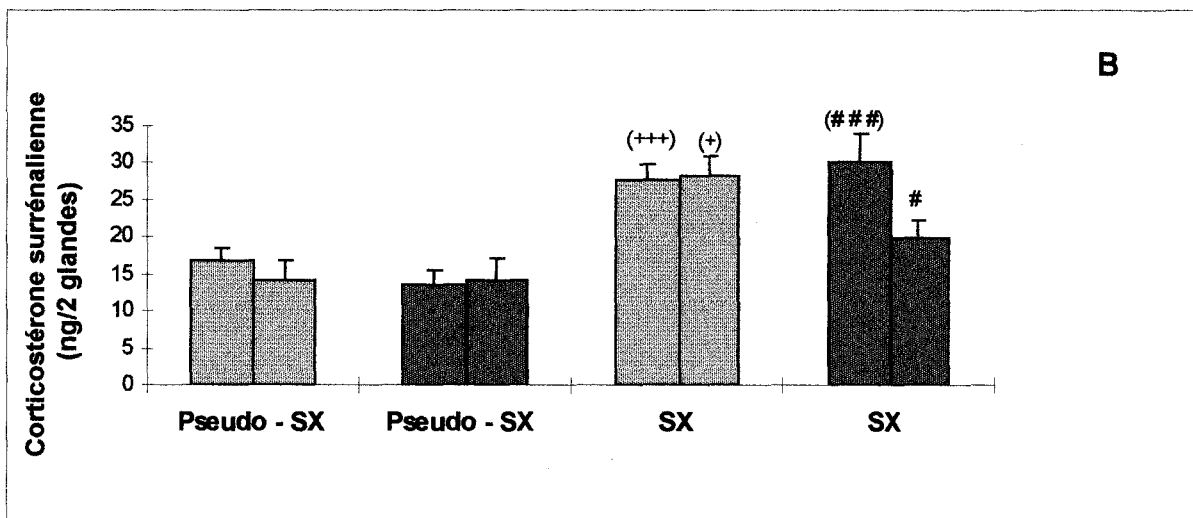
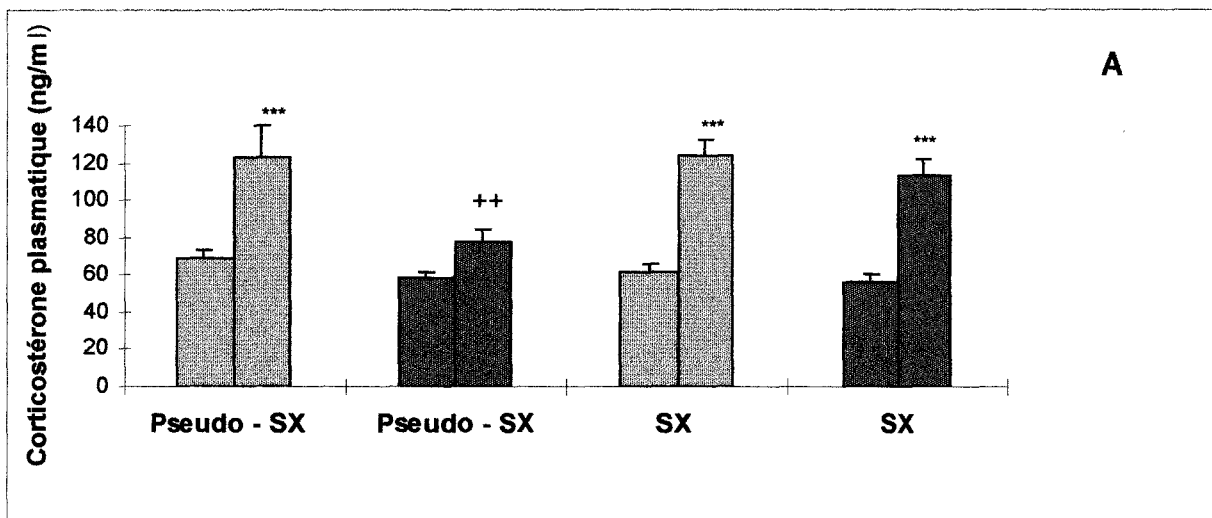


Figure 37: Concentrations plasmatique (A) et surrénalienne (B), en corticostérone, à la naissance (colonnes de gauche) et 90 min. après (colonnes de droite) chez des nouveau-nés issus de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant (□) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyennes \pm ESM (n=10-32). Analyse statistique :

- Versus 0 minute : *** P<0,001
- SX/S vs Pseudo-SX/S (+) P<0,05 (+++) P<0,001
- SX/M vs SX/S # P<0,05
- Pseudo-SX/M vs Pseudo-SX/S ++ P<0,01
- SX/M vs Pseudo-SX/M (###) P<0,001

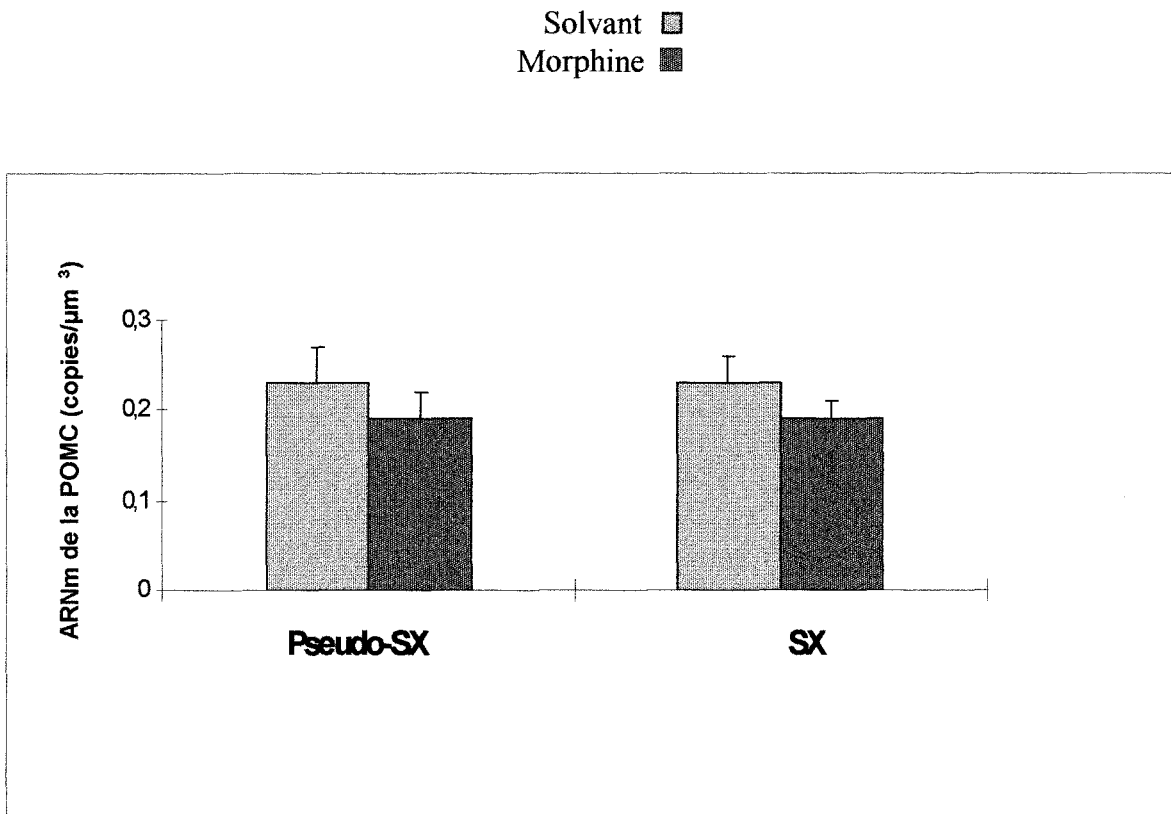
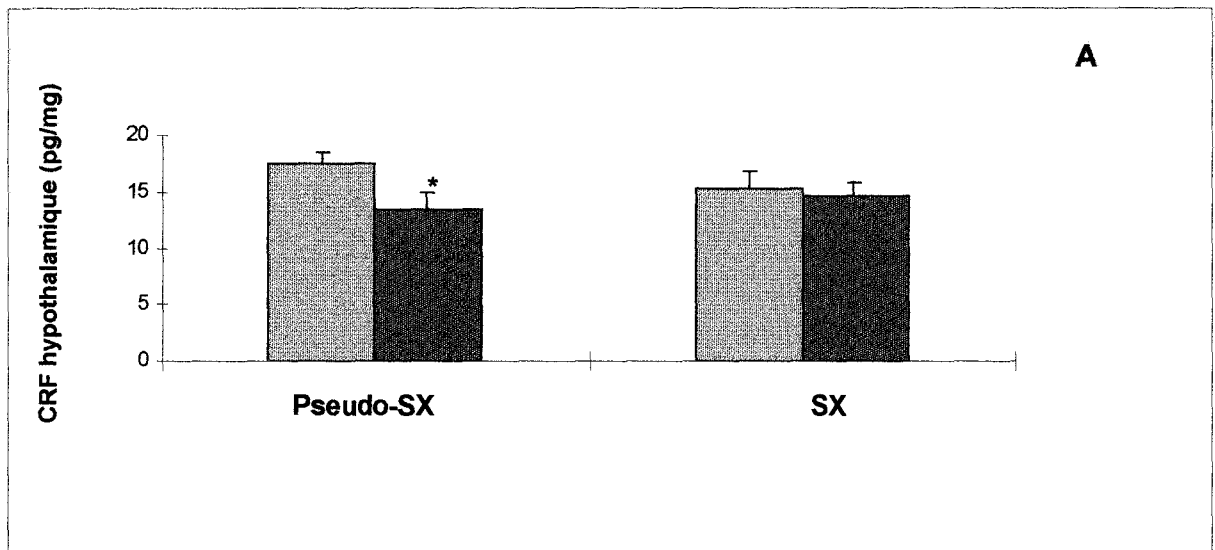




Figure 38 : Quantification du signal d'hybridation *in-situ*, de l'expression de la POMC adénohypophysaire chez des nouveau-nés à la naissance issus de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant () ou de morphine ().

Moyennes \pm ESM (n=6-7). Il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents groupes expérimentaux.



Solvant 
 Morphine 

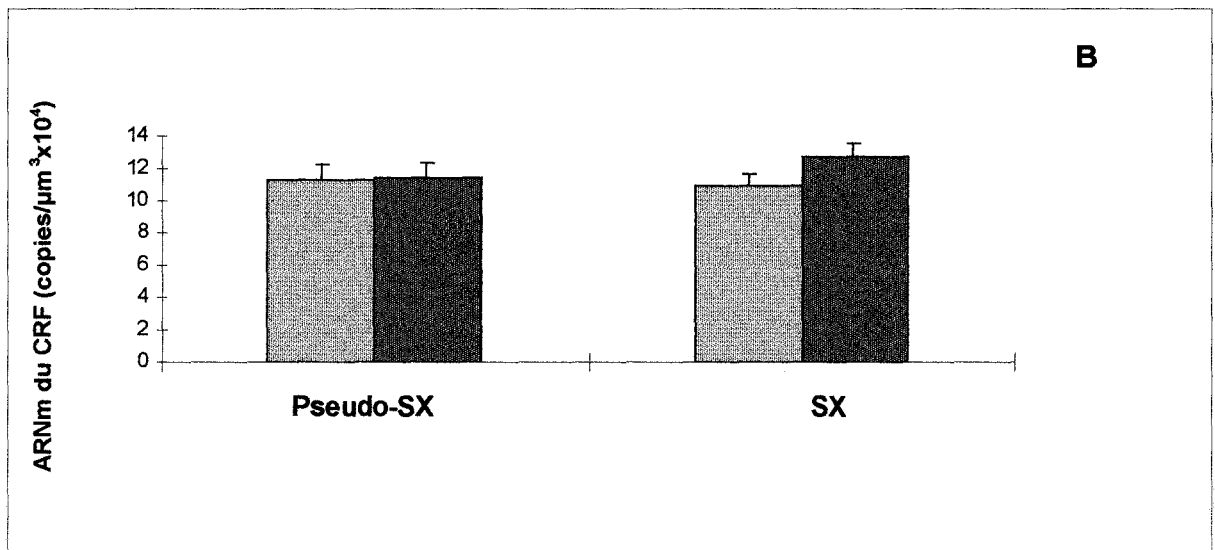
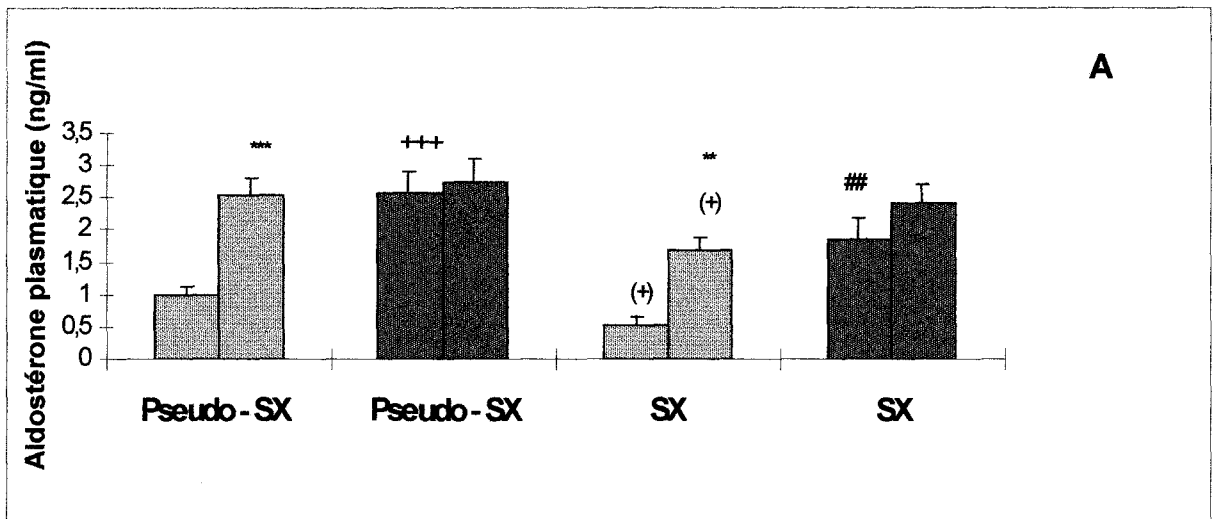


Figure 39: Contenus de l'hypothalamus en CRF (A) et des NPV en ARNm du CRF (B), chez des nouveau-nés à la naissance, issus de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant (▨) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyennes \pm ESM (n=7-12). Analyse statistique :
 - Pseudo-SX/M vs Pseudo-SX/S * P<0,05



Solvant (□)
Morphine (■)

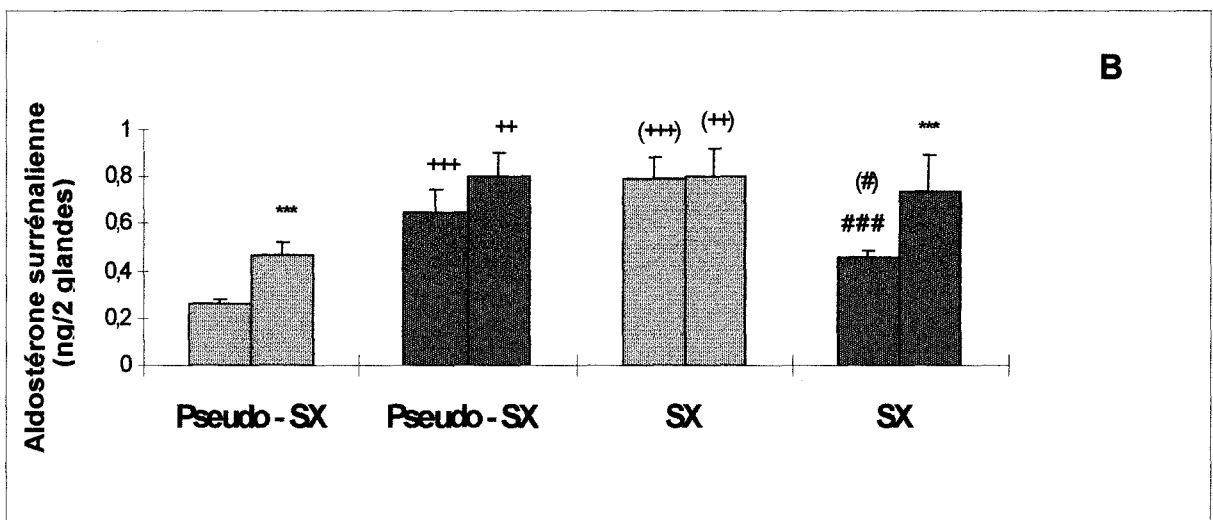


Figure 40 : Concentrations plasmatique (A) et surrénalienne (B), en aldostérone, à la naissance (colonnes de gauche) et 90 min. après (colonnes de droite) chez des nouveau-nés issus de mères pseudo-surrénalectomisées (Pseudo-SX) ou surrénalectomisées (SX) injectées de solvant (□) ou de morphine (■) durant la gestation.

Moyennes \pm ESM (n=10-34). Analyse statistique :

- Versus 0 minute : ** P<0,01 *** P<0,001
- Pseudo-SX/M vs Pseudo-SX/S ++ P<0,01 +++ P<0,001
- SX/S vs Pseudo-SX/S (+) P<0,05 (++) P<0,01 (++++) P<0,001
- SX/M vs SX/S ## P<0,01 #### P<0,001
- SX/M vs Pseudo-SX/M (#) P<0,05

A la naissance, l'aldostéronémie est plus élevée chez les nouveau-nés de mères surrénalectomisées injectées de morphine que chez les nouveau-nés de mères surrénalectomisées injectées de solvant tandis que le contenu de leurs surrénales en aldostérone est diminué (Fig. 40 A/B). Dans les 90 min. qui suivent la naissance, l'aldostéronémie demeure élevée chez les nouveau-nés exposés prénatalement à la morphine (Fig. 40A) tandis que le contenu surrénalien en aldostérone augmente (Fig. 40B).

III.7. Aldostéronémie maternelle.

Au moment du sacrifice, l'aldostéronémie est significativement plus élevée chez les mères pseudo-surrénalectomisées injectées de morphine (M) que chez celles qui ont reçu du solvant (S) [M : $1,80 \pm 0,40$ ng/ml (n=5) ; S : $0,94 \pm 0,11$ ng/ml (n=6) ; $P < 0,05$]. Par contre l'aldostéronémie est comparable chez les mères surrénalectomisées, qu'elles aient reçu de la morphine ou du solvant [M : $0,67 \pm 0,28$ ng/ml (n=4) ; S : $0,50 \pm 0,21$ ng/ml (n=3) ; $P > 0,05$].

IV DISCUSSION

IV.1. Effet de l'injection de morphine à des femelles gestantes sur l'activité de leur axe corticotrope.

Nous avons montré que l'administration de morphine à des femelles gravides à compter du 11ème jour de gestation, élève la corticostéronémie le matin des 14ème, 16ème et 18ème jours 90 minutes après l'injection. Cet effet doit résulter d'une activation de l'axe corticotrope maternel puisqu'il va de pair avec une élévation du contenu de l'hypothalamus en CRF, qui peut être le reflet d'une production accrue de CRF malgré une probable augmentation de sa sécrétion.

Chez le rat mâle adulte, de nombreuses données de la littérature font état d'un effet stimulant de la morphine sur l'activité de l'axe corticotrope via une action directe de la drogue sur les neurones hypothalamiques à CRF ou via une action indirecte mettant en jeu d'autres neurones (*revue in* PECHNICK 1993). Parmi eux seraient concernés des neurones catécholaminergiques (*MARTINEZ-PINERO et coll.* 1994).

Les foetus de mères injectées de morphine sont donc susceptibles de recevoir de la corticostérone en provenance du compartiment maternel en plus grande quantité que ceux de mères injectées de solvant tout au moins entre le 11ème et le 16ème jour de gestation puisque, au delà de ce stade (E16), l'activité 11 β -HSD de type 2 placentaire doit réduire le transfert de corticostérone de la mère au foetus (*revue in* BURTON et WADDELL 1994).

IV.2. Effet de l'injection de morphine à des mères surrénalectomisées sur l'axe corticotrope du nouveau-né et la fonction glucocorticoïde des surrénales.

La surrénalectomie maternelle, la veille du premier jour de traitement par la morphine prévient les effets de cette drogue sur l'axe corticotrope du nouveau-né. Ainsi, à la naissance, les nouveau-nés des mères surrénalectomisées injectées de morphine, ne présentent pas :

- d'atrophie surrénalienne et d'hyposécrétion de corticostérone durant la période postnatale précoce,
- de diminution du contenu hypothalamique en CRF et de l'immunoréactivité CRF-like au niveau de leur éminence médiane (données non montrées),
- de diminution de l'expression de la POMC au niveau adénohypophysaire.

A ce propos signalons que nous n'avons pas retrouvé, dans l'adénohypophyse des nouveau-nés de mères pseudo-surrénalectomisées injectées de morphine, de diminution significative du contenu en ARNm de la POMC comme nous l'avons observée chez les nouveau-nés de mères non surrénalectomisées injectées de morphine (Cf. 4ème partie). Ce résultat a priori surprenant pourrait résulter d'une importante variabilité entre les nouveau-nés au sein de ce groupe expérimental. En effet les nouveau-nés de 1 des 3 portées de ce groupe, ont présenté des teneurs adénohypophysaires en ARNm de la POMC nettement supérieures aux deux autres, ce qui a conduit à une augmentation de la valeur moyenne à l'intérieur de ce groupe et donc à une perte de la signification statistique entre ces nouveau-nés et ceux de mères pseudo-surrénalectomisées injectées de solvant. L'absence de différence significative entre nouveau-nés de mères exposées à la morphine et ceux de mères exposées au solvant pourrait aussi résulter d'un effet de stress maternel persistant lié à la pseudo-surrénalectomie.

La surrénalectomie maternelle s'accompagne également chez les nouveau-nés des deux groupes expérimentaux (morphine et solvant) d'une élévation du contenu surrénalien en corticostérone ainsi que d'une sécrétion accrue de corticostérone puisque, au moment du sacrifice à terme, la corticostéronémie maternelle est quasi-comparable chez les mères surrénalectomisées injectées de solvant ou de morphine (données non montrées). Ces résultats sont en accord avec le fait que la corticostérone produite par les surrénales foetales traverse la barrière placentaire et qu'elle constitue dès E18 une fraction non négligeable de la corticostéronémie maternelle (DUPOUY *et coll.* 1975). Par ailleurs, la surrénalectomie maternelle pourrait supprimer le feed-back négatif exercé par la corticostérone maternelle sur l'activité de l'axe corticotrope du fœtus, entraînant par là une activation soutenue des surrénales foetales par l'ACTH et une synthèse accrue de corticostérone.

Enfin, l'apport de corticostérone en même temps que celui de morphine, à des mères surrénalectomisées, à des doses inférieures à celles qui reproduisent la réponse glucocorticoïde à un stress maternel (BARBAZANGES *et coll.* 1996), mais à des doses compatibles avec les quantités de corticostérone vraisemblablement sécrétées en réponse aux injections répétées de morphine, chez des mères intactes, provoque une atrophie surrénalienne chez les nouveau-nés.

Ces observations et celles de nombreux auteurs relatives aux effets d'une hyperactivité de l'axe corticotrope maternel (FAMELI *et coll.* 1994) ou d'une administration de dexaméthasone aux mères (DUPOUY *et coll.* 1987 ; HRISTIC *et coll.* 1995) sur l'axe corticotrope des foetus et nouveau-nés, nous permettent de conclure que la corticostérone maternelle sécrétée suite aux injections répétées de morphine, est responsable de l'atrophie des surrénales néonatales et de leur hypoactivité via une inhibition de leur axe corticotrope.

IV.3. Effet de l'injection de morphine à des mères surrénalectomisées sur la fonction minéralocorticoïde des surrénales du nouveau-né.

La surrénalectomie maternelle stimule la production et la sécrétion d'aldostérone chez les nouveau-nés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que cette opération est susceptible de perturber le maintien de l'équilibre hydrominéral de la mère et des foetus et d'entraîner une élévation de la kaliémie, responsable d'une stimulation de la sécrétion d'aldostérone.

Par ailleurs, la surrénalectomie maternelle, en stimulant l'axe corticotrope des foetus, peut entraîner une activation durable des surrénales par l'ACTH qui produisent davantage de glucocorticoïdes par leur zone fasciculo-réticulée et davantage de minéralocorticoïdes par leur zone glomérulée.

Toutefois, la surrénalectomie maternelle n'abolit pas les effets d'une exposition prénatale à la morphine sur la fonction minéralocorticoïde des surrénales néonatales comme elle le fait pour la fonction glucocorticoïde. On peut donc affirmer que les effets de la morphine sur la fonction minéralocorticoïde foetale et néonatale ne sont probablement pas tributaires de facteurs originaires des surrénales maternelles.

Le mécanisme par lequel la morphine affecte la fonction minéralocorticoïde de la surrénale au cours de la gestation reste à élucider. Dans l'état actuel de nos investigations nous ne pouvons pas préciser quel est le mécanisme par lequel la morphine a un effet sur la fonction minéralocorticoïde. Le contrôle de la production et de la sécrétion d'aldostérone étant multifactoriel, plusieurs facteurs sont susceptibles d'être impliqués ; on peut évoquer en particulier un déséquilibre hydro-minéral, une altération de la sécrétion de l'action d'hormones et/ou de neurotransmetteurs tels que l'ANF, les catécholamines et autres neuropeptides (NPY, VIP)..

En conclusion, nous avons montré que des hormones surrénaliennes maternelles, et plus particulièrement la corticostérone, sont responsables de l'inhibition de l'axe corticotrope et de l'hypoactivité de la fonction glucocorticoïde des surrénales du nouveau-né, lorsque la morphine est injectée aux rates du 11ème au 18ème jour de gestation. Par contre, l'hyperactivité de la fonction minéralocorticoïde chez ces nouveau-nés de mères injectées de morphine est indépendante des hormones surrénaliennes maternelles.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La rate exposée à la morphine au cours de la gestation nous paraît être un bon modèle expérimental permettant de reproduire chez le nouveau-né une atrophie surrénalienne congénitale, comparable à celle qui a été signalée chez le nouveau-né humain de mère toxicomane. Nous avons eu la surprise de constater que la morphine affecte de manière fort différente les fonctions gluco et minéralocorticoïde du cortex surrénalien. La morphine administrée avant la naissance paraît stimuler la sécrétion de corticostérone par les surrénales maternelles : celle-ci traverse le placenta et vient bloquer l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien du fœtus ce qui se traduit à la naissance par une atrophie surrénalienne et une réduction de la fonction glucocorticoïde. Il en va tout autrement pour la fonction minéralocorticoïde puisque la production et la sécrétion d'aldostérone par les surrénales néonatales sont accrues, indépendamment des hormones surrénaliennes maternelles. Cette conséquence sur la fonction minéralocorticoïde n'est pas expliquée dans l'état actuel de nos recherches. On peut émettre l'hypothèse que la morphine induit directement ou indirectement une perturbation du contrôle multifactoriel de la sécrétion d'aldostérone qui met en jeu divers facteurs tels que hormones (dont l'ANF), neurotransmetteurs (en particulier : NA, A, NPY, VIP) et/ou ions (dont le potassium). Par ailleurs, la sécrétion *in-vitro* d'aldostérone par les surrénales de nouveau-nés exposés prénatalement à la morphine n'est pas stimulable par l'ACTH ou l'AII, alors qu'elle l'est dans les mêmes conditions d'incubation par les glandes de nouveau-nés de mères injectées de solvant. Il conviendrait de rechercher si l'insensibilité surrénalienne à ces hormones résulte d'une altération des récepteurs spécifiques, et/ou de la transduction du signal qualitative et/ou quantitative de ces hormones.

Enfin, nous avons montré que l'exposition prénatale à la morphine augmente au niveau du système nerveux central le métabolisme hypothalamique de la sérotonine principalement chez les nouveau-nés femelles. La morphine est susceptible d'agir directement sur les neurones à 5HT (*revue in KUHN et coll.* 1992), ou indirectement via la corticostérone maternelle puisque de nombreuses études ont montré qu'un stress prénatal, qui induit une élévation de la corticostéronémie maternelle (MONTANO *et coll.* 1991 ; OHKAWA *et coll.* 1991 ; BARBAZANGES *et coll.* 1996), perturbe le développement du système sérotoninergique (PETERS 1986, 1988) et augmente le métabolisme de cette amine biogène lorsque les animaux ont atteint l'âge adulte (FAMELI *et coll.* 1994).

L'effet sexuellement dimorphique sur le système sérotoninergique pourrait mettre en cause la corticostérone maternelle chez les nouveau-nés exposés à la morphine, puisque selon différentes études un stress prénatal altère bien de manière sexuellement dimorphique le système sérotoninergique (FAMELLI *et coll.* 1994 ; NOSENKO 1996), suite à une perturbation des interactions stéroïdes gonadiques/système nerveux central au cours de la vie intra-utérine (*revue in WARD et coll.* 1994 ; *revue in HENRY et coll.* 1996).

Les diverses hypothèses que nous avons formulées suite à ces résultats méritent d'être éprouvées par l'expérimentation. Il convient aussi de rechercher si les conséquences neuroendocriniennes néonatales de cette exposition prénatale à la morphine persistent à long terme, lorsque les animaux ont atteint l'âge adulte. En effet, selon les travaux réalisés par l'équipe de VATHY *et coll.*, depuis 1985, l'exposition prénatale à la morphine dans des conditions strictement identiques aux nôtres induisent chez l'adulte deux perturbations principales :

- 1) une altération du comportement sexuel surtout chez la femelle,
- 2) une perturbation sexuellement dimorphique du contenu et du métabolisme hypothalamique de la noradréline.

Les résultats de VATHY *et coll.*, s'ils sont confirmés par les études en cours dans notre laboratoire viennent étayer notre dernière hypothèse puisque le déterminisme du futur comportement sexuel normal de l'adulte tout comme le développement du système noradrénergique hypothalamique sont tributaires d'une sexualisation anatomique et fonctionnelle du cerveau durant la période périnatale (*revue in* WARD 1994 ; *revue in* SIDDIQUI et GILMORE 1988). De telles altérations comportementales et métaboliques ont également été rapportées chez des animaux adultes exposés à un stress prénatal (*revue in* WARD *et coll.* 1994 ; *revue in* FAMELLI *et coll.* 1994). Dès lors, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que les effets de l'exposition prénatale à la morphine signalés par VATHY et son groupe, sont associés à la production de corticostérone maternelle.

Si toutes les perturbations que nous avons observées chez les nouveau-nés, persistent jusqu'à l'âge adulte, alors, une telle exposition *in-utero* à la morphine pourrait avoir de nombreuses répercussions physiopathologiques. Signalons en particulier que l'altération du système sérotoninergique chez la femelle paraît être un des facteurs impliqué dans les syndromes de dépression (VAN PRAAG 1982). A ce propos, des études ont montré que les individus de sexe féminin, aussi bien chez le rat (KENNETT *et coll.* 1986) que chez l'homme (WEISSMAN et KLERMAN 1977), sont plus vulnérables que les individus de sexe masculin. De plus, une élévation des taux plasmatiques de glucocorticoïdes est fréquemment observée dans cette maladie (MURPHY 1991) ce qui suggère une altération du fonctionnement de l'axe corticotrope.

Des perturbations durables du fonctionnement de l'axe corticotrope pourraient avoir également des répercussions non seulement métaboliques, mais également comportementales, en particulier dans les processus d'adaptation-désadaptation de l'individu à son environnement.

De plus, des altérations des processus de régulation de l'équilibre hydrominéral de l'organisme pourraient également figurer parmi les conséquences à long terme d'une exposition prénatale à la morphine.

Enfin, si les observations de VATHY *et coll.* (1992, 1994, 1995) relatives aux catécholamines hypothalamiques sont confirmées et que les altérations du système sérotoninergique hypothalamique que nous avons observées sont toujours présentes à l'âge adulte ; alors, l'exposition prénatale à la morphine pourrait à long terme affecter le fonctionnement des axes hypothalamo-hypophyso gonadique et surrénalien.

L'extrapolation à l'homme des résultats d'études menées chez le rat avec la morphine est toujours délicate, d'autant que chez celui-ci, à l'inverse du rat, l'injection chronique ou aiguë d'opiacés paraît inhiber l'activité de l'axe corticotrope (*revue in* KREEK 1996).

S'il en est bien ainsi chez l'homme, l'atrophie surrénalienne observée à la naissance chez des enfants de mères toxicomanes (*revue in* VATHY et KATAY 1985)

relèverait plutôt d'une action directe de ces drogues sur l'axe corticotrope du fœtus en développement. Puisqu'il n'existe pas de données concernant le fonctionnement des surrénales de ces enfants dans la littérature, nos résultats ne peuvent que proposer des éventuelles altérations des fonctions corticales surrénaliennes chez ces enfants. Pour l'instant, nos observations relatives au système sérotoninergique hypothalamique du rat ne peuvent être extrapolées à l'homme ; néanmoins différentes études ont montré que les enfants exposés *in-utero* à des opiacés (héroïne, morphine) présentent des séquelles neurologiques et comportementales au cours des premières années de leur vie. Parmi elles on peut signaler une hyperactivité, un manque d'attention soutenue, des perturbations du comportement de prise alimentaire et des altérations du sommeil (*revue in* NICHTERN 1971 ; *revue in* WILSON 1973 ; FINNEGAN 1995). Enfin, des enfants de 5 ans et demi, dont les mères ont utilisé une association de cocaïne, d'héroïne et/ou de méthadone durant la grossesse, présentent un retard du développement cognitif se traduisant par un retard du développement du langage et de la communication, ainsi qu'une capacité réduite à s'adapter à une tâche (VAN BAAR et DE GRAAF 1994).

Bien que des études ne semblent pas avoir été réalisées à notre connaissance chez des individus plus âgés, il est probable que les enfants exposés *in-utero* à ces drogues présentent des altérations du fonctionnement du cerveau, dont le système sérotoninergique pourrait, au moins en partie, en être affecté.

Enfin, pour conclure et élargir le débat sur les conséquences à long terme d'une perturbation de la vie intra-utérine, je voudrais rappeler de récentes données puisées dans l'actualité.

En 1994, Richard HERRNSTEIN et Charles MURRAY, dans un livre à succès « *The Bell Curve* » soutenaient une pseudo-démonstration de l'héritabilité génétique de l'intelligence (estimée alors à 80%), jamais reconnue par la communauté internationale des spécialistes comme une vérité scientifique, et qui, de plus, soutenait une thèse aux relents racistes : expliquer par les gènes des différences intellectuelles prétendues existant entre hommes blancs et hommes noirs. La parution de ce livre, en particulier aux Etats-Unis, a relancé récemment le débat entre environnementalistes et partisans du « tout-génétique » dans la détermination de l'intelligence, les premiers considérant que les interactions avec l'environnement : social, familial, scolaire... déterminent notre personnalité ; les seconds estimant, au contraire, que l'intelligence n'est que l'expression de nos gènes, hérités de nos parents.

Dans ce débat, une toute nouvelle donnée jusqu'alors complètement occultée à fait une entrée remarquable : la vie intra-utérine aurait une influence nette et comptabilisable sur le quotient intellectuel (QI). Elle compterait pour 20% dans le QI des jumeaux (qui ont partagé le même environnement utérin à la même période), mais seulement pour 5% dans celui de simples frères et soeurs, selon le psychiatre américain Bernie DEVLIN, auteur avec deux statisticiens, d'une étude parue le 31 juillet 1997 dans la revue *Nature*.

D'après ces auteurs, la partie attribuable aux gènes est inférieure à 50%, le reste demeurant imputable à l'environnement dit « extérieur ». La méthode utilisée dans cette étude est une synthèse de 212 études génétiques menées à travers le monde sur des jumeaux élevés ensemble ou séparément ainsi que sur des frères et soeurs. Le résultat original de cette étude a été de découvrir que les faux jumeaux, génétiquement

différents, ont un QI identique, même s'ils ont été élevés séparément, résultat comparable à celui de vrais jumeaux, au même patrimoine génétique.

Ces données obligent à considérer un nouveau paramètre : l'influence prénatale, carrefour crucial entre l'inné et l'acquis, que les chercheurs ont nommé « effets maternels ».

Bien que la quantification de la part de la génétique et celle de l'environnement n'a pas véritablement de sens dans l'établissement d'une aptitude aussi complexe que celle de l'intelligence, qui d'ailleurs n'a été mesurée que par la mesure du QI, test de performance standardisé et adapté à une certaine culture ; le grand intérêt de cette étude a été de mettre l'accent, de manière probante, sur l'importance de la vie intra-utérine chez l'adulte sur le développement de certains processus cognitifs.

Ces résultats chez l'homme ont remis au goût du jour la nécessité d'explorer plus profondément à l'avenir, les subtiles relations unissant la mère au fœtus, puisque, au cours de la gestation, de nombreux événements sont susceptibles d'influencer la vie ultérieure de l'adulte. Nos résultats et ceux de nombreuses équipes internationales réalisés chez le rat comme modèle expérimental mettent l'accent sur le rôle que pourraient jouer les hormones surrénaliennes maternelles en général, et glucocorticoïdes en particulier dans ces mécanismes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adamson WT, Windh RT, Blackford S, Kuhn CM.** 1991 Ontogeny of μ - and κ -opiate receptor control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. **Endocrinol.**, 129 : 959-964.
- Ahima RS, Harlan RE.** 1990 Charting of type II glucocorticoid receptors-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **Neuroscience**, 39 : 579-604.
- Allen JM, McGregor GP, Woodhams PL, Polak JM, Bloom SR.** 1984 Ontogeny of a novel peptide, neuropeptide Y (NPY) in rat brain. **Brain Res.**, 303 : 197-200.
- Almazan G, Lefebvre DL, Zingg HH.** 1989 Ontogeny of hypothalamic vasopressin, oxytocin and somatostatin gene expression. **Dev. Brain Res.**, 45 : 69-75.
- Antoni FA.** 1996 Mortyn Jones memorial lecture -1995. Calcium check cyclic AMP - corticosteroid feedback in adenohipophysial corticotrophs : Review. **J. Neuroendocrinol.**, 8 : 659-672.
- Appel NM, Kiritsy-Roy JA, Van Loon GR.** 1986 Mu receptors at discrete hypothalamic and brainstem sites mediate opioid peptide-induced increases in central sympathetic outflow. **Brain Res.**, 378 : 8-20.
- Appel NM, Owens MJ, Culp SP, Zaczek R, Cortrera JF, Bisette G, Nemeroff CB, Desouza ER.** 1991 Role of brain corticotropin-releasing factor in the weight-reducing effects of chronic fenfluramine treatment in rats. **Endocrinol.**, 128 : 3237-3246.
- Arai M, Widmaier EP.** 1991 Activation of the pituitary-adrenocortical axis in 1 day-old rats by insulin-induced hypoglycemia. **Endocrinol.**, 129 : 1505-1512.
- Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J.** 1985 Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. **Life Sci.**, 36 : 2085-2092.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM.** 1988 The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response . **Neuron**, 1 : 887-900.
- Attardi B, Ruoslahti E.** 1976 Foetoneonatal oestradiol-binding protein in mouse brain cytosol is foetoprotein. **Nature**, 263 : 685-687.

B

- Baird A, Wehrenberg WB, Shibasaki T, Benoit R, Chong-Li Z, Esch F, Ling N.** 1982 Ovine corticotropin-releasing factor stimulates the concomitant secretion of corticotropin, β -lipotropin, β -endorphin and α -melanotropin by the bovine adenohypophysis in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 108 : 959-964.
- Banks WA, Kastin AJ, Harrison LM, Zadina JE.** 1996 Perinatal treatment of rats with opiates affects the development of the blood-brain barrier transport system. PTS-1. **Neurotoxicol. Teratol.**, 18 : 711-715.
- Baram TZ, Lerner SP.** 1991 Corticotropin-releasing hormone ontogeny of gene expression in the rat hypothalamus. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 9 : 473-478.
- Baram TZ, Schultz L.** 1992 CRH gene expression in the fetal rat is not increased after pharmacological adrenalectomy. **Neurosci. Lett.**, 142 : 215-218.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S.** 1996 Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. **J. Neurosci.**, 16 : 3943-3949.
- Bardo MT, Bhatnagar RK, Gebhart GF.** 1982 Differential effects of chronic morphine and naloxone on opiate receptors, monoamines, and morphine-induced behaviors in preweanling rats. **Dev. Brain Res.**, 4 : 139-147.
- Barraclough CA.** 1992 Neural control of the synthesis and release of Luteinizing hormone-releasing hormone, pages 233-251, Functional anatomy of the neuroendocrine hypothalamus, vol. 168, Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium.
- Becu-Villalobos D, Libertun C.** 1995 Development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron regulation in the female rat. **Cell. Molec. Neurobiol.**, 15 : 165-176.
- Belcheva MM, Dawn S, Barg J, McHale JR, Matthew TH, Ignatova E, Coscia CJ.** 1994 Transient down-regulation of neonatal rat brain μ -opioid receptors upon in utero exposure to buprenorphine. **Dev. Brain Res.**, 80 : 158-162.



- Bernet F, Maubert E, Bernard J, Montel V, Dupouy JP.** 1994a In vitro steroidogenic effects of neuropeptide Y (NPY₁₋₃₆) Y1 and Y2 receptor agonists (Leu³¹-Pro³⁴ NPY₁₈₋₃₆) and peptide YY (PYY) on rat adrenal capsule/zona glomerulosa. **Regul Peptides**, 52 : 187-193.
- Bernet F, Bernard J, Laborie C, Montel V, Maubert E, Dupouy JP.** 1994b Neuropeptide Y (NPY)-and vasoactive intestinal peptide (VIP)-induced aldosterone release by catecholamines via β 1 adrenergic receptors. **Neurosci. Lett.**, 166 : 109-112.
- Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC.** 1982 Endocrinologie Pédiatrique. Edit. Payot.
- Bierich JR, Kersten I, Maruektad S.** 1959 Plasma corticosteroids and their responsiveness to corticotrophin after long term therapy with corticosteroids and corticotrophin. **Acta Endocrinol.**, 31 : 40-48.
- Blasquez C, Jegou S, Friard O, Tonon MC, Fournier A, Vaudry H.** 1995 Effect of centrally administered neuropeptide Y on hypothalamic and hypophyseal proopiomelanocortin-derived peptide in the rat.
- Boiko SS, Voromina TA, Zherdev VP, Chobanov NG.** 1995 The transplacental transport and effect of morphine administered in the prenatal period on its level in adult rats. **Eksperiment. Klinich. Farmakol.**, 58 : 42-44.
- Bongain A.** 1991 Mise au point sur VIH et grossesse. A propos d'une série personnelle de 307 cas. Thèse de médecine, Nice, 202p.
- Borisova NA, Saporonova AY, Proshlyakoava EV, Ugrumov MV.** 1991 Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats : synthesis, uptake and release of catecholamines. **Neuroscience**, 43 : 223-229.
- Borisova NA, Proshlyakova EV, Saporonova AY, Ugrumov MV.** 1996 Androgen-dependent sex differences in the hypothalamic serotonergic system. **Eur. J. Endocrinol.**, 134 : 232-235.
- Bornstein S, Ehrhart-Bornstein M.** 1992 Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. **Endocrinol.**, 131 : 3126-8.
- Boudouresque F.** 1987 Thèse de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier II, France. Régulation de la fonction corticosurrénalienne chez le rat au cours du développement.

- Boudouresque F, Guillaume V, Grino M, Strbak V, Chautard T, Conte-Devolx B, Oliver C.** 1988 Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinol.*, 48 : 417-422.
- Boutte P, Richelme C, Berard E, Albertini M, Gillet JY, Mariani R.** 1988 Le nouveau-né de mère droguée. *Presse méd.*, 17 : 1405-8.
- Brody MJ, Johnson AK.** 1980 Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. *Front. Neuroendocrinol.*, 6 : 249-267.
- Brooks AN, Howe DC, Porter DWF, Naylor AM.** 1994 Neuropeptide Y stimulates pituitary-adrenal activity in fetal and adult sheep. *J. Neuroendocrinol.*, 6 : 161-166.
- Brown RW, Chapman KE, Edwards CRW, Seckl JR.** 1993 Human placental 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase : evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinol.*, 132 : 2614-2621.
- Brown RW, Diaz R, Robson AC, Kotolevtsev Y, Mullins JJ, Kaufman MH, Seckl JR.** 1996 The ontogeny of 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinol.*, 137 : 794-797.
- Bugnon C, Feldman D, Gouget A, Cardot J.** 1982 Ontogeny of the corticoliberin neuroglandular system in the rat brain. *Nature*, 298 : 159-161.
- Burton PJ, Waddell BJ.** 1994 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase in the rat placenta : developmental changes and the effects of altered glucocorticoid exposure. *J. Endocrinol.*, 143 : 505-513.

C

- Caldani M, Caraty A, Pelletier J, Thiery JC, Tillet Y.** 1991 La libération pulsatile de LH et son contrôle. Dans : la reproduction chez les mammifères et l'homme. (INRA ed, Thibault C, Levasseur MC coord.) pp 70-88.
- Calogero AE.** 1995 Neurotransmitter regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neuron. in *stress* ;. Chrousos GP, McCarty R, Pacak K, Cizza G, Sternberg E, Gold PW, Kvetnansky R (Edd). *Ann. NY Acad. Sci.*, vol 771 : p31-40.

- Carlsson M, Carlsson A.** 1988 A regional study of sex differences in rat brain serotonin. **Prog. Neuro-Phychopharmacol. Biol. Psychiat.**, 12 : 53.
- Chatelain A, Dupouy JP, Allaume P.** 1980 Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationship in the rat : effects of maternal adrenalectomy. **Endocrinol.**, 106 : 1297-1303.
- Chatelain A, Boudouresque F, Chautard T, Dupouy JP, Oliver C.** 1988 Corticotrophin-releasing factor immunoreactivity in the hypothalamus of the rat during the perinatal period. **J. Endocrinol.**, 119 : 59-64.
- Chatelain A, Durand P, Naaman E, Dupouy JP.** 1989 Ontogeny of ACTH₍₁₋₂₄₎ receptors in rat adrenal glands during the perinatal period. **J. Endocrinol.**, 123 : 421-428.
- Chomczynski P, Sacchi N.** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, 162 : 156-159.
- Clendeninn N, Petraits M, Simon EJ.** 1976 Ontological development of opiate receptors in rodent brain. **Brain Res.**, 118 : 157-160.
- Cobrinik RW, Hood RT, Chusid E.** 1959 The effect of maternal narcotic addiction on the newborn infant. Review of literature and report of 22 cases. **Pediatr.**, 24 : 288-304.
- Cohen A.** 1960 Poids des surrénales du foetus de rat décapité injecté d'hydrocortisone ou de corticostimuline à divers stades du développement. **C.R. Soc. Biol.**, 154 : 1396-1400.
- Cohen A, Péchinot D.** 1979 Corticostérone dans le plasma de rat : taux maternel et foetal en fin de gestation et pendant la parturition ; fraction libre et liée. **J. Physiol.**, 75 : 4A.
- Cohen A, Chatelain A, Dupouy JP.** 1983 Late pregnancy maternal and fetal time-course of plasma ACTH and corticosterone after continuous ether inhalation by pregnant rats : Cyto immunological study of fetal hypophyseal. **Cells. Biol. Neonate**, 43 : 220-228.
- Combarnous Y.** 1991 Les gonadotropines : structure, synthèse et fonctions. Dans : la reproduction chez les mammifères et l'homme (INRA ed ; Thibault C, Levasseur MC coord.) pp 53-69.
- Corbier P, Kerdelhue B, Picor R, Roffi J.** 1978 Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during and after birth in the perinatal rat. **Endocrinol.**, 103 : 1985-1991.

- Corbier P, Roffi J, Rhoda J, Valens M.** 1981 Comportement sexuel femelle des rats mâles castrés à la naissance et soumis aux hormones sexuelles femelles : effets de l'heure de la castration. **C.R. Acad. Sci., Paris**, 293 : 649-654.
- Corbier P, Roffi J, Rhoda J.** 1983a Female sexual behavior in male rats : effect of hour of castration at birth. **Physiol. Behav.**, 30 : 613-616.
- Corbier P, Roffi J, Rhoda J, Kerdelhue B.** 1983b Increased activity of the hypothalamo-pituitary-testicular axis at the rat birth : implication in the sexual differentiation of the brain. International symposium on sexual differentiation. Basic and clinical aspects. M Serio, M Motta, M Zanisi and L Martini, Serono. Symposia from Raven Press, New York, 11 : 133-148.
- Corbier P, Dehennin L, Castanier M, Mebazaa A, Edwards DA, Roffi J.** 1990 Sex differences in serum LH and testosterone in the human neonate during the first few hours after birth. **J. Clin. Endocr. Metab.**, 71 : 1344-1348.
- Corbier P, Edwards DA, Roffi J.** 1992 The neonatal testosterone surge : a comparative study. **Arch. Int. Physiol. bioch. biophys.**, 100 : 127-131.
- Czernichow P.** 1982 Endocrinologie du fœtus et du nouveau-né. Physiologie de la grossesse ; coord. M Tournaire. Edit. Masson (Paris), pp 117-124.

D

- D'Agostino J, Henning SJ.** 1981 Hormonal control of postnatal development of corticosteroid-binding globulin. **Am. J. Physiol.**, 24 : E402-406.
- Daikoku S, Adachi T, Kawano H, Wakabayashi K.** 1981 Development of the hypothalamic-hypophysial-gonadotrophic activities in fetal rats. **experiment.**, 37 : 1346-1347.
- Dallman MF, Akana SF, Levin N, Walker CD, Bradbury MJ, Suemaru S, Scribner KS.** 1994 Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Ann NY Acad. Sci.**, 746 : 22-31.
- Dazard.** 1983 Mécanisme d'action de l'ACTH. **Ann. Endocrinol., (Paris)**, 44 : 15-28.

- De Kloet ER, Reul JMHM.** 1987 Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function : a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinol.*, 12 : 83-105.
- De Kloet ER.** 1991 Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol.*, 12 : 95-164.
- Deloof S, Leprêtre A, Montel V, Chatelain A.** 1992 Effect of rat atrial natriuretic factor on in vivo and in vitro aldosterone and corticosterone secretions in the rat during the perinatal period. *Biol. Neonate*, 62 : 145-154.
- Deloff S, Montel V, Chatelain A.** 1994 Effects of rat corticotrophin-releasing factor, arginine vasopressin and oxytocine on the secretions of adrenocorticotrophic hormone and corticosterone in the fetal rat in late gestation : in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Endocrinol.*, 130 : 313-319.
- Deloof S, Van Camp G, Chatelain A.** 1995 Absence of transplacental transfer of atrial natriuretic peptide in the rat : direct experimental evidence. *Med. Sci. Res.*, 23 : 347-349.
- Devlin B, Daniels M, Roeder K.** 1997 The heritability of IQ. *Nature*, 388 : 468-471.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M.** 1996 International Union of Pharmacology. XII classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.*, 48 : 567-592.
- Dupouy JP, Coffigny H, Magre S.** 1975 Maternal and fetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J. Endocrinol.*, 65 : 347-352.
- Dupouy JP, Chatelain A.** 1981 La fonction corticotrope dans la période périnatale : ontogénèse et régulation. *J. Physiol., Paris*, 77 : 955-968.
- Dupouy JP, Chatelain A.** 1984 In vitro effects of corticosterone, synthetic ovine corticotropin releasing factor and arginine vasopressine on the release of adrenocorticotropin by fetal rat pituitary glands. *J. Endocr.*, 101 : 339-344.
- Dupouy JP, Chatelain A.** 1986 Effects of progesterone induced postmaturity on CBG and pituitary-adrenal activities in the rat foetus. *Acta Endocrinol.*, 112 : 396-403.

- Dupouy JP, Chatelain A, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Oliver C.** 1987 Effects of chronic maternal dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat fetus. *Biol. Neonate*, 52 : 216-222.
- Dupouy JP, Hary L, Lalau JD, Grégoire I, Chatelain A.** 1987 Influence périnatale des hormones sexuelles sur l'activation différentielle de la fonction corticotrope au cours d'un stress chez le mâle et la femelle. *Ann. Endocrinol., (Paris)*, 48 : 385-392.
- Dupouy JP.** 1992 Hormones et grandes fonctions. Tome 1, Chap 3. Ellipses (ed) , Paris.
- Durroux T, Gallot-Payet N, Payet MD.** 1991 Effects of adrenocorticotropin on action potential and calcium currents in cultured rat and bovine glomurelosa cells. *Endocrinol.*, 129 : 2139-47.

E

- Eckland DJA, Todd K, Jessop DS, Biswas S, Lightman SL.** 1988 Differential effects of hypothalamic catecholamine depletion on the release of arginine vasopressin and CRF-41 into hypothalamo-hypophyseal portal blood. *Neurosci. Lett.*, 90 : 292-296.
- El Amraoui A.** 1995 La fonction gonadotrope hypothalamo-hypophysaire (neurones à gonadolibérine, cellules gonadotropes) : Détermination, origine et interactions. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I.
- Elfahime EL, Plante M, René F, Félix JM, Koch B.** 1992 Biosynthesis of hepatic corticosteroid -binding globulin : ontogeny and effect of thyroid hormone. *Biochem. Mol. Biol.*, 41 : 135-140.
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH.** 1992 Cloning of a δ opioid receptor by functional expression. *Science*, 258 : 1952-1955.
- Everitt BJ, Hökfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M.** 1984 Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY) - like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neurosci.*, 11 : 443-462.

F

- Fameli M, Kitraki E, Stylianopoulou F.** 1994 Effects of hyperactivity of the maternal hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy on the development of the HPA axis and brain monoamines of the offspring. *Int. Devl. Neurosci.*, 12 : 651-659.
- Feije JJ, Baird A.** 1992 La crinopexie ; un modèle décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. *Méd. Sci.*, 8 : 805-10.
- Finnegan LP.** 1995 Addiction and pregnancy : maternal and child issues. In : *Drug addiction and related clinical problems*, A. Tagliamonte and I. Marenmani (Eds). Springer-Verlag, Vienna, Vol.95, pp 137-147.
- Foster GA, Schultzberg M, Goldstein M, Hökfelt T.** 1985 Ontogeny of phenylethanolamine N-methyltransferase and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in presumptive adrenalin neurons of the fetal rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 236 : 348-381.
- Frankfurt M, Lauder JM, Azmitia E.** 1981 The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus, *Neurosci. Lett.*, 24 : 227-232.
- Frazer AC.** 1976 Drug addiction in pregnancy. *Lancet*, 2 : 896-9.
- Fuller RW.** 1992 The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front. Neuroendocrinol.*, 13 : 250-270.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI.** 1988 Mineralocorticoid action : target-tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242 : 583-585.
- Funder JW.** 1996 Mineralocorticoid receptors and glucocorticoid receptors. *Clin. Endocrinol.*, 45 : 651-656.
- Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati L, Härfstrand A, Yu Z-Y, Granholm L, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA.** 1985 Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel-and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinol.*, 117 : 1803-1812.

G

- Gallot-Payet N, Chouinard L, Balestre MN.** 1991 Mechanisms involved in the interaction of dopamine with angiotensin II on aldosterone secretion in isolated and cultured rat adrenal glomerulosa cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 81 : 11-23.
- Gallot-Payet N.** 1993 Nouveaux concepts sur la régulation de la sécrétion d'aldostérone ; interactions endocrines, paracrines, autocrines et neurocrines. **Méd.Sci.**, 9 : 943-951.
- Gautron JP.** 1992 Lulibérine ou gonadolibérine luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In : *Neuropeptides et neuromédiateurs*, by Sandoz ed, J Epelbaum coordinateur Paris : Imp. Busson, pp. 133-142.
- Genazzani AD, Petraglia F, Bonati M, Genazzani AR.** 1995 Developmental of endogenous opioids system and control of gonadotropin secretion. **Front. Endocrinol.**, 10 : 191-197.
- Gertz BJ, Contreras LN, McComb DJ, Kovacs K, Tyrrell JB , Dallman MF.** 1987 Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. **Endocrinol.**, 120 : 381-388.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L.** 1979 Dynorphin -(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)**, 76: 6666-6670.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE.** 1992 Central hypertensinogenic effects of glycyrrhizic acid and carbenoxolone. **Am. J. Physiol.**, 263 : 1125-1130.
- Grino M, Young III WS, Burgunder JM.** 1989a Ontogeny of expression of corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in the rat pituitary. **Endocrinol.**, 124 : 60-68.
- Grino M, Burgunder JM, Eskay RL, Eiden LE.** 1989b Onset of glucocorticoid responsiveness of anterior pituitary corticotrophs during development is scheduled by corticotropin-releasing factor. **Endocrinol.**, 124 : 2686-2692.
- Grino M, Burgunder JM.** 1992a Ontogeny of expression and glucocorticoid regulation of the arginine vasopressin gene in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **J. Neuroendocrinol.**, 4 : 71-77.

- Grino M, Oliver C.** 1992b — Ontogeny of insulin-induced hypoglycemia stimulation of adrenocorticotropin secretion in the rat : Role of catecholamines. **Endocrinol.**, 131 : 2763-2768.
- Grino M, Héry M, Paulmyer-Lacroix O, Anglade G.** 1995 Estrogens decrease expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in the anterior pituitary of ovariectomized rats. **Endocrine**, 3 : 395-398.
- Grota L.** 1979 Plasma corticosterone response to serotonin altering drugs in the 3 days old rat. **Dev. Psychobiol.**, 12 : 399-405.
- Guillaume V, Conte-Devolx B, Szafarczyk A, Malaval F, Pares-Herbute N, Grino M, Alonso G, Assenmacher I, Oliver C.** 1987 The corticotropin-releasing factor release in rat hypophysial portal blood is mediated by brain catecholamines. **Neuroendocrinol.**, 46 : 143-146.

H

- Habert R, Picon R.** 1982 Control of testicular steroidogenesis in foetal rat : effect of decapitation on testosterone and plasma luteinizing hormone-like activity. **Acta Endocrinol.**, 99 : 466-473.
- Habert R.** 1993 In vivo acute testicular testosterone response to injection of Luteinizing hormone in the rat fetus. **Acta Endocrinol.**, 128 : 268-273.
- Halasz BB, Kasaras B, Lengvari I.** 1972 In Brain Endocrine Interaction. K.M. Knigge, D.E. Scott and A.D. Weindl, Eds. : 27-34. Karger. Basel, Switzerland.
- Hammer RP, Hauser KF.** 1992 Consequences of early exposure to opioids on cell proliferation and neuronal morphogenesis. In : Development of the central nervous system : effects of alcohol and opiates, Wiley-Liss (eds). Plenum Press, New-York, 319-339.
- Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wilkström AC, Okret S, Zhao-Ying Y, Goldstein M, Steinbusch H, Verhofstad A, Gustafsson JA.** 1986 Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons in the rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)**, 83 : 9779-9783.

- Hary L, Dupouy JP, Chatelain A.** 1981 Pituitary response to bilateral adrenalectomy, metyrapone treatment and ether stress in the neonate. *Biol. Neonate*, 39 : 28-36.
- Hazum E, Conn PM.** 1988 Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action. I. the GnRH receptor. *Endocr. Rev.*, 9 : 379-386.
- Hellendall RP, Schambra U, Liu J, Breese GR, Millhorn DE, Lauder JM.** 1992 Detection of Serotonin receptor transcripts in the developing nervous system. *J. Chem. Neuroanat.*, 5 : 299-310.
- Henning S.** 1978 Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.*, 235 : 451-456.
- Henry C, Arsaut J, Arnauld E, Demotes-Mainard J.** 1996 Transient neonatal elevation in hypothalamic estrogen receptor mRNA in prenatally-stressed male rats. *Neurosci. lett.*, 216 : 141-145.
- Herbison AE, Heavens RP, Dye S, Dyer RG.** 1991 Acute action of oestrogen on medial preoptic gamma-aminobutyric acid neurons : correlation with oestrogen negative feedback on Luteinizing hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.*, 3 : 101-106.
- Herbison AE, Theodosis DT.** 1992 Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosin hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in male and female rat. *Neurosci.* 50 : 283-298.
- Hindelang C, Felix JM, Laurent FM, Klein MJ, Stoeckel ME.** 1990 Ontogenesis of proopiomelanocortin gene expression and regulation in the rat pituitary intermediate lobe. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 70 : 225-235.
- Hökfelt T, Millhorn D, Seroogy K, Tsuruo Y, Ceccatelli S, Lindh B, Meister B, Melander T, Schalling M, Bartfai T, Terenius L.** 1987 Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experimentia*, 43 : 758-780.
- Holmes MC, Drenzo G, Beckford U, Gilham B, Jones MT.** 1982 Role of serotonin in the control of secretion of corticotropin-releasing factor. *J. Endocrinol.*, 93 : 151-160.
- Holsboer F, Barden N.** 1996 Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrinol. Rev.*, 17(2) : 187-205.
- Holzwarth MA, Cunningham LA, Kleitman N.** 1987 The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann NY Acad Sci.*, 512 : 449-63.

- Horiuchi T, Tanaka K, Shimizu N.** 1987 Effect of catecholamine on aldosterone release in isolated rat glomerulosa cell suspensions. **Life Sciences**, 40 : 2421-2428.
- Hristic M, Kalafatic D, Plecas B, Jovanovic V.** 1995 The effect of dexamethasone on the adrenal gland in fetal and neonatal rats. **J. Exp. Zool.**, 272 : 281-290.
- Hsu BRS, Sitteri PK, Kuhn RW.** 1986 Interactions between corticosteroid binding globulin and target tissues. In forest MG, Pugeat M, eds Binding Proteins of steroid hormones. Colloque INSERM, vol 149. London, John Libbey & Co : p 577-591.
- Hu SB, Lightman SL, Tannahill LA.** 1992 5-Hydroxytryptamine stimulates corticosteroid-sensitive CRF release from cultured foetal hypothalamic cells. Role of protein Kinases. **Brain Res.**, 574 : 266-270.
- Huang XP, Harlan RE.** 1993 Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. **Brain Res.**, 624 : 309-311.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR.** 1975 Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, 258 : 577-579.
- Hyypa M.** 1969 A histochemical study of the primary catecholamines in the hypothalamic neurons of the rat in relation to the ontogenetic and sexual differentiation **Z. Zellforsch**, 98 : 550-560.

I

- Ibata Y, Fukui K, Obata HL, Tanaka M, Hisa Y, Sano Y.** 1982 Postnatal ontogeny of catecholamine and somatostatin neuron systems in the median eminence of the rat as revealed by a colocalization technique. **Brain Res. Bull.**, 9 : 407-415.

J

- Jacobson CD, Gorski RA.** 1981 Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat. **J. Comp. Neurol.**, 196 : 519-529.

Janiak P, Brody MJ. 1988 — Central interactions between aldosterone and vasopressin on cardiovascular system. *Am. J. Physiol.*, 255 : 166-173.

Johansson BB. 1990 The physiology of the blood-brain barrier. In : Porter JC, Jezova D (Eds) *Circulating Regulatory Factors and Neuroendocrine function*. Plenum Press, New York, pp 25-39.

K

Kagotani Y, Hashimoto T, Tsuruo Y, Kawano H, Daikoku S, Chihara K. 1989 Development of the neuronal system containing neuropeptide γ in the rat hypothalamus. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 7(4) : 359-374.

Kapas S, Purbrick A, Hinson JP. 1995 Action of opioid peptides on the rat adrenal cortex : stimulation of steroid secretion through a specific μ opioid receptor. *J. Endocrinol.*, 144 : 503-510.

Keller-Wood ME, Dallman MF. 1984 Corticosterone inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.*, 5 : 1-6.

Kennet GA, Chaouloff F, Marcou M, Curzon C. 1986 Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression : the possible role of serotonin. *Brain Res.*, 382 : 416-421.

Khachaturian H, Sladek JR. 1980 Simultaneous monoamine histofluorescence and neuropeptide immunocytochemistry : III Ontogeny of catecholamine varicosities and neurophysin neurons in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Peptides*, 1 : 77-95.

Kieffer B, Matthes H, Maldonado R. 1997 Mécanisme d'action de la morphine. *Med. Sci.*, 13 : 232-235.

Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. 1992 The δ -opioid receptor : isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, 89 : 12048-52.

Kieffer BL. 1995 Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides : receptors for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 15 : 615-635.

Kim C, Speisky MB, Kharouba SN. 1987 Rapid and sensitive method for measuring norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their major metabolites in rat brain by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 386 : 25-35.

- Kitchen I, Kelly M, Turner M.** 1988 Dopamine receptor modulation of corticosterone secretion in neonatal and adult rats. **J. Pharmacol.**, 40 : 580-581.
- Kitraki E, Alexis MN, Stylianopoulou F.** 1984 Glucocorticoid receptors in developing rat brain and liver. **J. Steroid Biochem.**, 20 : 263-269.
- Koch B.** 1969 Fractions libres de la corticostérone plasmatique et de la réponse hypophyso-surrénalienne à un stress durant la période postnatal chez le rat. **Horm. Metab. Res.**, 1 : 301-308.
- Kraiem Z, Sack J, Brish M.** 1985 Serum cortisol levels : the first 10 days in full-term and preterm infants. **Isr. J. Med. Sci.**, 21 : 170-172.
- Kreek MJ.** 1996 Opiates, opioids and addiction. **Molec. Psychiat.**, 1 : 232-254.
- Krozowski ZS, Funder JW.** 1983 Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 80 : 6056-6060.
- Kuhn CM, Windh RT, Little PJ.** 1992 Effects of perinatal opiate addiction on neurochemical development of the brain. In : Development of the central nervous system : effects of alcohol and opiates, Wiley-Liss (eds). Plenum Press, New-York, 341-361.

L

- Lagercrantz H, Slotkin TA.** 1986 The « stress » of being born. **Sci. Am.**, 254 : 100-107.
- Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DF, Grégoire I, Dupouy JP.** 1990a Reduction in testicular function in rats. I. Reduction by a specific gonadotropin-releasing hormone antagonist in fetal rats. **Neuroendocrinol.**, 51 : 284-288.
- Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DF, Gregoire I, Dupouy JP.** 1990b Reduction in testicular function in rats II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. **Neuroendocrinol.**, 51 : 289-293.
- Laulin JP, Brudieux R.** 1990 Atrial natriuretic factor is unlikely to be involved in the reduced aldosterone production in the Brattleboro rat. **Regul. Peptides**, 31 : 157-165.

- Lemarchandel V, Montagutelli X.** 1990 La recombinaison homologue. De nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères. *Med. Sci.*, 6 : 18-29.
- Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR.** 1996 Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinol.*, 64 : 412-418.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CRW, Seckl JR.** 1996 Inhibition of 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension*, 27 : 1200-1204.
- Little JP, Kuhn CM.** 1995 Ontogenetic studies of tolerance development : effects of chronic morphine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychopharmacol.*, 122 : 78-84.
- Loizou LA.** 1971 The postnatal development of monoamine containing structures in the hypothalamo-hypophysial system of the albino rat. *Z Zellforsch*, 114 : 234-252.
- Lundblad JR, Roberts JL.** 1988 Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr. Rev.*, 9 : 135-158.

M

- Martinez-Pinero MG, Victoria Milanes M, Alcaraz C, Vargas ML.** 1994 Catecholaminergic mediation of morphine-induced activation of pituitary-adrenocortical axis in the rat : implication of α -and β -adrenoceptors. *Brain Res.*, 668 : 122-128.
- Matthes HWD, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BF, Kieffer BL.** 1996 Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Nature*, 383 : 819-823.
- Maubert E.** 1993 Neuropeptide Y, autres neuropeptides et catécholamines dans la glande surrénale du rat. Thèse de doctorat de l'Université de Lille 1.

- McCarty R, Cierpial MA, Murphy CA, Konarska M, Kirby RF.** 1989 Sympathetic responses in neonatal and adult hypertensive rats. In : Van Ioon GR, Kvetnansky R, McCarty R, Axelrod J (Eds). *Stress : Neurochemical and Humoral Mechanisms*. Gordon and Breach Science, New York, pp 255-275.
- McEwen BS.** 1978 Sexual maturation and differentiation : The role of the gonadal steroids. *Prog. Brain Res.*, 48 : 281-307.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostène W.** 1986 Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. rev.*, 66 : 1121-1188.
- McKay EM.** 1931 The relation of acquired morphine tolerance to the adrenal cortex. *J. Pharmacol.*, 43 : 51-60.
- Meaney MJ, Sapolsky RM, Aitken DH, McEwen BS.** 1985 [³H] Dexamethasone binding in fetal rat limbic brain. *Dev. Brain Res.*, 23 : 297-300.
- Mendel DB, Orti E, Smith LI, Bodwell J, Munck A.** 1990 Evidence for a glucocorticoid receptor cycle and nuclear dephosphorylation of the steroid-binding protein. In : *Molecular endocrinology and steroid hormone action*. Sato G and Stevens JL (Eds), Alan R. Liss Inc., New York, pp. 12-23.
- Merchenthaler I, Setalo G, Csontos C, Petruz P, Flerko B, Negrovillar A.** 1989 Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of LHRH and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinol.*, 125 : 2812-2821.
- Montano M, Wang MH, Even MD, Vom Saal FS.** 1991 Serum corticosterone in fetal mice : sex differences, circadian changes, and effect of maternal stress. *Physiol. Behav.*, 50 : 323-329.
- Monteleone P.** 1990 Psicoendocrinologia. Collana di Neurologia e Psichiatria. Vizioli R, Gnocchi G (Eds) Idelson, Napoli pp 35-45.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M.** 1996 Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain : an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.*, 26 : 235-269.
- Murakami N, Takahashi K.** 1983 Enhancement of corticosterone release by repeated injections of ACTH in the dexamethasone pre-treated rat. *Acta Endocrinol.*, 102 : 583-588.

Muret L, Priou A, Oliver C, Grino M. 1992 Stimulation of adrenocorticotropin secretion by insulin-induced hypoglycemia in the developing rat involves arginine vasopressin but not corticotropin-releasing factor. **Endocrinol.**, 130 : 2725-2732.

Murphy BEP. 1991 Steroids and depression. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, 38 : 537-559.

N

Nagaya M, Widmaier EP. 1993 Twenty-four hour profiles of glucose, corticosterone and adrenocorticotropin hormone during the first postnatal day in rats. **Biol. Neonate**, 64 : 261-268.

Naraghi R, Geiger H, Crnac J, Huk W, Fahlbusch R, Engels C, Luft FC. 1995 Posterior fossa neurovascular anomalies in essential hypertension. **Lancet**, 344 : 1466-1470.

Nichtern S. 1971 The children of drug users. Annual Meeting of the American Academy of child. Psychiatry, October 9. p24-31.

Nishikouri Y. 1995 Effect of prenatal administration of diazepam and buspirone on brain monoamines and avoidance learning behavior in offspring rats in relation to the influence of maternal stress caused by subcutaneous injection. *Nihon, Shinkei, Seishin, Yakurigaku, Zasshi*, 15 : 61-69.

Nosenko ND. 1996 The sexual dimorphism of the monoaminergic system of the brain : the effects of prenatal stress and neonatal androgenization in rats. **Fiziol. Zhurn. Imen. Sechenov.**, 82 : 46-53.

O

Oda H, Lotshaw DP, Franco-Saenz R et al. 1991 Local generation of angiotensin II as a mechanism of aldosterone secretion in rat adrenal capsules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 196 : 175-77.

Ohkawa T, Rohde W, Takeshita S, Dorner G, Arai K, Okigana S. 1991 Effect of an acute maternal stress on the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal system in late gestational life of the rat. **Exp. Clin. Endocrinol.**, 98 : 123-129.

- Oliver C, Jezova D, Grino M, Guillaume V, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Pesce G, Dutour A, Becquet D.** 1990 Differences in the effects of acute and chronic administration of dexfenfluramine on cortisol and prolactin secretion. In circulating regulatory factors and neuroendocrine functions. Ed Porter, J.C. & Jezova D. Plenum Press, New York, pp 427-443
- Olson GA, Olson RD, Kastin A.** 1996 Endogenous Opiates : 1995 Peptides, 17 : 1421-1466.
- Ostrea EM, Chavez CJ.** 1979 Perinatal problems (excluding neonatal withdrawal) in maternal drug addiction : a study of 830 cases. *J Pediatr.*, 94 : 292-5.

P

- Pages N, Orosco M, Fournier G, Rouch C, Hafi A, Gouch A, Comoy E, Bohuon C.** 1991 The effects of chronic administration of morphine on the levels of brain and adrenal catecholamines and neuropeptide γ in rats. *Gen. Pharmacol.* 22 : 943-947.
- Pang SF, Caggiula AR, Gay VL, Goodman RL, Pang CSF.** 1979 Serum concentrations of testosterone, oestrogens, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rats during the critical period of neural sexual differentiation. *J. Endocrinol.*, 80 : 103-110.
- Pavia JM, Hastings JA, Morris MJ.** 1995 Neuropeptide Y potentiation of potassium-induced noradrenaline release in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat in vivo. *Brain Res.*, 690 : 108-111.
- Pechnick RN.** 1993 Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32 : 353-382.
- Perdridge WM, Mietus LJ.** 1979 Transport of steroid hormones through the blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormones. *J. Clin. Invest.*, 64 : 145-153.
- Pert CB, Snyder SH.** 1973 Opiate receptor : Demonstration in nervous tissue. *Science*, 179 : 1011-1014.
- Peters DAV.** 1986 Prenatal stress : effect on development of rat brain serotonergic neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24 : 1377-1382.

- Peters DAV.** 1988 Both prenatal and postnatal factors contribute to the effects of maternal stress on offspring behavior and central 5-hydroxytryptamine receptors in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 30 : 669-673.
- Philbrick-Feuillan P, Aguilera G.** 1996 Regulation of aldosterone in the 7-day-old rat. **Endocrinol.**, 137 : 3992-3998.
- Pierce JG, Parsons TF.** 1981 Glycoprotein hormones : structure and function. **Ann. Rev. Biochem.**, 50 : 465-495.
- Piros ET, Hales TG, Evans CJ.** 1996 Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. **Neurochem. Res.**, 21 : 1277-1285.
- Plapinger L, McEwen BS, Clemens LE.** 1973 Ontogeny of estradiol-binding sites in rat brain. II. Characteristics of a neonatal binding macromolecule **Endocrinol.**, 93 : 1129-1139.
- Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP.** 1989 Catecholaminergic modulation of corticotrophin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. **Endocr. Rev.**, 10 : 437-458.

Q

- Quinn SJ, Williams GH.** 1992 Regulation of aldosterone secretion. In : James VHT, ed. The adrenal gland, 2nd ed. New York : Raven press, 159-189.

R

- Reisine T, Affolter H-U.** 1987 Hormone receptor regulated proopiomelanocortin gene expression. **Biochem. Pharmacol.**, 36 : 191-195.
- Reul JMHM, De Kloet ER.** 1985 Two receptor systems for corticosterone in rat brain : microdistribution and differential occupation. **Endocrinol.**, 117 : 2505-2511.
- Reul JMHM, De Kloet ER.** 1986 Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. **J. Steroid Biochem.**, 24 : 269-272.

- Rhoda J, Corbier P, Roffi J, Castanier M, Scholler R.** 1983 — Elévation du taux d'oestradiol dans l'hypothalamus du rat mâle à la naissance. **CR Acad. Sci., (Paris)**, 296 : 405-408.
- Rhoda J, Corbier P, Roffi J.** 1984 Gonadal steroid concentration in serum and hypothalamus of the rat at birth : aromatization of testosterone to 17 β -estradiol ?. **Endocrinol.**, 114 : 1754-1760.
- Riniker B, Sieber P, Rittel W, Zuber H.** 1972 Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. **Nature New Biol.**, 235 : 114-115.
- Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W.** 1982 In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin and corticosterone. **Endocrinol.**, 110 : 272-278.
- Roffi J, Corbier P, Kerdelhue B.** 1977 Stimulation de la sécrétion de LH et de FSH et augmentation du poids testiculaire à la naissance chez le rat. **CR Acad. Sci., (Paris)**, 284 : 1313-1316.
- Roffi J, Rhoda J, Valens M, Chami F.** 1985 Influence de la lumière et de la température sur la testostéronémie du rat nouveau-né. **J. Physiol., (Paris)**, 80,16a.
- Roffi J, Chami F, Corbier P.** 1986 Influence des testicules du rat nouveau-né sur le comportement sexuel mâle de l'adulte soumis à la testostérone. **CR Acad. Sci., (Paris)**, 302 : 467-470.
- Roffi J, Chami F, Corbier P, Edwards DA.** 1987 Testicular hormones during the first few hours after birth augment the tendency of adult males to mount receptive females. **Horm. Behav.**, 39 : 625-628.
- Rokicki W, Forest MG, Loras B, Bonnet H, Bertrand J.** 1990 Free cortisol of human plasma in the first three months of life. **Biol. Neonate**, 57 : 21-29.
- Roland BL, Li KXZ, Funder JW.** 1995 Hybridization histochemical localization of 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase type 2 in rat brain. **Endocrinol.**, 136 : 4697-4700.
- Roost TB.** 1967 Steroid synthesis in embryonic and fetal rat adrenal tissue. **Endocrinol.**, 81 : 716-728.
- Rosenfeld P, Sutanto W, Levine S, De kloet ER.** 1988 Ontogeny of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus. **Dev. Brain Res.**, 42 : 113-118.

Rosenfeld P, Van Eekelen JAM, Levine S, De Kloet ER. 1993 Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. **Cell. Molec. Neurobiol.**, 13 : 295-319.

Rotten D. 1991 Régulation de la synthèse et de la sécrétion de FSH. Dans : la reproduction chez les mammifères et l'homme. (INRA ed ; Thibault C, Levasseur MC coord.) pp 89-111.

S

Sahu A, Growley WR, Kalra PS, Kalra SP. 1992 A selective sexually dimorphic response in the median eminence neuropeptide Y. **Brain Res.**, 573 : 235-242.

Sann L. 1990 Neonatal hypoglycemia. **Biol. Neonate**, 58 (suppl 1) : 16-21.

Sanner JH, Woods LA. 1965 Comparative distribution of tritium-labeled dihydromorphine between maternal and fetal rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 148 : 176-184.

Sapolsky R, McEwen BS, Rainbow T. 1983 Quantitative densitometry of steroid hormone receptors. **Brain Res.**, 271 : 331-339.

Sapolsky RM, Meaney MJ. 1986 Maturation of the adrenocortical stress response : neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponse period. **Brain Res. Rev.**, 4 : 65-76.

Sarrieau A, Vial M, Philibert D, Moguilewsky M, Dussailant M, McEwen B, Rostène W. 1984 In vitro binding of tritiated glucocorticoids directly on unfixed rat brain sections. **J. Steroid. Biochem.**, 20 : 1233-1238.

Sarrieau A, Sharma S, Meaney MJ. 1988 Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the rat. **Dev. Brain Res.**, 43 : 158-162.

Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, Howe PRC, Bloom SR, Polak JM. 1985 Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J. Comp. Neurol.**, 241 : 138-153.

Schmidt TJ, Litwack G. 1982 Activation of the glucocorticoid-receptor complex. **Physiol. Rev.**, 62 : 1131-1192.

- Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J et al** 1987 Basic fibroblast growth factor : production and growth stimulation in cultured adrenal cortex cells. **Endocrinol.**, 120 : 796-800.
- Scrocchi LA, Hearn SA, Han VKM, Hammond GL.** 1993 Corticosteroid binding biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development. **Endocrinol.**, 132 : 910-916.
- Seckl JR.** 1994 Glucocorticoids and small babies. **Q.J. Med.**, 87 : 259-262.
- Seckl JR.** 1997 11β -hydroxysteroid deshydrogenase in the brain : a novel regulator of glucocorticoid action ?. **Front. Neuroendocrinol.**, 18 : 49-99.
- Selye H.** 1936 A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 138 : 32-33.
- Shanks N, McCormick CM, Meaney MJ.** 1994 Sex differences in hypothalamic-pituitary-adrenal responding to endotoxin challenge in the neonate : reversal by gonadectomy. **Dev. Brain res.**, 79 : 260-266.
- Shipston MJ.** 1995 Mechanism(s) of early glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion from anterior pituitary corticotropes. **Trends Endocrinol. Metab.**, 6 : 261-266.
- Shivers BC, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW.** 1983 Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. **Nature**, 304 : 345-347.
- Siddiqui A, Gilmore DP.** 1988 Regional differences in the catecholamine content of the rat brain : Effects of neonatal castration and androgenization. **Acta Endocrinol.**, 118 : 483-494.
- Silverman AJ, Jamandas J, Renaud LP.** 1987 Localization of LHRH neurons that project to the median eminence. **J. Neurosci.**, 7 : 2312-2319.
- Silverman AJ.** 1988 The gonadotropin-releasing hormone neuronal systems : Immunocyto-chemistry, In : *The physiology of reproduction*, edited by Knobil, E and Neill, J; New York : Raven Press, pp 1283-1304.
- Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfelt MG, Swenson HA.** 1990 Pituitary cell phenotypes involve cell-specific pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. **Genes Dev.**, 4 : 695-711.

- Simon EJ, Hiller JM, Edleman I.** 1973 Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [³H] etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Nat. Acad. Sci., (USA)*, 70 : 1947-1949.
- Simonhanson E, Dallman MF.** 1995 Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.*, 7 : 273-279.
- Sizonenko PC, Aubert M.** 1978 Pre and perinatal endocrinology. In : human growth, 1. Principles and prenatal growth. F Falkner and JM Tanner. Edit. Bailliere Tindale, London, p 549.
- Slob AK, Ooms MP, Vreeburg JTM.** 1980 Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats. *J. Endocrinol.*, 87 : 81-87.
- Slotkin TA, Anderson TR.** 1975 Sympatho-adrenal development in perinatally addicted rats. *Addict. Diseases*, 2 : 293-306.
- Slotkin TA, Lappi SE, McCook EC, Tayyeb M, Eylers JP, Seidler FJ.** 1992 Glucocorticoids and the development of neuronal function : effects of prenatal dexamethasone exposure on central noradrenergic activity. *Biol. Neonate*, 61 : 326-336.
- Smith CL, Hammond GL.** 1991 Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat. *Endocrinol.*, 128 : 983-988.
- Sokka TA, Huhtaniemi IT.** 1995 Functional maturation of the pituitary gonadal axis in the neonatal female rat. *Biol. Reprod.*, 52 : 1404-1409.
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W.** 1981 Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, 78 : 6517-6521.
- Steinbusch HWM, Nieuwenhuys R.** 1981 Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special reference to the innervation of the hypothalamus. In B. Haber, S Gabay, MR Issidorides and S.G.A. Alivisatos (Eds.), *Serotonin : Current Aspects of Neurochemistry and function*. Plenum, New York, pp 7-35.
- Stoffer S.** 1968 A gynecologic study of drug addicts. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101 : 779-83.

Suda T, Tozawa F, Iwai I, Sato Y, Sumimoto T, Nakano Y, Yamada M, Demura H. 1993 Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. **Molec. Brain Res.**, 18 : 311-315.

Szabo K, Csanyi K. 1982 The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in the rat. **Cell. Tiss. Res.**, 224 : 563-577.

Szafarczyk A, Alonso G, Ixart G, Malaval F, Assenmacher I. 1985 Diurnal-stimulated and stress-induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. **Am. J. Physiol.**, 249 : E219-E226.

T

Taragnat C. 1997 Ontogénèse de la fonction gonadotrope hypophysaire. Dans : les gonadotropines -(INRA ed ; Combarous Y, Volland-Nail coord.) pp 143-156.

Tempel A. 1991 Visualization of μ opiate receptor down regulation following morphine treatment in neonatal rat brain. **Dev. Brain Res.**, 64 : 19-26.

Tempel A, Yang J, Basheer R. 1995 Prenatal morphine exposure differentially alters expression of opioid peptides in striatum of newborns. **Molec. Brain Res.**, 33 : 227-232.

Terenius L. 1973 Characteristics of the « receptor » for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. **Acta pharmacol.**, 33 : 377-384.

Tiong GKL, Olley JE. 1988 Effects of exposure in utero to methadone and buprenorphine on enkephalin levels in the developing rat brain. **Neurosci. Lett.**, 93 : 101-106.

Topon MC, Burlet A, Lauber M, Cuet P, Jégou S, Gouteux L, Ling N, Vaudry H. 1985 Immunohistochemical localization and radioimmunoassay of corticotropin-releasing factor in the forebrain and the hypophysis of the frog *Rana ridibunda*. **Neuroendocrinol.**, 40 : 109-119.

Toth IE, Hinson JP. 1995 Neuropeptides in the adrenal gland : Distribution, localization of receptors, and effects on steroid hormone synthesis. **Endocr. Res.**, 21 : 39-51.

U

- Ueda S, Matsumoto Y, Nisimura A, Azmitia EC, Kawata M.** 1995 Role of neuropeptide Y projection on the development of serotonergic innervation in the suprachiasmatic nucleus of the rat, shown by triple intraocular grafts. **Brain Res.**, 673 : 325-330.
- Ugrumov MV, Ivanova IP, Mitskevich MS, Liposits ZS, Setalo G, Flerko B.** 1985a Axovascular relationships in developing median eminence of perinatal rats with special reference to luteinizing hormone-releasing hormone projections. **Neuroscience**, 16 : 897-906.
- Ugrumov MV, Taxi J, Mitskevich MS, Arlvison M, Tramu G.** 1985b Immunocytochemical and radioautographic study of serotonin projections to cerebral ventricles of perinatal rats. **Dev. Brain Res.**, 18 : 225-230.
- Ugrumov MV, Taxi J, Mitskevich MS, Tramu G.** 1986 Development of the hypothalamic serotonergic system during ontogenesis in rats. Immunocytochemical and radioautographic study. **Dev. Brain Res.**, 30 : 75-84.
- Ugrumov MV, Taxi J, Tixier-Vidal A, Thibault J, Mitskevich MS.** 1989a Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cellbodies. **Neurosci.**, 29 : 135-156.
- Ugrumov MV, Taxi J, Tixier-Vidal A, Thibault J, Mitskevich MS.** 1989b Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. Fiber pathways and terminal fields. **Neurosci.**, 29 : 157-166.
- Ugrumov MV, Mitskevich MS.** 1992 Development of neuroendocrine regulation in ontogenesis. **Sov. Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol.**, 5 : 41-96.
- Urban JH, Bauer-Dantoin AC, Levine JE.** 1993 Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus : sexual dimorphism and modulation by testosterone. **Endocrinol.**, 132 : 139-145.
- Uzbekov MG, Murphy S, Rose SPR.** 1979 Ontogenesis of serotonin « receptors » in different regions of rat brain. **Brain Res.**, 168 : 195-199.

V

- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J.** 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. **Science**, 213 : 1394-1397.
- Van Baar A, De Graaff.** 1994 Cognitive development at preschool-age of infants of drug-dependent mothers. **Dev. Med. Child Neurol.**, 36 : 1063-1075.
- Van Bockstaele E, Colago EEO, Cheng P, Moriwak A, Uhl GR, Pickel VM.** 1996 Ultrastructural evidence for prominent distribution of the μ -opioid receptor at extrasynaptic sites on noradrenergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. **J. Neurosci.**, 16 : 5037-5048.
- Van Eekelen JAM, Kiss JZ, Westphal HM, De Kloet ER.** 1987 Immunocytochemical study on the intracellular localization of the type 2 glucocorticoid receptor in the rat brain. **Brain Res.**, 436 : 120-128.
- Van Eekelen JAM, Jiang W, De Kloet ER, Bohn MC.** 1988 Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. **J. Neurosci. Res.**, 21 : 88-94.
- Van Eekelen JAM, Bohn M, De Kloet ER.** 1991 Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel-and diencephalon. **Dev. Brain Res.**, 61 : 33-43.
- Van Praag HM.** 1982 Neurotransmitters and CNS disease : depression. **Lancet**, 1 : 1259-1264.
- Vathy I, Etgen AM, Barfield RJ.** 1985 Effects of prenatal exposure to morphine sulfate on the development of sexual behavior in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 22 : 227-232.
- Vathy I, Katay L.** 1992 Effects of prenatal morphine on adult sexual behavior and brain catecholamines in rats. **Dev. Brain. Res.**, 68 : 125-131.
- Vathy I, Rimanoczy A, Eaton RC, Katay L.** 1994 Modulation of catecholamine turnover in brain regions of rats exposed prenatally to morphine. **Brain Res.**, 662 : 209-215.
- Vathy I, Rimanoczy A, Eaton RC, Katay L.** 1995 Sex dimorphic alterations in postnatal brain catecholamines after gestational morphine. **Brain Res. Bull.**, 36 : 185-193.

Vitale ML, Chiochio SR. 1993 Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of Luteinizing hormone release. **Endocr. Rev.**, 14 : 480-493.

Vito CC, Fox TO. 1981 Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. **Dev. Brain Res.**, 2 : 97-110.

W

Walker CD, Sapolsky RM, Meaney MJ, Vale WW, Rivier CL. 1986 Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. **Endocrinol.**, 119 : 1816-1821.

Wallace JA, Lauder JM. 1983 Development of the serotonergic system in the rat embryo : an immunocytochemical study, **Brain Res. Bull.**, 10 : 459-479.

Wang L, Gintzler AR. 1994 Biomodal opioid regulation of cyclic AMP formation : implications for positive and negative coupling of opiate receptors to adenylyl cyclase. **J. Neurochem.**, 63 : 1726-1730.

Wang Y, Yamaguchi T, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. 1992 Regulation of renin gene expression in rat adrenal zona glomerulosa cells. **Hypertension**, 20 : 776-81.

Ward IL, Biron Ward O, Winn RJ, Bielawski D. 1994 Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress or both factors. **Behav. Neurosci.**, 108 : 1188-1195.

Watson RE, Langub MC, Landis JW. 1992 Further evidence that Luteinizing hormone-releasing hormone and oestrogen receptor immunoreactivity in the guinea pig brain. **J. Neuroendocrinol.**, 4 : 311-317.

Weissman MM, Klerman G. 1977 Sex differences in the epidemiology of depression. **Arch. Gen. Psychiat.**, 34 : 98-111.

Weisz J, Ward IL. 1980 Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. **Endocrinol.**, 106 : 306-316.

Weniger JP, Zeis A, Chouraqui J. 1993 Estrogen production by fetal and infantile rat ovaries. **Reprod. Nutr. Dev.**, 33 : 129-136.

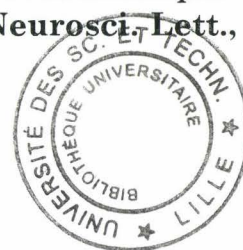
- Whitnall MH.** 1993 Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Progr. Neurobiol.**, 40 : 573-629.
- Widmaier EP, Dallman MF.** 1983a Rapid inhibition and stimulation of ACTH secretion by glucocorticoids in vitro. **Fed. Proc.**, 42 : 458-461.
- Widmaier EP, Dallman MF.** 1983b Fast inhibition of stimulated ACTH secretion by corticosterone does not require protein synthesis. **Endocrinol.**, 112 : 90-98.
- Wilson SG, Murdina MD, Desmond M, Willie MD, Verniaud M, Houston ED.** 1973 Early development of infants of heroin-addicted mothers. **Am. J. Dis. Child**, 26 : 457-462.
- Woodhams PL, Allen YS, McGovern J, Allen JM, Bloom SR, Balazs R, Polak JM.** 1985 Immunohistochemical analysis of the early ontogeny of the neuropeptide Y system in rat Brain. **Dev Brain Res.**, 15(1) : 173-202.
- Wray S, Hoffman G.** 1986 Catecholamine innervation of LHRH neurons : a developmental study. **Brain Res.**, 399 : 327-331.

Y

- Yongue BG, Roy EJ.** 1987 Endogenous aldosterone and corticosterone in brain cell nuclei of adrenal-intact rats : regional distribution and effects of physiological variations in serum steroids. **Brain Res.**, 436 : 49-61.
- Young III WS, Mezey E, Siegel RE.** 1986 Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. **Neurosci. Lett.**, 70 : 198.

Z

- Zagon IS, McLaughlin PJ.** 1995 Gene-peptide relationships in the developing rat brain : The response of preproenkephalin mRNA and [Met⁵]-enkephalin to acute opioid antagonist (naltrexone) exposure. **Molec. Brain Res.**, 33 : 111-120.
- Zelson C, Rubio E, Wasserman E.** 1971 Neonatal narcotic addiction : 10 years observation. **Pediatrics**, 48 : 178-89.



ANNEXES

Hypothalamic Metabolism of Neurotransmitters (Serotonin, Norepinephrine, Dopamine) and NPY, and Gonadal and Adrenal Activities, During the Early Postnatal Period in the Rat

J. Lesage,¹ F. Bernet,¹ V. Montel,¹ and J. P. Dupouy^{1,2}

(Accepted October 24, 1995)

It is noteworthy that in the rat the early postnatal life is marked by an activation of both the corticostimulating function of the adenohypophysis in neonates of both sexes and of the gonadostimulating function mainly in males. In order to specify if such neuroendocrine variations are temporally correlated with changes in the hypothalamic metabolism of neurotransmitters, the hypothalamic metabolism of serotonin (5 HT), norepinephrine (NE), and dopamine (DA) and the hypothalamic content of neuropeptide Y (NPY) have been investigated in newborn rats of both sexes, delivered at term by cesarean section, as well as changes in the activity of both the hypothalamo-pituitary adrenal axis (HPA) and the hypothalamo-pituitary gonadal axis (HPG). Experimental data suggested that 1) in males a rise in hypothalamic metabolism of 5 HT, NE and DA occurs during the first two hours after delivery, whereas in females, only the metabolism of NE increases. Moreover, the postnatal metabolism of NE was higher in females than in littermate males; 2) NPY content of the hypothalamus, which was at birth significantly higher in males than in females, dropped in the former but not in the latter; 3) in newborn males, an early surge of plasma testosterone occurs, suggesting postnatal activation of the HPG axis; on the other hand, in females, a late and slight increase in plasma estradiol is observed; 4) in early postnatal life, a sex-independent rise in plasma ACTH and adrenal and plasma corticosterone levels suggest a comparable activation of the HPA axis in newborns of both sexes. In conclusion, the early postnatal activation of the corticostimulating function in neonates of both sexes and that of the gonadostimulating function, mainly in males, could be temporally correlated with a rise in the hypothalamic metabolism of two neurotransmitters, 5 HT and NE, and of NPY content. According to our data, a sex-dependent metabolism of neurotransmitters in the hypothalamus is already apparent in early postnatal life.

KEY WORDS: Hypothalamic metabolism; serotonin; norepinephrine; dopamine; neuropeptide Y; ACTH; corticosterone; testosterone; estradiol; newborn-rat.

INTRODUCTION

The neuroregulation of both corticostimulating and gonadostimulating functions of the adult adenohypoph-

ysis includes specific hypophysiotropic factors as respectively corticoliberin (CRF) and gonadoliberin (GnRH) as well as various neurotransmitters and neuropeptides of the central nervous system (1-4).

Although the physiological role of serotonergic influence on the pituitary-adrenocortical function is still not well understood, serotonin (5 HT) may play a role

¹ Centre de Biologie Cellulaire Neuroendocrinologie du Développement, J.E. 234, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

² To whom to address reprint requests.

in the activation of this function by certain types of stress (5). Similarly, the role of 5 HT in the release of GnRH and/or LH (luteinizing hormone) is not yet clear in spite of the fact that recent results suggest a permissive or stimulatory effect, mainly in females (6).

Many experiments suggest that norepinephrine (NE) and epinephrine (E) stimulate CRF and ACTH (adrenocorticotrophic hormone) secretions; however some others suggest the opposite and consequently there is no consensus regarding the role that catecholamines play in regulating the hypothalamo-pituitary adrenal axis (HPA) (3,4,8).

The common noradrenergic ascending innervation of the hypothalamus plays a major stimulatory effect on ACTH release in response to both ether and restraint stress (9). On the other hand NE is one of the major neurotransmitters which activates GnRH neurons and LH surge (1).

Neuropeptide Y (NPY) stimulates in adults ACTH release from the anterior pituitary through an hypothalamic action which stimulates CRF release and/or enhances CRF action in the anterior pituitary gland (10). There is little information concerning the potential role of NPY during fetal and neonatal life. It was recently reported that central administration of NPY to fetal sheep increases plasma concentrations of ACTH; moreover the lack of any direct pituitary effects of NPY suggests that this neuropeptide acts centrally within the brain to stimulate fetal pituitary-adrenal activity (11). Similarly, NPY stimulates the release of GnRH from the medial basal hypothalamus and potentiates the release of LH and FSH in response to GnRH (12). Moreover a sexual dimorphism for both hypothalamic NPY content and NPY gene expression has been reported in adults (13,14). On the other hand, anatomical data suggest possible interactions between NPY fibers and serotonergic fibers in the developing suprachiasmatic nucleus (48).

Both hypothalamo-pituitary adrenal axis (15-18) and hypothalamo-pituitary testicular one (19,20) are already functional in both rat fetuses in late gestation and newborns. Moreover, a sex-dependent difference for ether stress-induced HPA activation has been reported for 8 day old rat neonates with long-lasting ACTH response, which is greater in females than in males (21). Experimental data are consistent with an α -stimulatory effect of NE on the neuroendocrine pathways involved in the pituitary response of these newborn rats to ether stress with mediation through central nervous system rather than direct pituitary actions (22). The serotonergic system also appears to mediate in 8 day old newborn females, the stress-induced ACTH release (23). Conversely neonatal ACTH and corticosterone alter hy-

pothalamic monoamine innervation in the developing female hypothalamus (49).

An abrupt rise of plasma corticosterone or cortisol occurs within the first postnatal minutes or hour respectively in rat pups (24) and human newborns (25,27) and a transitory surge in serum testosterone occurs in males in a variety of mammalian species including rats (28).

As the metabolism of various neurotransmitters and neuropeptides in the developing hypothalamus of fetuses and/or neonates is poorly documented, the aim of the present work is to explore the evolution of the metabolism of serotonin, catecholamines and NPY in the hypothalamus of rats of both sexes occurring after the delivery, in correlation with changes in the activity of both the HPA axis and the hypothalamo-pituitary gonadal one (HPG).

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals. Experiments were performed on Wistar rats bred in our laboratory. Females were mated with a male for one night. The next day was taken as day 0 of pregnancy if spermatozoa were found in vaginal smears. Pregnant females were transferred into individual cages 24 h before being killed. The rats were housed in a light-controlled room (light period from 7 a.m. to 7 p.m.) with rat chow and tap water available ad libitum.

Animal use accreditation by the French Ministry of the Agriculture (n° 04860) has been delivered to our laboratory for experimentation with rats.

Pregnant females at term (day 21 of gestation) were rapidly killed by decapitation between 9 a.m. and 10 a.m. Each litter usually contained between 8 and 12 fetuses which were collected by cesarean section and either immediately sacrificed or kept at 30-33°C for various times from 10 to 120 min before being sacrificed. Each litter was used for 3, 4, or 5 time periods and never for only one. The sex of the pups was determined by examination of the genitals.

Plasma and Tissue Collections. Trunk blood of the fetuses was collected after decapitation and put in polyethylene tubes prerinsed with EDTA [5 μ l; 5% (w/v) EDTA for 100 μ l of blood]. The blood samples were centrifuged at 3,500 g for 15 min at 4°C. Plasma samples were kept at -30°C until assayed for circulating hormones.

The adrenals and the testicles were quickly removed, defatted, weighed and sonicated in an appropriate volume of either acetic acid 0.5 M (adrenals) or NaCl 0.9% (testicles) at 4°C. After centrifugation, the aliquot fractions of the supernatants were kept at -30°C until assayed for corticosterone, aldosterone and testosterone.

Hypothalamic tissues were rapidly removed from the brain after decapitation of the fetuses. The hypothalamic fragment including the median eminence and the pituitary stalk was delimited by the optic chiasma and the mammillary bodies; it was cut at a depth of about 1-2 mm. The hypothalamic pieces were usually sonicated in 200 μ l of acetic acid 0.5 M; an aliquot fraction of 150 μ l destined for the RIA of NPY was heated 15 min at 70°C to inactivate proteolytic enzymes. The remainder (50 μ l) was reserved to determine by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection, the content of neurotransmitters [Dopamine (DA), Norepinephrine (NE), Epinephrine (E), Serotonin (5 HT)] and their

main metabolites [3–4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA) and 5-hydroxyindolacetic acid (5 HIAA)]. For 3-methoxy-4 hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) determination, the hypothalamic pieces were sonicated in 0.12 M sodium acetate pH 5.0. All the fractions were centrifuged at 22,000 g at 4°C for 20 min and the supernatants were frozen and stored at –30°C until used.

The «metabolism» of each neurotransmitter is expressed as the ratio of the main metabolite to the parent transmitter e.g. 5 HIAA/5 HT, DOPAC/DA, HVA/DA and MHPG/NE.

Radioimmunoassays

Extractions. Steroid hormones assays in plasma samples and tissue ones are preceded by an extraction in ethylacetate after a delipidation in isoctane. The percentage of recovery of a known amount of steroid was over 66% (testosterone), 73% (estradiol) and 95% (corticosterone, aldosterone).

Aldosterone and Corticosterone Assays. Aldosterone and Corticosterone concentrations were measured by RIA according to the methods previously described (29,30).

Testosterone Assay. Testosterone concentrations were determined by radioimmunoassay. Antitestosterone was purchased from UCB-Bioproducts (i 900; Nanterre, France). Standard doses of testosterone or samples were incubated for 90 min at 4°C in the presence of a testosterone antibody (final dilution 1/20,000) and [1, 2, 6, 7 – ³H] testosterone (TRK 402; Amersham; specific activity 90 Ci/mmol) with 0.02 M sodium/potassium phosphate buffer pH 7.40, containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.9% NaCl and 0.02% sodium azide. The incubation volume was 0.300 ml. The separation of antibody-bound testosterone and free testosterone was obtained by the addition of 1 ml of Dextran coated charcoal suspension (25 mg Dextran T and 250 mg charcoal Norit in 100 ml RIA phosphate buffer). The percentage of cross-reaction was 100% with testosterone, 50% with dihydrotestosterone, 1.19% with dehydroisoandrosterone, 0.16% with corticosterone, 0.10% with deoxycorticosterone, 0.042% with progesterone, 0.0125% with 5 pregnan 3 β ol 20 one and 17 α hydroxyprogesterone; 0.00025% with β estradiol and 0.00002% with hydrocortisone. Binding of tritiated testosterone in the absence of competition was 80% (n = 14). Fifty percent inhibition of ³H-testosterone binding to the antibody was obtained with 25 pg of unlabelled testosterone. Intra and interassay variability were respectively 4.55% (n = 12) and 8.46% (n = 8).

Estradiol Assay. Estradiol concentrations were determined by RIA. Anti-estradiol was purchased from UCB-Bioproducts (i 901). Standard doses of estradiol or samples were incubated for 90 min at 4°C in the presence of a estradiol antibody (final dilution 1/10,500) and [2, 4, 6, 7 – ³H]estradiol (TRK 322, Amersham; specific activity 83 Ci/mmol) with the same phosphate buffer than that previously described for testosterone RIA. The protocol of separation of antibody-bound estradiol and free estradiol was similar to that one described for testosterone RIA. The percentage of cross-reaction was 100% with estradiol, 0.073% with dehydroisoandrosterone, 0.027% with testosterone, 0.012% with corticosterone, 0.011% with 5 pregnan 3 β ol 20 one, 0.0013% with progesterone, 0.0011% with deoxycorticosterone, 0.0006% with 17 α hydroxyprogesterone and 0.00012% with hydrocortisone. Binding of tritiated estradiol in the absence of competition was 34% (n = 7). Fifty percent inhibition of [³H]estradiol binding to the antibody was obtained with 16 pg of unlabeled estradiol. Intra and interassay variability were respectively 2.82% (n = 5) and 10.7% (n = 4).

NPY Assay. The NPY content of the hypothalamic samples were determined by RIA according to the protocol of Maubert et al. (31). Briefly, thawed fractions of the acetic acid extracts were half diluted with phosphate buffer (50 mM), pH 7.4, containing 0.3% bovine serum albumin, 10 mM EDTA and 1% Phenol red as pH indicator; pH was restored to 7.40 with 1 N NaOH. Radioimmunoassay was performed using rat NPY_{1–36} (Neosystem) as standard (doses ranging from 30 to 8,500 pg/tube) for an incubation volume of 0.6 ml; ¹²⁵I-labeled porcine NPY (NEX 222, NEN Du Pont de Nemours; specific activity 2,000 Ci/mmol) and anti-human/rat NPY serum (Neosystem) at a final dilution of 1/12,000. Standard doses of NPY or aliquot fractions of the samples were incubated 72 h at 4°C in the presence of NPY antibody and labeled NPY. The separation of antibody-bound and unbound NPY was obtained by addition of 0.250 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 1.6% Norit Charcoal (Sigma), 0.16% Dextran (Sigma), 0.2% gelatin and 10 mM EDTA. The antiserum exhibited the following cross-reactivities, measured at molar concentrations for B/Bo = 50% in a radioimmunoassay system: 100% with porcine and rat/human NPY, 0.040% with β endorphin, 0.022% with rat PHI, 0.008% with substance P and 0% with VIP, porcine PYY, rat pancreatic polypeptide, Metenkephalin, somatostatin_{1–28}, ACTH_{1–39} and ACTH_{1–24}, AVP, oxytocin and angiotensin II. Fifty percent inhibition of ¹²⁵I-NPY binding to the antibody was obtained with 500 pg of unlabeled NPY. Intra and interassay variability were respectively 3.1% (n = 12) and 12% (n = 17).

ACTH Assay. Plasma ACTH levels were determined by RIA according to the previously detailed procedure (32).

Analysis of Norepinephrine, Dopamine, Serotonin, and Their Main Metabolites

Apparatus. HPLC determinations were performed with a Spectra Physics system consisting of a solvent degasser SCM 400, a pump P 4000, an electrochemical detector BAS LC-4C (Bioanalytical Systems) with a glassy carbon electrode and an SP 4400 Integrator.

Separation by isocratic elution was performed on a 250 \times 4.6 mm I.D. Altex Ultrasphere ODS Column (C₁₈ reversed-phase, particle size 5 μ m).

MHPG Analysis. Before the HPLC determinations, an enzymatic hydrolysis of the conjugated MHPG was performed with sulphatase (from *Helix pomatia*, type H-5) according to Warnhoff (33).

The samples were then centrifuged for 40 min at 4°C at 22,000 g and the supernatants were filtered through a 0.22 μ m filter (GV, Millipore). Twenty μ l of filtrate were injected into the HPLC system. The mobile phase was the solvent system of Kim et al. (34) with 14% methanol (v/v). The detector potential was set at +0.8 V vs Ag/AgCl and a flow rate of 1.2 ml was used.

The detection limit is approximately 15–20 pg/injection and the recovery of the HPLC determination of MHPG is 85% \pm 1.83.

Other Determinations. A volume of 0.050 ml of 0.4 N Perchloric acid was added to 0.050 ml of each sonicated hypothalamus. The samples were then centrifuged for 40 min at 4°C at 22,000 g and the supernatants were injected into the HPLC System. The mobile phase was the solvent system of Lema (35) to pH 3.9 and with 12% methanol (v/v). The detector potential was set at +0.7 V vs Ag/AgCl. A flow rate of 0.9 ml/min was used.

The detection limit for all the compounds determined is approximately 10–15 pg/injection and the mean recoveries ranged from 93 to 101%.

Statistical Analysis. Statistical significance of the results was determined by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test. When

Table I. Hypothalamic Content of 5 HT and 5 HIAA in Male and Female Rat Pups at Different Times after Delivery

(ng/mg)	sex	Time after delivery (minutes)				
		0	30	60	90	120
5 HT	♂	0.309 ± 0.026 (13)	0.353 ± 0.019 (18) ⁺	0.323 ± 0.028 (18)	0.309 ± 0.020 (18) ⁺⁺⁺	0.374 ± 0.035 (11) ⁺
	♀	0.317 ± 0.048 (8)	0.275 ± 0.031 (10)	0.354 ± 0.049 (12)	0.481 ± 0.052 (7)*	0.508 ± 0.040 (5)*
5 HIAA	♂	0.392 ± 0.052 (13)	0.493 ± 0.048 (19) ⁺⁺⁺	0.527 ± 0.041 (18)*	0.661 ± 0.046 (18) ^{***+-}	0.750 ± 0.061 (11) ^{***+-}
	♀	0.310 ± 0.033 (8)	0.348 ± 0.048 (10)	0.492 ± 0.044 (12)**	0.463 ± 0.028 (7)**	0.522 ± 0.045 (5)**

Means ± SEM and number of individual determinations.
 - male vs females (+) P < 0.05 (++) P < 0.01 (+++) P < 0.001
 - vs time 0 minute * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

only two groups were compared (i.e. males vs females), the Student's t-test was employed. Differences were considered statistically significant if $P < 0.05$.

RESULTS

Metabolism of the Biogenic Amines in the Hypothalamus

Serotonin. Hypothalamic 5HT content was stable in males up to 120 min after delivery (Table I). In contrast it was rising in females ($F_{4,37} = 4.00$; $P < 0.01$), mainly 90 and 120 min after birth, then it was significantly greater in females than in males (Table I). 5 HIAA content of the hypothalamus increased in both males ($F_{4,74} = 7.07$; $P < 0.001$) and females ($F_{4,37} = 4.20$; $P < 0.01$) up to 120 min (Table I) and was higher in the former than in the latter at times 30, 90 and 120 min (Table I).

The metabolism of serotonin expressed as the ratio 5 HIAA/5 HT increased significantly in male pups ($F_{4,73} = 3.75$; $P < 0.01$) only at 90 and 120 min after delivery; at these times, it was significantly higher in males than in females (Fig. 1).

Norepinephrine. NE content of the hypothalamus did not significantly vary in both sexes up to 120 min after delivery (Table II). However it was significantly higher in males than in females at all investigated times except 90 min (Table 2). MHPG concentration increased in both sexes (males: $F_{4,24} = 3.77$; $P < 0.05$; females: $F_{4,36} = 4.27$; $P < 0.01$) at 60 and 90 min (Table 2). No significant difference between males and females was observed.

The metabolism of norepinephrine expressed as the ratio MHPG/NE was significantly increased in both

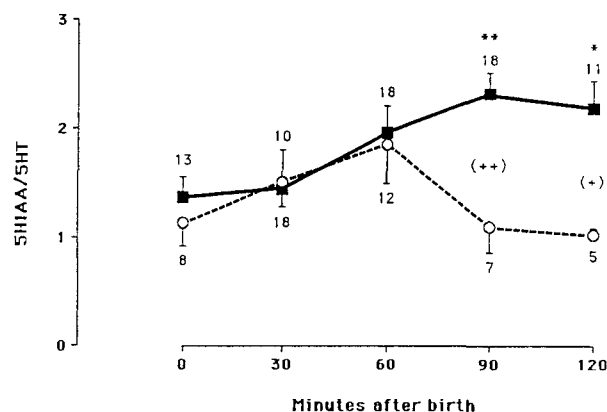


Fig. 1. Evolution of the hypothalamic metabolism of serotonin (5 HIAA/5 HT ratio) in male (■) and female (○) newborn rats through the early postnatal period. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:
 - vs time 0 minute: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
 - males vs females: (+) $P < 0.05$ (++) $P < 0.01$

sexes (males: $F_{4,23} = 5.39$; $P < 0.01$; females: $F_{4,36} = 5.11$; $P < 0.01$) 60 and 90 minutes after birth and was greater in females than in males (Fig. 2).

Dopamine. DA content of the hypothalamus was stable and similar in both males and females up to 120 min after birth (Table III). DOPAC concentration in the hypothalamus was stable in males but was increased in females ($F_{4,37} = 3.73$; $P < 0.05$) 60 and 120 min after delivery; it was then similar in both sexes excepted at 30 min, where it was significantly higher in males (Table III). In contrast HVA was stable in females but was increased in males ($F_{4,73} = 2.60$; $P < 0.05$) at time 90 min, and was higher in the latter than in the former (Table III).

Table II. Hypothalamic Content of NE and MHPG in Male and Female Rat Pups at Different Times after Delivery

(ng/mg)	sex	Time after delivery (minutes)				
		0	30	60	90	120
NE	♂	0.368 ± 0.031 (13) ⁽⁺⁾	0.382 ± 0.031 (18) ⁽⁺⁺⁾	0.326 ± 0.016 (18) ⁽⁺⁺⁾	0.288 ± 0.027 (18)	0.362 ± 0.021 (11) ⁽⁺⁾
	♀	0.263 ± 0.030 (8)	0.226 ± 0.031 (10)	0.221 ± 0.026 (12)	0.271 ± 0.021 (7)	0.290 ± 0.017 (5)
MHPG	♂	0.135 ± 0.013 (6)	0.180 ± 0.024 (6)	0.213 ± 0.013 (8) ^{**}	0.226 ± 0.017 (7) ^{**}	0.265 ± 0.108 (2) [*]
	♀	0.154 ± 0.019 (11)	0.192 ± 0.010 (8)	0.259 ± 0.026 (7) [*]	0.216 ± 0.013 (9) [*]	0.211 ± 0.029 (6)

Means ± SEM and number of individual determinations.

- males vs females (+) P<0.05 (++) P<0.001

- vs time 0 minute * P<0.05 ** P<0.01

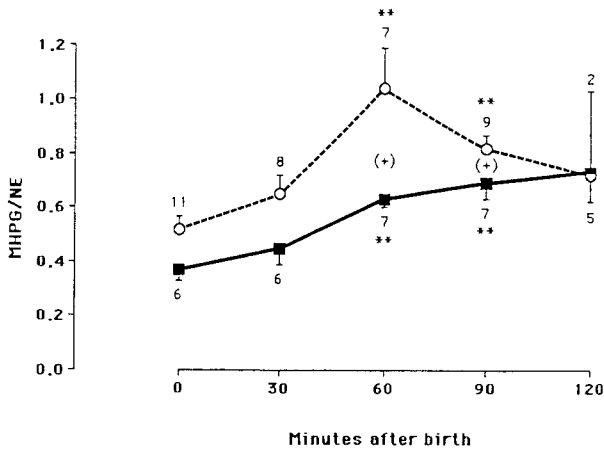


Fig. 2. Evolution of the hypothalamic metabolism of norepinephrine (MHPG/NE ratio) in male (■) and female (○) newborn rats through the early postnatal life. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:

- vs time 0 minute: ** P < 0.01

- males vs females: (+) P < 0.05

The ratio DOPAC/DA was stable and similar in both males and females up to 120 min after birth (Fig. 3A) but significantly increased in females 60 min postpartum. On the other hand the ratio HVA/DA was also stable in female pups but was significantly increased in males ones ($F_{4,73} = 5.76$; $P < 0.001$) 90 min after delivery (Fig. 3B), however there are no significant differences between sexes.

Neuropeptide Y in the Hypothalamus. NPY content of the hypothalamus was significantly higher in males than in females at birth time (Fig. 4). Afterwards it was stable in the latter but significantly decreased in the former ($F_{3,54} = 2.75$; $P < 0.05$) during the first hour after delivery (Figure 4).

ACTH in the Plasma. In newborns of both sexes, plasma concentrations of ACTH increased slightly, but not significantly, a short time after birth, peak 10 minutes postpartum and thereafter declined (Fig. 5A). No difference between males and females was noted at the investigated postnatal stages.

Adrenal Steroids. The plasma corticosterone levels were comparable in both sexes at the delivery time, significantly increased 60 and 90 min after birth in males ($F_{3,23} = 7.15$; $P < 0.01$) and only at 90 min in females ($F_{3,28} = 4.93$; $P < 0.01$) (Fig. 5B). The adrenal content of corticosterone was stable in males up to 90 min after delivery (data not shown). In contrast in females a peak was observed at 60 min (11.16 ± 2.25 ng/mg, $n=5$ vs 6.11 ± 0.68 ng/mg, $n=7$ at birth time; $P < 0.05$). The adrenal weight was comparable in both sexes (data not shown). The adrenal content of aldosterone was similar in both sexes at birth; thereafter it increased in females but not in males, only 90 min after delivery (0.117 ± 0.034 ng/mg, $n=9$ vs 0.049 ± 0.009 ng/mg, $n=9$ at birth time).

Gonadal steroids

Testosterone. In newborn males, an abrupt rise of plasma testosterone levels occurred within the first postnatal hour ($F_{4,29} = 8.57$; $P < 0.001$) and declined slightly during the second hour (Fig. 6A). The concentration of testosterone in the testes was not significantly modified within the first hour of newborn life (455 ± 90 pg/mg, $n=5$ at birth; 513 ± 89 pg/mg, $n=8$, at 60 min; $P > 0.05$) but significantly dropped at 120 min (194 ± 22 pg/mg, $n=6$; $P < 0.01$ vs 0 min). During the two postnatal hours, the testicular weight was unchanged (data not shown).

Table III. Hypothalamic Content of DA, DOPAC, and HVA in Male and Female Rat Pups at Different Times after Delivery

(ng/mg)	sex	Time after delivery (minutes)				
		0	30	60	90	120
DA	♂	0.184 ± 0.033 (13)	0.200 ± 0.027 (18)	0.169 ± 0.009 (18)	0.161 ± 0.013 (18)	0.178 ± 0.017 (11)
	♀	0.128 ± 0.015 (8)	0.149 ± 0.019 (10)	0.177 ± 0.034 (12)	0.140 ± 0.014 (7)	0.183 ± 0.034 (5)
DOPAC	♂	0.039 ± 0.006 (12)	0.045 ± 0.006 (19) ⁽⁺⁾	0.048 ± 0.004 (18)	0.049 ± 0.005 (18)	0.041 ⁽⁺⁾ ± 0.005 (11)
	♀	0.024 ± 0.005 (8)	0.024 ± 0.003 (10)	0.048 ± 0.007 (12)*	0.035 ± 0.003 (7)	0.051 ± 0.011 (5)*
HVA	♂	0.170 ± 0.020 (13)	0.153 ± 0.015 (18)	0.174 ± 0.002 (18)	0.249 ± 0.029 (18) ⁽⁺⁾	0.210 ± 0.023 (11)
	♀	0.136 ± 0.019 (8)	0.131 ± 0.019 (10)	0.198 ± 0.026 (12)	0.148 ± 0.020 (7)	0.162 ± 0.023 (5)

Means ± SEM and number of individual determinations.
 - males vs females ⁽⁺⁾ P<0.05
 - vs time 0 minute * P<0.05

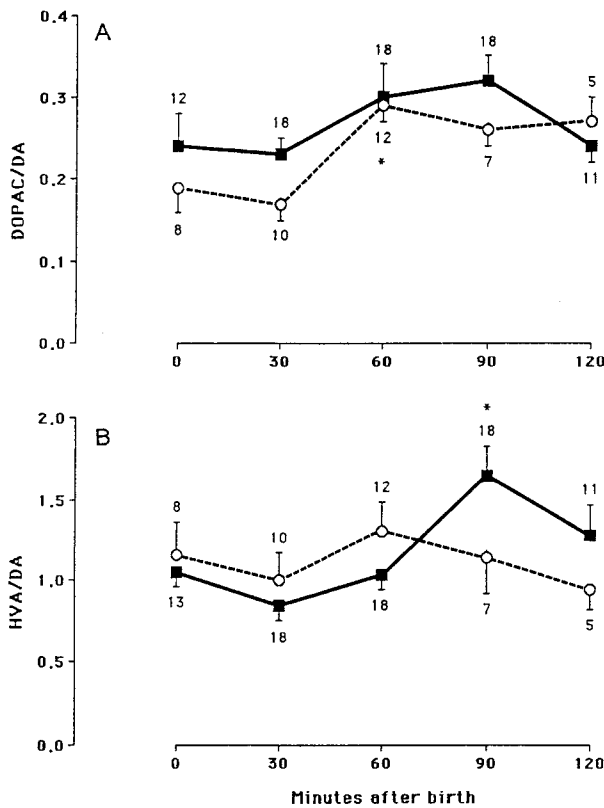


Fig. 3. Evolution of the hypothalamic metabolism of dopamine (DOPAC/DA ratio [A] and HVA/DA ratio [B]) in male (■) and female (○) newborn rats through the early period following delivery. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons: - vs time 0 minute: * P < 0.05

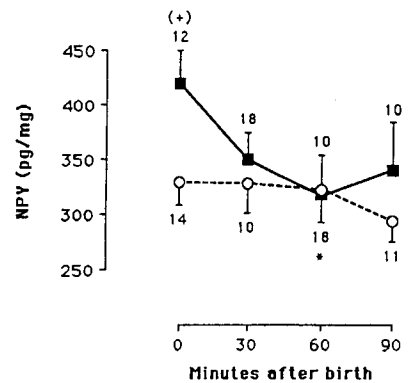


Fig. 4. Evolution of the hypothalamic content of NPY in male (■) and female (○) newborn rats during the first 90 minutes after delivery. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons: - vs time 0 minute: * P < 0.05
 - males vs females: (+) P < 0.05

Estradiol

In newborn females, plasma estradiol levels were not significantly increased after delivery ($F_{4,49} = 1.44$; $P > 0.05$) (Fig. 6B).

DISCUSSION

According present data the metabolism of biogenic amines (serotonin, norepinephrine and dopamine) in the

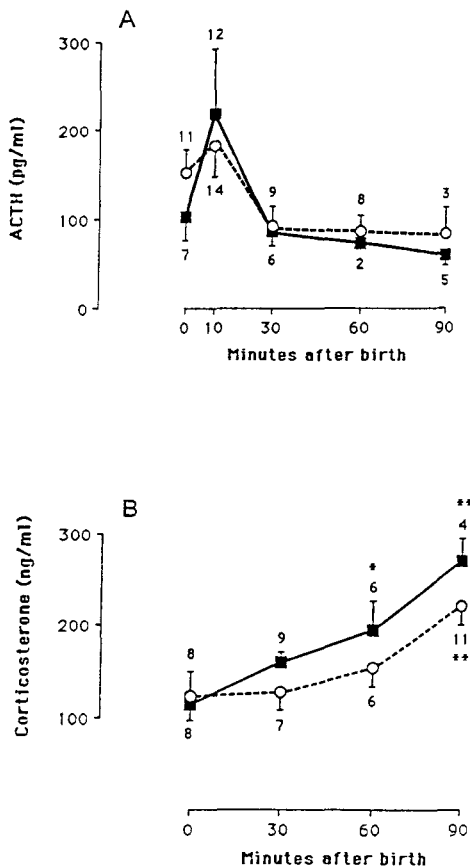


Fig. 5. Evolution of the plasma ACTH levels (A) and of the plasma corticosterone concentrations (B) in male (■) and female (○) newborn rats after birth. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons: - vs time 0 minute: * P < 0.05 ** P < 0.01

rat hypothalamus is largely sex-dependent in early postnatal life.

The evolution of the ratio 5 HIAA/5 HT indicates that the hypothalamic metabolism of 5 HT increased in the male pups during the first two hours after delivery and was then higher in the males than in the females. Up to date there are controversial data on the ontogenic sexual difference in the hypothalamic content of 5 HT in the period from postnatal day 1.5 until day 80. However according to present data the hypothalamic 5 HT content in newborn females was higher than in males; similar observations was reported for adults (review in 36).

Then a sexual dimorphism for both 5 HT hypothalamic content and metabolism was yet apparent in early postnatal life.

The metabolism of norepinephrine in the hypothalamus expressed as the ratio MHPG/NE increases in new-

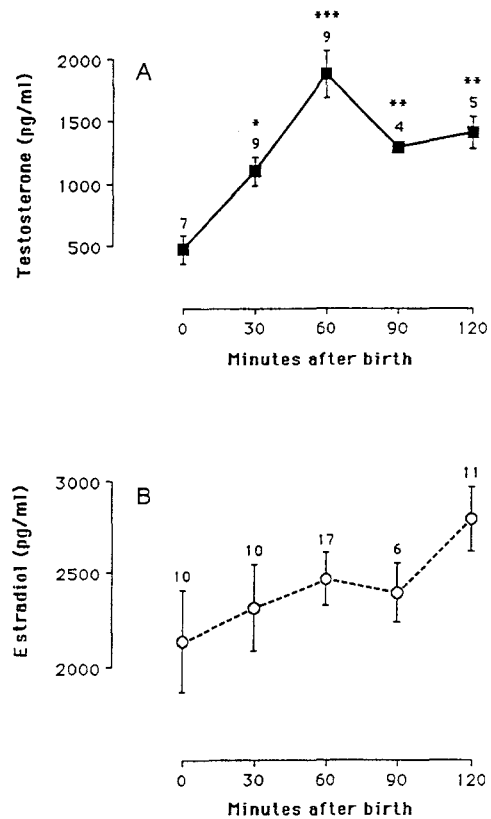


Fig. 6. Evolution of the plasma testosterone levels in newborn males (A) and of the plasma estradiol levels in newborn females (B) during the two first hours after delivery. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons: - vs time 0 minute: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

borns of both sexes and was greater in the females than in the males 60 and 90 min after birth. On the other hand the metabolism of dopamine expressed as the ratio HVA/DA was slightly increased 90 min after birth only in male newborns, in contrast the ratio DOPAC/DA was stable, except at 60 min in females.

Taken together present data suggested that a rise in the hypothalamic metabolism of catecholamines mainly NE was occurring in early postnatal life and that it was sex-dependent. These data were also consistent with immunocytochemical ones showing that the hypothalamic catecholaminergic system, which was reported to develop at the end of prenatal life and after birth, consisted of the same neuronal populations as in the adult rat though their neurons were still weakly differentiated (37).

On the other hand, present data showed that at birth, NPY levels in the hypothalamus were significantly higher in males than in females; a similar difference between sexes was reported in adult rats for the NPY con-

tent of the median eminence (13) as well as for the number of cells expressing the NPY gene in the arcuate nucleus (14). As NPY gene expression throughout several hypothalamic nuclei is positively modulated by testosterone in adults (14,38), the question is whether the sexual dimorphism in NPY neurons is due to a difference in the steroidal milieu between male and female animals during development. Indeed, as a peak of plasma testosterone was observed in 19-day-old male fetuses (19,20) one could speculate that this prenatal surge of plasma testosterone is involved to the appearance of the hypothalamic NPY sexual dimorphism. Such hypothesis needs to be confirmed by an appropriate experimentation. Moreover, as a frequent co-localization of NPY with norepinephrine was reported in both central and peripheral neurons (39) it is not surprising that a sexual dimorphism concerns both hypothalamic NPY and NE (present data).

In early postnatal life, the drop in the hypothalamic content of NPY in males, but not in females, could suggest in the former a release of this neuropeptide.

In newborn males the surge of plasma testosterone during the two first hours after delivery which confirm previous observations in the rat (19,20,40-43), was also reported in other species including newborn human infants (28). This surge was associated with a release of pituitary LH (37,44) and a transient increase in GnRH content of the hypothalamus (45). As NPY was reported to stimulate the release of GnRH from the medial hypothalamus and potentiates the release of LH in response to GnRH (12), the drop in the hypothalamic content of NPY in newborn males could be correlated with the hypothalamic stimulation of the gonadostimulating function of the adenohypophysis. Present data concerning newborn males suggested an increased activity of the hypothalamo-pituitary-testicular axis at birth in correlation with change in the metabolism of the hypothalamic NPY.

In contrast, in newborn females, the NPY content of the hypothalamus was stable and the hypothalamo-pituitary-ovarian axis was not or weakly activated at birth.

As 5 HT and NE are also potent stimulating factors of GnRH neurons (1,7,12) the early postnatal activation of the gonadostimulating function of the adenohypophysis in male newborns could be also correlated with a rise in the metabolism of 5 HT and NE in males. In contrast, the poor activation of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in females could be associated with no significant variation of the hypothalamic metabolism of 5 HT.

At birth, the plasma concentrations of ACTH as well as the corticosterone levels in both plasma and ad-

renals were similar to those previously reported for fetuses of both sexes at term (46,47). Moreover, they were comparable in both sexes. Similarly the adrenal content of aldosterone was not sex-dependent. Present data suggested a lack of sexual dimorphism for the adrenal steroidogenesis and secretion in neonates at birth. In early postnatal life, the rise in both adrenal and plasma corticosterone levels suggest an activation of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in male and female pups.

As 5 HT, NE and NPY are potent stimulating factors of CRF neurons (4,5,8,10), the early postnatal activation of the corticostimulating function of the adenohypophysis in neonates of both sexes and that of the gonadostimulating one, mainly in males, could be correlated with a rise in the metabolism of 5 HT in males and NE in newborn rats of both sexes.

Later experiments could allow to interpret this temporal correlation between hormonal and neurotransmitters changes and to specify a possible cause and effect relationships.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank J. Bernard and F. Lefèvre for their excellent technical assistance and Y. Dodey for typing the manuscript. They are grateful to Dr A. Leprêtre (Laboratoire d'Ecologie Numérique, Université de Lille 1) for the statistical treatment of data with computer programs.

REFERENCES

1. Barraclough, C. A. 1992. Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone, pages 233-251. Functional anatomy of the neuroendocrine hypothalamus, vol. 168, Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium.
2. Buckingham, J. C., Smith, T. and Loxley, H. D. 1992. The control of ACTH secretion, pages 131-158, in V. H. T. James (ed.), The adrenal gland, Second Edition, Raven Press, Ltd., New York.
3. Ur, E. and Grossman, A. 1994. The neuroregulation of corticotropin secretion, pages 309-330, in H. Imura (ed.), The pituitary gland, Second Edition, Raven Press, Ltd., New York.
4. Whitnall, M. H. 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progr. Neurobiol.* 40:573-629.
5. Fuller, R. W. 1992. The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front. Neuroendocrinol.* 13:250-270.
6. Mendelson, S. D. 1992. A review and reevaluation of the role of serotonin in the modulation of lordosis behavior in the female rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16:309-350.
7. Vitale, M. L., and Chiochio, S. R. 1993. Serotonin a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine Rev.* 14:480-493.
8. Mezey, E. and Palkovits, M. 1991. CRF-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus: regulation, especially by catecholamines. *Front. Neuroendocrinol.* 12:23-37.

9. Gaillet, S., Lachuer, J., Malaval, F., Assenmacher, I. and Szafarczyk, A. 1991. The involvement of noradrenergic ascending pathways in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretions is dependent on the nature of stressors. *Exp. Brain Res.* 87:173-180.
10. Suda, T., Tozawa, F., Iwai, I., Sato, Y., Sumitomo, T., Nakano, Y., Yamada, M., and Demura, H. 1993. Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Molec. Brain Res.* 18:311-315.
11. Brooks, A. N., Howe, D. C., Porter, D. W. F. and Naylor, A. M. 1994. Neuropeptide-Y stimulates pituitary-adrenal activity in fetal and adult sheep. *J. Neuroendocrinol.* 6:161-166.
12. Freeman, M. E. 1993. Neuropeptide Y: A unique member of the constellation of gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology.* 133:2411-2412.
13. Sahu, A., Crowley, W. R., Kalra, P. S., and Kalra, S. P. 1992. A selective sexually dimorphic response in the median eminence neuropeptide Y. *Brain Res.* 573:235-242.
14. Urban, J. H., Bauer-Dantoin, A. C., and Levine, J. E. 1993. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology.* 132:139-145.
15. Chatelain, A., Dupouy, J. P., and Allaume, P. 1980. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology* 106:1297-1303.
16. Chatelain, A., Durand, J. P., Naaman, E., and Dupouy, J. P. 1989. Ontogeny of ACTH₁₋₂₄ receptors in rat adrenal glands during the perinatal period. *J. Endocrinol.* 123:421-428.
17. Cohen, A., Chatelain, A., and Dupouy, J. P. 1983. Late pregnancy maternal and fetal time-course of plasma ACTH and corticosterone after continuous ether inhalation by pregnant rats. Cytomunological study of fetal hypophyseal cells. *Biol. Neonate.* 43:220-228.
18. Dupouy, J. P., and Chatelain, A. 1981. La fonction corticotrope dans la période périnatale: ontogenèse et régulation. *J. Physiol. (Paris)* 77:955-968.
19. Lalau, J. D., Aubert, M. L., Carmignac, D. F., Grégoire, I., and Dupouy, J. P. 1990. Reduction in testicular function in rats. I. Reduction by specific gonadotropin-releasing hormone antagonist in fetal rats. *Neuroendocrinology.* 51:284-288.
20. Lalau, J. D., Aubert, M. L., Carmignac, D. F., Grégoire, I., and Dupouy, J. P. 1990. Reduction in testicular function in rats, II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology.* 51:289-293.
21. Hary, L., Dupouy, J. P., and Chatelain, A. 1981. Pituitary response to bilateral adrenalectomy, metyrapone treatment and ether stress in the neonate. *Biol. Neonate.* 39:28-36.
22. Hary, L., Dupouy, J. P., and Chatelain, A. 1984. Effect of norepinephrine on the pituitary adrenocorticotrophic activation by ether stress on the in vitro release of ACTH by the adenohipophysis of male and female newborn rat. *Neuroendocrinology.* 39:105-113.
23. Boudouresque, F. 1987. Régulation de la fonction corticosurrénalienne chez le rat au cours du développement. Thèse de Doctorat d'Etat, Montpellier, France.
24. Cohen, A., and Péchinot, D. 1979. Corticostérone dans le plasma de rat: taux maternel et foetal en fin de gestation et pendant la parturition; fraction libre et liée. *J. Physiol.* 75:4A.
25. Kraiem, Z., Sack, J., and Brish, M. 1985. Serum cortisol levels: the first 10 days in full-term and preterm infants. *Isr. J. Med. Sci.* 21:170-172.
26. Lee, M. M., Rajagopalan, L., Berg, G. J., and Moshang, J. r. T. 1989. Serum adrenal steroid concentrations in premature infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:1133-1136.
27. Rokicki, W., Forest, M. G., Loras, B., Bonnet, H., and Bertrand, J. 1990. Free cortisol of human plasma in the first three months of life. *Biol. Neonate.* 57:21-29.
28. Corbier, P., Edwards, D. A., and Roffi, J. 1992. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch. Int. Physiol. Bioch. Biophys.* 100:127-131.
29. Bernet, F., Maubert, E., Bernard, J., Montel, V., and Dupouy, J. P. 1994. In vitro steroidogenic effects of neuropeptide Y (NPY₁₋₃₆), Y₁ and Y₂ receptor agonists (Leu³¹-Pro³⁴ NPY, NPY₁₈₋₃₆) and peptide YY (PYY) on rat adrenal capsule/zona glomerulosa. *Regul. Peptides.* 52:187-193.
30. Bernet, F., Maubert, E., Deloof, S., Bernard, J., Montel, V., and Dupouy, J. P. 1991. Effects of estrous cycle and of in vivo unilateral or bilateral adrenal demedullation on the distribution of norepinephrine and epinephrine between different zones of the adrenal. *J. Neuroendocrinol.* 5:523-528.
31. Maubert, E., Dupouy, J. P., and Bernet, F. 1993. Effect of adrenal demedullation on neuropeptide Y content of the capsule/glomerulosa zone of the rat adrenal gland. *Neurosci. Lett.* 156:5-8.
32. Chatelain, A., and Dupouy, J. P. 1985. Adrenocorticotrophic hormone in the anterior and neurointermediate lobes of the rat during the perinatal period. Polymorphism, biological and immunological activities of ACTH. *Biol. Neonate.* 47:235-248.
33. Warnhoff, M. 1984. Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their main metabolites in rat brain using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Enzymatic hydrolysis of metabolites prior to chromatography. *J. Chromatogr.* 307:271-281.
34. Kim, C., Speisky, M. B., and Kharouba, S. N. 1987. Rapid and sensitive method for measuring norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their major metabolites in rat brain by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 386:25-35.
35. Lema, M., Otero, J., and Marco, J. 1991. Two parameter mobile phase optimization for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of dopamine, serotonin and related compounds in microdissected rat brain nuclei. *J. Chromatogr.* 547:113-120.
36. Ugrumov, M. V. 1992. Development of the hypothalamic monoaminergic system in ontogenesis. Morpho-functional aspects. *Zool. Sci.* 9:17-36.
37. Borisova, N. A., Saprionova, A. Y., Proshlyakova, E. V. and Ugrumov, M. V. 1991. Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats: synthesis, uptake and release of catecholamines. *Neurosci.* 43:223-229.
38. Sahu, A., Phelps, C. P., White, J. D., Crowley, W. R., Kalra, S. P. and Kalra, P. S. 1992. Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology.* 130:3331-3336.
39. Hökfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Lindh, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T., and Terenius, L. 1987. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia.* 43:758-780.
40. Corbier, P., Kerdelhué, B., Picon, R. and Roffi, J. 1978. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 103:1985-1991.
41. Corbier, P., Rhoda, J., Kerdelhué, B. and Roffi, J. 1981. Augmentation de la testostérone endogène dans l'hypothalamus du rat mâle à la naissance. *C.r. Acad. Sci. Paris.* 292:413-416.
42. Pang, S. F., Caggiula, A. R., Gay, V. L., Coodman, R. L., and Pang, C. S. F. 1979. Serum concentrations of testosterone, estrogens, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rats during the critical period of neural sexual differentiation. *J. Endocrinol.* 80:103-110.
43. Slob, A. K., Ooms, M. P., and Vreeburg, J. T. M. 1980. Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats. *J. Endocrinol.* 87:81-87.
44. Roffi, J., Corbier, P., and Kerdelhué, B. 1977. Stimulation de la sécrétion de LH et de FSH et augmentation du poids testi-

- culaire à la naissance chez le rat. *C.r. Acad. Sci. Paris.* 284: 1313-1316.
45. Corbier, P., Roffi, J., Rhoda, J., and Kerdelhué, B. 1984. Increased activity of the hypothalamo-pituitary testicular axis in the rat at birth: implication in the sexual differentiation of the brain? In Serio et al., *Sexual differentiation: basic and clinical aspects*, Raven Press, Ltd., New York, pp. 133-148.
46. Dupouy, J. P., and Chatelain, A. 1987. Fetal development of corticostimulating function in mammals. *Life Science Advances, Exp. Clin. Endocrinol.* 6:175-184.
47. Dupouy, J. P., Chatelain, A., Boudouresque, F., Conte-Devolx, B., and Oliver, C. 1987. Effects of chronic maternal dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat fetus. *Biol. Neonate.* 52:216-222.
48. Ueda, S., Matsumoto, Y., Nisimura, A., Azmitia, E. C., and Kawata, M. 1995. Role of neuropeptide Y projection on the development of serotonergic innervation in the suprachiasmatic nucleus of the rat, shown by triple intraocular grafts. *Brain Res.* 673:325-330.
49. Alves, S. E., Akbari, H. M., Azmitia, E. C., and Strand, F. L. 1993. Neonatal ACTH and corticosterone alter hypothalamic monoamine innervation and reproductive parameters in the female rat. *Peptides* 14:379-384.

Effects of Prenatal Morphine on Hypothalamic Metabolism of Neurotransmitters and Gonadal and Adrenal Activities, During the Early Postnatal Period in the Rat

J. Lesage,¹ F. Bernet,¹ V. Montel,¹ and J. P. Dupouy^{1,2}

(Accepted March 22, 1996)

It is noteworthy that exposure to opiates during fetal development results in permanent changes in adults related to morphological, behavioral and biochemical measures; however little is known concerning the effects of such drugs in early postnatal life. We investigated in newborn rats the effects of prenatal morphine-exposure on both—the hypothalamic metabolism of norepinephrine (NE), serotonin (5 HT) and neuropeptide Y (NPY)—the activity of the hypothalamo-pituitary gonadal and adrenal axes. In a previous study performed in newborns of untreated mothers, we reported some sex-dependent changes in the metabolism of NE, 5 HT and NPY in the hypothalamus and an early activation of the gonadostimulating function and of the corticostimulating one. In control newborns from saline-treated mothers, a slight increase in the hypothalamic metabolism of NE (males) and 5 HT (males and females) was observed and it was comparable in both sexes. On the other hand, the hypothalamic content of NPY was unaffected in early postnatal period in newborn males as well as in females. These changes observed on hypothalamic metabolisms are temporally correlated with the early postnatal activation of the corticostimulating function in neonates of both sexes and that of the gonadostimulating one, mainly in males. Prenatal morphine exposure altered the hypothalamic metabolism of 5 HT which was increased mainly in newborn females but did not affect either the metabolism of NE or the NPY content of the hypothalamus. The more drastic effect of the prenatal morphine treatment is the atrophy and hypoactivity of the adrenals in newborns of both sexes at birth time and during the early postnatal period. In contrast morphine did not impair postnatal surge of the plasma testosterone level in male pups as well as late and slight increase of plasma estradiol in female ones.

KEY WORDS: Morphine; hypothalamic metabolism; norepinephrine; serotonin; neuropeptide Y; corticosterone; testosterone; estradiol; newborn-rat.

INTRODUCTION

In humans, maternal opiates abuse during the gestation induces fetal growth retardation (1) and severe reduction in size and number of cells in several organs

or tissues including mainly the adrenals, the liver and the adipose tissue (review in 2). However, the effects of prenatal morphine-exposure on adrenal activity in newborns have not been investigated yet.

The hypothalamo-pituitary adrenal axis is already functional in both rat fetuses in late gestation and newborns (3,4) and an abrupt rise of plasma corticosterone or cortisol occurs within the first postnatal minutes or hours respectively in rat pups (5) and human newborns (6,7).

¹ Centre de Biologie Cellulaire, Neuroendocrinologie Expérimentale Neuroendocrinologie du Développement, J.E.234, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

² To whom to address reprint requests. Téléphone: 20 43 43 68; Telex: 20 43 40 65.

Opioids have been shown to exert complex effects on the functional activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. Given acutely to adult rats, morphine evokes HPA activity by stimulation of specific receptors in the hypothalamus (8,9). Whereas given chronically it reduces the release of pro-opiomelanocortin-derived peptides and corticosteroids (8,10). Hypothalamic norepinephrine (NE) may mediate morphine-induced activation of the HPA axis in the adult rat (11). Moreover, other central neurotransmitters are involved in the regulation of pituitary adrenocortical function as serotonin (5 HT) in adults (14) as well as in newborns (15) and the neuropeptide Y (NPY) in adults (16). On the other hand, sexually dimorphic effects of prenatal morphine have been reported on hypothalamic content of NE in postnatal (13) or adult rats (2,12) however data are lacking in newborns.

The prenatal morphine exposure affects also adult male and mainly female sexual behavior (2,12,17,18). In male, the adult sexual behavior is determined by the sex steroids produced in early postnatal period (19,20). Indeed, the hypothalamo-pituitary testicular axis is already functional in both rat fetuses and newborns (21,22) and a transitory surge in serum testosterone occurs in males in a variety of mammalian species including humans (23). The neonatal secretion of androgens that irreversibly masculinize brain structures underlying reproductive behavior also affects rat brain catecholamine content (24).

As norepinephrine is one of the major neurotransmitters which activates GnRH neurons and LH surge (25), sexual dimorphic morphine-induced alterations in both adult behavior and brain catecholamine content could be the consequence of prenatal drug action on central regulation of the gonadostimulating function.

In contrast, the role of 5 HT in the release of GnRH and/or LH (Luteinizing hormone) is not clear yet in spite of the fact that recent results suggest a permissive and/or stimulatory effect, mainly in females (26). The effect of opiates on the ontogenesis of the serotonergic system is poorly documented although it was reported that perinatal opiate treatment reduces the development of the central serotonergic neurons (27).

On the other hand, NPY stimulates the release of GnRH from the medial basal hypothalamus and potentiates the release of LH and FSH in response to GnRH (28). Moreover a sexual dimorphism for both hypothalamic NPY content and NPY gene expression has been reported in adults (29,30). However it was reported that chronic morphine administration to adult rats, decreases NPY contents in both the hypothalamus and the adrenals (31); data on perinatal effects of opiates on NPY are lacking.

We previously reported that in newborn rats, an early activation of the gonadostimulating function and/or of the corticostimulating one is temporally correlated with sex-dependent changes in the metabolism of 5 HT, NE and NPY in the hypothalamus (32).

The aim of the present study was to determine in newborn rats, the effects of a prenatal morphine exposure 1° on the hypothalamic metabolism of NE, 5 HT and NPY; 2° on the activity of the hypothalamo-pituitary-gonadal and adrenal axes, during the early postnatal period.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals. Experiments were performed on Wistar rats bred in our laboratory. Females were mated with a male for one night. The next day was taken as day 0 of pregnancy if spermatozoa were found in vaginal smears. Pregnant females were transferred into individual cages 24 h before being killed. The rats were housed in a light-controlled room (light period from 7 a.m. to 7 p.m.) with rat chow and tap water available ad libitum.

Animal use accreditation by the French Ministry of the Agriculture (n° 04860) has been delivered to our laboratory for experimentation with rats.

Treatments. Pregnant females were randomly assigned to a morphine-treated experimental group or a saline-treated control one.

Morphine sulfate was obtained from Sanofi-Francopria (Paris) and dissolved in physiological saline (0.9% NaCl) to obtain a concentration of 6 mg/ml. Pregnant females were treated twice a day (9 a.m. and 5 p.m.) from day 11 to day 18, either with morphine given s.c. (10 mg/kg under a volume of 0.5 ml) or the same volume of solvent (0.9% NaCl). Morphine use accreditation by French Ministry of Health (n° 9300196 S) has been delivered to our laboratory for experimentation with rats.

Sacrifices. Pregnant females at term (day 21 of gestation) were rapidly killed by decapitation between 9 a.m. and 10 a.m. Each litter usually contained between 8 to 12 fetuses which were collected by cesarean section and either immediately sacrificed or kept at 30–33°C for various times up to 90 or 120 min before being sacrificed. The sex of the pups was determined by examination of the genitals.

Plasma and Tissue Collections. Trunk blood of the fetuses was collected after decapitation and put in polyethylene tubes pre-rinsed with EDTA [5 µl; 5% (w/v) EDTA for 100 µl of blood]. The blood samples were centrifuged at 3,500 g for 15 min at 4°C. Plasma samples were kept at –30°C until assayed for circulating hormones.

The male and female adrenals and the male testicles were quickly removed, defatted, weighted and sonicated in an appropriate volume of either acetic acid 0.5 M (adrenals) or NaCl 0.9% (testicles) at 4°C. After centrifugation, the aliquot fractions of the supernatants were kept at –30°C until assayed for corticosterone, estradiol and testosterone.

Hypothalamic tissues were rapidly removed from the brain after decapitation of the fetuses. The hypothalamic fragment including the median eminence and the pituitary stalk was delimited by the optic chiasma and the mammillary bodies; it was cut at a depth of about 1–2 mm. The hypothalamic pieces were usually sonicated in 0.200 ml of acetic acid 0.5 M; an aliquot fraction of 0.150 ml destined for the RIA of NPY was heated 15 min at 70°C to inactivate proteolytic enzymes. The remainder (0.050 ml) was reserved to determine by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electro-

chemical detection, the content of neurotransmitters: Norepinephrine (NE), Serotonin (5 HT)] and its main metabolite, 5-hydroxyindolacetic acid (5 HIAA). For MHPG determination (NE metabolite), the hypothalamic pieces were sonicated in 0.12 M sodium acetate pH 5.0. All the fractions were centrifuged at 22,000 g at 4°C for 20 min and the supernatants were frozen and stored at -30°C until used.

The «metabolism» of each neurotransmitter is expressed as the ratio of the main metabolite to the parent transmitter e.g. 5 HIAA/5 HT and MHPG/NE.

Radioimmunoassays

Extractions. Steroid hormones assays in plasma samples and tissue ones are preceded by an extraction in ethylacetate after a delipidation in isooctane. The percentage of recovery of a known amount of steroid was over 66% (testosterone), 73% (estradiol) and 95% (corticosterone).

Corticosterone, Testosterone, and Estradiol Assays. Corticosterone concentrations were measured by RIA according to the method previously described (33).

Testosterone and estradiol concentrations were determined by radioimmunoassay according to the method previously described (32).

NPY Assay. The NPY content of the hypothalamic samples were determined by RIA according to the protocol of Maubert et al. (34).

Analysis of Norepinephrine, Serotonin and Their Main Metabolites. NE, 5 HT, and their main metabolites (MHPG and 5 HIAA) were determined by HPLC according to the protocol previously described (32).

Statistical Analysis. All measures were subjected to three-way analysis of variance (sex \times prenatal drug \times time). To evaluate significant three-way interactions the differences between the control and drug-treated groups were determined in each sex by two-way analysis of variance (prenatal drug \times time) and Dunnett's test was used for post hoc comparisons. For paired comparisons, the Student's *t*-test was used. Differences were considered statistically significant if $P < 0.05$.

RESULTS

Gestational morphine had no effect on litter size (total of 54 litters: 26 solvent (S) and 28 morphine (M); mean number of pups: 9.38 ± 0.65 (S) vs 8.78 ± 0.64 (M); $P > 0.05$) and on the male to female ratio (males: 4.77 ± 0.41 (S) vs 4.19 ± 0.42 (M); $P > 0.05$; females: 4.61 ± 0.51 (S) vs 4.89 ± 0.44 (M); $P > 0.05$).

Metabolism of the Biogenic Amines in the Hypothalamus. Norepinephrine. In newborns of the two experimental groups (saline and morphine-treated females), the NE content of the hypothalamus did not significantly vary in both sexes up to 90 min after delivery (Table I) and no difference between males and females was observed in each group (Table I).

The NE content of the hypothalamus was not affected by prenatal morphine-treatment except in male pups which showed a significant reduction ($P < 0.05$) only at birth time (Table I).

There was a significant main effect of time ($F_{3,82} = 2.75$; $P < 0.05$) and a significant interaction between time and treatment ($F_{3,82} = 2.79$; $P < 0.05$) on the levels of MHPG in the hypothalamus.

In males from saline-treated mothers the MHPG content of the hypothalamus did not vary significantly up to 90 min postpartum and the ratio MHPG/NE increased slightly but was significantly increased only 90 min after birth ($F_{3,23} = 3.12$; $P < 0.05$) (Table I). In males from morphine-treated mothers, both the MHPG content of the hypothalamus and the ratio MHPG/NE did not significantly vary up to 90 min after birth (Table I).

In females from saline-treated mothers, both MHPG content of the hypothalamus and the ratio MHPG/NE were stable up to 90 min after birth (Table I).

In females from morphine-treated mothers the MHPG content of the hypothalamus was significantly increased 60 min after delivery ($F_{3,24} = 4.53$; $P < 0.05$) and it was then significantly greater than that of controls ($P < 0.01$) (Table I), however the ratio MHPG/NE was not significantly modified up to 90 min after birth time and was not different from that observed in controls (Table I).

Serotonin. Significant main effects of prenatal drug treatment ($F_{1,106} = 7.34$; $P < 0.01$) time ($F_{3,106} = 10.63$; $P < 0.01$) and sex ($F_{1,106} = 7.09$; $P < 0.001$) were found on hypothalamic 5 HT levels.

In male and female newborns from saline-treated mothers, the 5 HT content of the hypothalamus was stable up to 90 min after birth time and was similar in both sexes (Table II).

In males from morphine-treated mothers, a significant increase of the 5 HT content of the hypothalamus was observed only 60 min after delivery ($F_{3,23} = 5.55$; $P < 0.01$); in littermate females, the 5 HT content showed a slight, but not significant, increase 60 min after birth (Table II). No difference between males and females was observed at all investigated times.

There was a significant main effect of prenatal treatment ($F_{1,113} = 7.27$; $P < 0.01$) and time ($F_{3,113} = 24.98$; $P < 0.001$) and a significant interaction between sex and time ($F_{3,113} = 2.79$; $P < 0.05$) on the level of 5 HIAA in the hypothalamus.

The 5 HIAA content of the hypothalamus in newborns from saline-treated mothers was significantly increased 60 min (females) ($P < 0.01$) and 90 min (males: $F_{3,29} = 3.37$; $P < 0.05$; females: $F_{3,25} = 11.32$; $P < 0.001$) after delivery (Table 2), however no difference was observed between sexes. In these newborns, the ratio 5 HIAA/5 HT was stable in males (Table II) but significantly increased in females at 90 min ($P < 0.001$) (Table II). It was then greater in females than in littermate males ($P < 0.05$).

Table I. Effects of Prenatal Morphine on Hypothalamic Content of NE and MHPG in Male and Female Exposed-Newborns at Different Times After Delivery

(ng/mg)	Sex	prenatal treatment	Time after delivery (minutes)			
			0	30	60	90
NE	♂	solvent	0.349 ± 0.037 (8)	0.288 ± 0.036 (8)	0.370 ± 0.017 (7)	0.313 ± 0.021 (12)
		morphine	0.262 ± 0.016 (11) ⁺	0.377 ± 0.074 (6)	0.315 ± 0.031 (8)	0.345 ± 0.037 (4)
	♀	solvent	0.305 ± 0.043 (10)	0.326 ± 0.021 (6)	0.318 ± 0.033 (6)	0.346 ± 0.023 (8)
		morphine	0.313 ± 0.033 (10)	0.299 ± 0.020 (9)	0.382 ± 0.015 (8)	0.328 ± 0.026 (7)
MHPG	♂	solvent	0.099 ± 0.023 (5)	0.164 ± 0.042 (8)	0.177 ± 0.027 (8)	0.171 ± 0.022 (5)
		morphine	0.108 ± 0.021 (11)	0.128 ± 0.021 (6)	0.170 ± 0.035 (6)	0.192 ± 0.002 (2)
	♀	solvent	0.141 ± 0.019 (5)	0.167 ± 0.026 (6)	0.105 ± 0.027 (5)	0.180 ± 0.044 (6)
		morphine	0.116 ± 0.023 (8)	0.126 ± 0.010 (9)	0.245 ± 0.056 (5) ^{*(+++)}	0.161 ± 0.009 (6)
MHPG NE	♂	solvent	0.283 ± 0.067 (5)	0.569 ± 0.144 (8)	0.478 ± 0.073 (8)	0.546 ± 0.069 (5)*
		morphine	0.413 ± 0.079 (5)	0.338 ± 0.055 (6)	0.519 ± 0.114 (6)	0.552 ± 0.002 (2)
	♀	solvent	0.463 ± 0.063 (5)	0.512 ± 0.081 (6)	0.315 ± 0.080 (5)	0.520 ± 0.127 (6)
		morphine	0.371 ± 0.072 (8)	0.424 ± 0.033 (9)	0.638 ± 0.147 (5)	0.478 ± 0.025 (6)

Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:

- vs time 0 minute: *P < 0.05

- morphine- vs saline-exposed newborns: (+)P < 0.05 (++)P < 0.01

The 5 HIAA content of the hypothalamus in newborns from morphine-treated mothers was increased in both males ($F_{3,25} = 4.65$; $P < 0.01$) and females ($F_{3,34} = 8.61$; $P < 0.001$) 60 and 90 min after birth ($P < 0.01$) (Table II) but no difference between sexes was observed.

The 5 HIAA content of the hypothalamus was significantly greater at birth time ($P < 0.01$) and 30 min ($P < 0.05$) later in females from morphine group than in females from saline one (Table II). The ratio 5 HIAA/5 HT in pups from morphine group was stable in males but significantly increased in littermate females at 30 ($P < 0.05$) and 90 min ($P < 0.01$) (Table II). Half an hour after birth the ratio 5 HIAA/5 HT was significantly higher in females from morphine group than in controls ($P < 0.05$) (Table II).

Neuropeptide Y Levels in the Hypothalamus. In male and female newborns from saline-treated mothers, the NPY content of the hypothalamus was comparable at birth time and showed a transient but not significant decrease 30 and 60 min after birth (Table III). Morphine-treatment of the mothers was unable to affect significantly both the NPY content of the hypothalamus at birth time as well as its evolution during the first post-natal minutes (Table III).

Adrenal Weight and Plasma Corticosterone. There was a drastic main effect of prenatal morphine treatment on adrenal weight ($F_{1,149} = 82.33$; $P < 0.001$).

The newborns of both sexes from morphine-treated mothers showed at birth time, a significant atrophy of their adrenals in comparison with those of controls (Fig.

Table II. Effects of Prenatal Morphine on Hypothalamic Content of 5HT and 5HIAA in Male and Female Exposed-Newborns at Different Times After Delivery

(ng/mg)	Sex	prenatal treatment	Time after delivery (minutes)			
			0	30	60	90
5HT	♂	solvent	0.238 ± 0.053 (8)	0.130 ± 0.024 (8)	0.269 ± 0.076 (7)	0.275 ± 0.042 (10)
		morphine	0.240 ± 0.033 (11)	0.163 ± 0.018 (6)	0.468 ± 0.084 (6)**	0.378 ± 0.107 (4)
	♀	solvent	0.192 ± 0.045 (8)	0.107 ± 0.014 (9)	0.261 ± 0.091 (5)	0.142 ± 0.036 (3)
		morphine	0.228 ± 0.034 (10)	0.139 ± 0.015 (9)	0.342 ± 0.062 (11)	0.201 ± 0.026 (8)
5HIAA	♂	solvent	0.294 ± 0.043 (8)	0.267 ± 0.045 (8)	0.334 ± 0.044 (7)	0.488 ± 0.070 (10)*
		morphine	0.294 ± 0.025 (11)	0.347 ± 0.044 (6)	0.479 ± 0.058 (6)**	0.507 ± 0.062 (6)**
	♀	solvent	0.196 ± 0.028 (8)	0.190 ± 0.026 (9)	0.396 ± 0.033 (5)**	0.411 ± 0.087 (8)**
		morphine	0.333 ± 0.027 (10) ⁺⁺⁺	0.336 ± 0.043 (9) ⁺⁺	0.484 ± 0.033 (11)**	0.627 ± 0.086 (8)**
$\frac{5HIAA}{5HT}$	♂	solvent	1.529 ± 0.224 (8)	1.982 ± 0.231 (7)	1.310 ± 0.145 (6)	1.753 ± 0.277 (9)
		morphine	1.483 ± 0.215 (11)	2.199 ± 0.293 (6)	1.265 ± 0.293 (6)	1.692 ± 0.534 (6)
	♀	solvent	1.177 ± 0.215 (7)	1.796 ± 0.131 (9)	1.673 ± 0.449 (5)	2.920 ± 0.399 (5) ^{***#}
		morphine	1.735 ± 0.267 (10)	2.398 ± 0.222 (9) ^{*(+)}	1.837 ± 0.258 (11)	3.087 ± 0.143 (8)**

Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:

- vs time 0 minute: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001

- morphine- vs saline-exposed newborns: (+)P < 0.05 (++)P < 0.01

- female- vs male-exposed newborns: #P < 0.05

1 A,B); in males and females of both experimental groups, the adrenal weight did not vary significantly up to 90 min after delivery (Fig. 1 A, B).

There was a significant main effect of prenatal drug treatment ($F_{1,115} = 28.43$; $P < 0.001$) time ($F_{3,115} = 12.56$; $P < 0.001$) and a significant interaction between time and treatment ($F_{3,115} = 5.24$; $P < 0.001$) on plasma levels of corticosterone.

In the control group, the plasma corticosterone concentration which was similar in neonates of both sexes at birth time was raising during the early postnatal period and reached highest levels at 60 ($P < 0.01$) and 90 min ($F_{3,27} = 3.73$; $P < 0.05$) in males or 90 min in females ($F_{3,26} = 9.10$; $P < 0.001$) (Fig. 1 C,D).

In newborn males from morphine-treated mothers, the plasma corticosterone concentration was, at delivery, not significantly different from that observed in control pups and did not significantly vary in early postnatal life (Fig. 1C). The plasma corticosterone level was significantly lowered at 30 ($P < 0.05$) and 90 min ($P < 0.01$), in morphine-exposed males than in controls (Fig. 1C).

In newborn females prenatally exposed to morphine, the plasma corticosterone concentration showed a weak postnatal increase which was not significantly increased after delivery (Fig. 1D); moreover corticosterone levels were significantly reduced in comparison with controls at 0 ($P < 0.05$) and 90 min periods ($P < 0.001$) (Fig. 1D).

Table III. Effects of Prenatal Morphine on Hypothalamic Content of NPY in Male and Female Exposed-Newborns at Different Times After Delivery

(pg/mg)	Sex	prenatal treatment	Time after delivery (minutes)			
			0	30	60	90
NPY	♂	solvent	303 ± 36 (10)	242 ± 29 (10)	247 ± 26 (13)	322 ± 20 (13)
		morphine	306 ± 36 (11)	269 ± 42 (10)	253 ± 38 (5)	284 ± 35 (6)
	♀	solvent	298 ± 34 (9)	212 ± 26 (7)	234 ± 22 (7)	254 ± 33 (9)
		morphine	250 ± 20 (10)	230 ± 26 (7)	283 ± 27 (14)	318 ± 49 (8)

Means ± SEM and number of individual determinations. Differences between experimental groups (morphine- vs saline-exposed newborns) and in each group (vs time 0 minute) were not statistically significant.

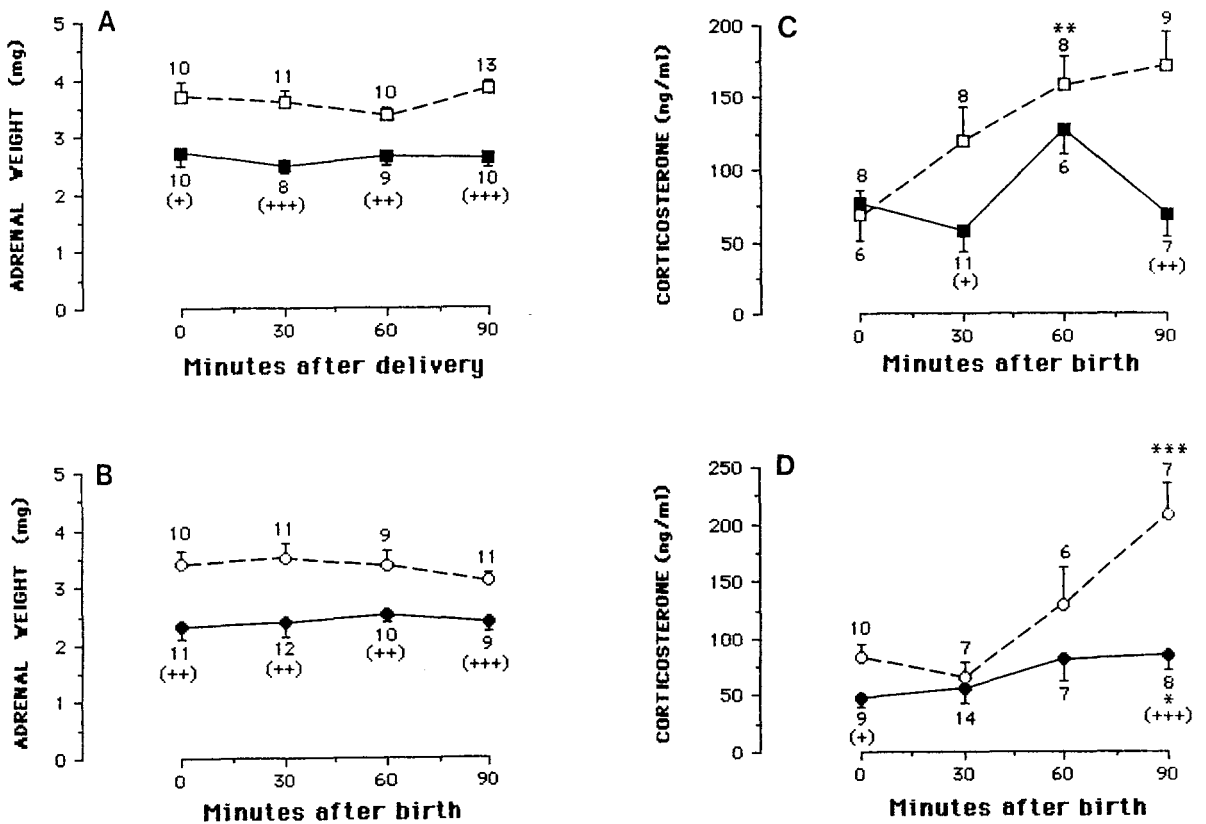


Fig. 1. Effects of prenatal morphine on the adrenal weight (A-B) and the evolution of the plasma corticosterone concentrations (C-D) in male (□) and female (○) newborn rats through the early period following delivery. The open symbols represent saline- and filled symbols morphine-exposed animals. Means ± SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:—vs time 0 minute: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001—morphine- vs saline-exposed newborns: (+) P < 0.05 (++) P < 0.01 (+++) P < 0.001

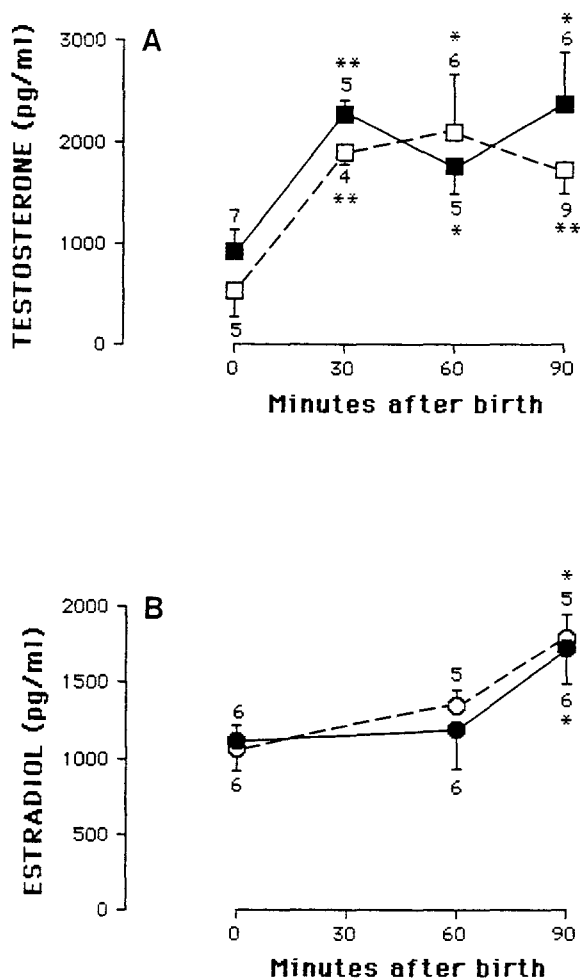


Fig. 2. Effects of prenatal morphine on the evolution of the plasma testosterone levels in newborn males (A) and of the plasma estradiol levels in newborn females (B) during the early postnatal period. The open symbols represent saline- and filled symbols morphine-exposed animals.

Means \pm SEM and number of individual determinations. Mean's comparisons:—vs time 0 minute: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Testicular Weight and Testosterone Levels. The weight and the testosterone content of the testicles were not significantly modified within the first 90 min of newborn life either in controls or in morphine-exposed pups (data not shown).

In control pups, as well as in morphine-exposed ones, the plasma testosterone level increased abruptly and similarly (respectively, $F_{3,20} = 2.52$; $P < 0.05$; $F_{3,18} = 4.45$; $P < 0.05$) in the first postnatal minutes and reached highest values from 30 ($P < 0.01$) to 90 min. (respectively: $P < 0.01$ and $P < 0.05$) (Fig. 2A).

Plasma Estradiol. In early postnatal period, the plasma level of estradiol increased slightly in both control ($F_{2,13} = 16.00$; $P < 0.001$) and morphine-exposed newborn females ($F_{2,15} = 4.79$; $P < 0.05$) and was significantly elevated at 90 min. ($P < 0.05$) (Fig. 2B); moreover it was comparable within the two experimental groups at all investigated periods.

DISCUSSION

Morphine treatment was unable to affect either the litter size or the male to female ratio; such data agree with those of Vathy et al. (13).

Metabolism of Norepinephrine. According present data, during the early postnatal life, the metabolism of NE, expressed as MHPG/NE ratio, in the hypothalamus of newborns from saline-treated mothers was stable in females and slightly increased in littermate males only 90 min postpartum. In a previous study on newborns of intact mothers, we showed that the hypothalamic metabolism of NE was sex-dependent and greater in females than in males (32). This latter difference between sexes that was not observed in the present study could be related to handling-induced stress during gestation. Indeed, it was elsewhere shown that prenatal stress could modulate brain catecholaminergic activity in fetal stage (35,36).

Prenatal exposition to morphine was unable to modify drastically both NE and MHPG content of the hypothalamus in both sexes (except in males at time 0 for NE) as well as the MHPG/NE ratio. Our data are in agreement with those of Vathy et al. (13) reporting that prenatal morphine significantly increased NE content in the hypothalamus of both sexes at postnatal day 23 but not at day 16. On the other hand, prenatal morphine, given at dose and protocol similar to ours, altered NE content and turnover in adult male and female rats in a regionally specific and sexually dimorphic manner (37); indeed the NE content of the hypothalamus was 60% increased in males but 30% decreased in females whereas the NE turnover in such part of the brain was 50% increased in males but 50% decreased in females. Taken together, literature data and ours suggest that prenatal morphine affects both hypothalamic NE content and metabolism, not in early postnatal period but later, mainly in adult one.

Metabolism of Serotonin. In the hypothalamus of the control newborns, we reported a rise in 5 HT content (males) and 5 HIAA one (males and females), suggesting that the metabolism of 5 HT in early postnatal pe-

riod, increased in both sexes but was slightly greater in males than in females. Such data are in agreement with those previously reported from newborns of intact mothers (32).

Present data suggested that the metabolism of 5 HT in the hypothalamus of newborns prenatally exposed to morphine was higher than in controls. Few studies of perinatal opiate effects upon the ontogeny of serotonin neurons have been published; it was suggested that the ontogeny of serotonin neurons is slowed by perinatal opiate treatment (review in 38).

Whereas total brain 5 HT content in preweanling rats is unchanged by gestational or postnatal morphine administration, many studies performed in adults have established that acute administration of morphine can stimulate 5 HT metabolism (review in 39). Present data are in agreement with these last observations.

Neuropeptide Y Levels in the Hypothalamus. The NPY levels in the hypothalamus of present controls, were not sex-dependent at birth time and thereafter. In contrast, NPY levels in this part of the brain in neonates from intact mothers were significantly higher in males than in females (32) and similar differences between sexes was reported in adult rats for the NPY content of the median eminence (29) as well as for the number of cells expressing the NPY gene in the arcuate nucleus (30). Such discrepancy between present data and previously reported ones could be related to handling-induced stress of the mothers during gestation. Moreover, as a frequent co-localization of NPY with norepinephrine was reported in both central and peripheral neurons (40), it is not surprising to observe an absence of sex differences for both hypothalamic NE and NPY content.

In newborns of the two experimental groups, the hypothalamic content of NPY was slightly but not significantly decreased at 30 and 60 min postpartum but not affected by morphine-treatment. However delayed effects of prenatal morphine on both hypothalamic NE and NPY can't be excluded. Putative effects of prenatal morphine on brain NPY of neonates have not been previously investigated. In contrast chronic administration of morphine to adults decreases NPY levels in the hypothalamus (31).

Adrenal Weight and Plasma Corticosterone. At birth time and thereafter, both adrenal weight and plasma concentrations of corticosterone in control newborns of both sexes were similar to those previously reported for newborns from intact mothers (32). Such rise in circulating corticosterone in early postnatal life suggests an activation of the HPA axis in control pups as it was reported previously in rat (5) and human newborns (6). Such activation of the HPA axis could be temporally

correlated with early postnatal changes on hypothalamic metabolism of NE (males) and 5HT (males and females). These two neurotransmitters play an important role in the regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system (42).

In contrast, pups of both sexes, prenatally exposed to morphine, showed a drastic adrenal atrophy and hypoactivity marked by a very weak increase in plasma corticosterone levels. Morphine-induced adrenal atrophy was also reported for newborn infants prenatally exposed to opiate drugs (review in 2). As prenatal morphine exposure altered the metabolism of 5HT which was increased mainly in newborn females but did not affect the metabolism of NE, morphine-induced adrenal atrophy and hypoactivity can't be easily correlated with those changes on hypothalamic metabolisms.

In late gestation, the development of the fetal adrenals depends on the production of pituitary ACTH which, in turn, is controlled by hypothalamic CRF (5,6). Then, the morphine-induced adrenal atrophy and hypoactivity could suggest some deficiency in the production of fetal ACTH and/or unresponsiveness of the fetal adrenals to ACTH-stimulation. However this last possibility seems to be excluded as ACTH₁₋₂₄ promotes, in vitro, corticosterone secretion by the adrenals of newborns from the two experimental groups morphine-treated mothers and saline-treated ones (unpublished data).

In adult male rats, acute administration of morphine was reported to stimulate HPA axis via a central catecholaminergic mediation (11). To our knowledge, the effects of morphine on the HPA axis of pregnant rats and their fetuses have not been investigated. If morphine activates this axis, one can speculate that chronic maternal hypersecretion of glucocorticoids could induce atrophy and hypoactivity of the fetal adrenals. Indeed, maternal hypersecretion of glucocorticoids as well as exogenous administration of corticosterone or dexamethasone reduce both fetal adrenal growth and activity in correlation with drastic reduction of hypothalamic CRF content and suppression of plasma ACTH (41). Experiments are performed to test such hypothesis.

Plasma Sexual Steroids. In newborn males from saline-treated mothers, an early surge of plasma testosterone occurs, suggesting postnatal activation of the hypothalamo-pituitary testicular axis as previously reported for newborns from intact mothers (32). Testosterone surge was not impaired by morphine treatment.

In newborn females, morphine-treatment does not affect the late and slight increase of plasma estradiol which was observed both in saline-treated controls (present data) and pups from intact mothers (32).

As central NE and 5HT are involved in the regulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis mainly in adults (25), changes on hypothalamic metabolism of these two neurotransmitters (present data) could be correlated with early postnatal activation of this axis in pups of both sexes.

On the other hand, the pups delivered by cesarean section were kept warm (30–33°C) but they were deprived from their mother for up to 90 min.

It was reported that deprivation of suckling and maternal care induced in 2- or 8-day old rat pups a decrease in serum growth hormone (GH) levels (43,44) which was prevented by exposing newborns to 37°C (nest temperature) during separation period (44).

In contrast, deprivation of suckling did not affect serum levels of prolactin, thyrotropin or corticosterone (43) in newborn rats older than those used in the present study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank J. Bernard and F. Lefevre for their excellent technical assistance and Y. Dodey for typing the manuscript. They are grateful to Dr A. Leprêtre (Laboratoire d'Ecologie Numérique, Université de Lille 1) for the statistical treatment of data with computer programs. We thank Dr Messines (Laboratoire Sanofi-Francochia) for the generous gift of morphine-sulfate. This study was supported in part by a grant of the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

REFERENCES

- Chasnoff, I. J. 1985. Effects of maternal narcotic vs non narcotic addition on neonatal neurobehavior and infant development. Pages 84–95, in T. M. Pinkert (Ed.), *Consequences of maternal Drug Abuse*. National Institute on Drug Abuse, Washington, DC.
- Vathy I., and Katay L. 1992. Effects of prenatal morphine on adult sexual behavior and brain catecholamines in rats. *Develop. Brain Res.* 68:125–131.
- Dupouy, J. P., and Chatelain, A. 1981. La fonction corticotrope dans la période périnatale: ontogenèse et régulation. *J. Physiol. (Paris)* 77:955–968.
- Cohen, A., Chatelain, A., and Dupouy, J. P. 1983. Late pregnancy maternal and fetal time-course of plasma ACTH and corticosterone after continuous ether inhalation by pregnant rats. Cytoimmunological study of fetal hypophyseal cells. *Biol. Neonate* 43: 220–228.
- Cohen, A., and Péchinot, D. 1979. Corticostérone dans le plasma de rat: taux maternel et fœtal en fin de gestation et pendant la parturition; fraction libre et liée. *J. Physiol.* 75:4A.
- Kraiem, Z., Sack, J., and Brish, M. 1985. Serum cortisol levels: the first 10 days in full-term and preterm infants. *Isr. J. Med. Sci.* 21:170–172.
- Lee, M. M., Rajagopalam, L., Berg, G. J., and Moshang, J. r. T. 1989. Serum adrenal steroid concentrations in premature infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:1133–1136.
- Buckingham, J. C., and Cooper, T. A. 1984. Differences in hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinol.* 38: 411–417.
- Einseleberg, R. M. 1994. Trimu-5, a μ 2-opioid receptor agonist, stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47:943–946.
- Martinez, J. A., Vargas, M. L., Fuente, T., Del Rio-Garcia, J., and Milanes, M. V. 1990. Plasma β -endorphin and cortisol levels in morphine-tolerant rats and in naloxone-induced withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 182:117.
- Martinez-Pinero, M., Victoria Milanés, M., Alcaraz, C., and Vargas, M. L. 1994. Catecholaminergic mediation of morphine-induced activation of pituitary-adrenocortical axis in the rat: implication of α - and β -adrenoceptors. *Brain Res.* 668:122–128.
- Vathy, I. 1993. Sexually dimorphic effects of prenatal morphine and cocaine on adult sexual behavior and brain catecholamines in rats. *Hormones and Behavior* 27:1–4.
- Vathy, I., Rimanoczy, A., Eaton, R. C., and Katay, L. 1995. Sex dimorphic alterations in postnatal brain catecholamines after gestational morphine. *Brain Res. Bull.* 36:185–193.
- Fuller, R. W. 1992. The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front. Neuroendocrinol.* 13:250–270.
- Boudouresque, F. 1987. Régulation de la fonction corticosurrénaliénne chez le rat au cours du développement. Thèse de Doctorat d'Etat, Montpellier, France.
- Suda, T., Tozawa, F., Iwai, I., Sato, Y., Sumitomo, T., Nakano, Y., Yamada, M., and Demura, H. 1993. Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Molec. Brain Res.* 18:311–315.
- Vathy, I., Etgen, A. M. and Barfield, R. J. 1985. Effects of prenatal exposure to morphine on the development of sexual behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22:227–232.
- Siddiqui, A., Soofia, H., Saecda, S., and Syed, G. H. V. 1995. Morphine induces reproductive changes in female rats and their male offspring. *Reprod. Toxicol.* 9:143–151.
- Corbier, P., Roffi, J., and Rhoda, J. 1983. Female sexual behavior in male rats: effect of hour of castration at birth. *Physiol. and Behav.* 30:613–616.
- Roffi, J., Chami, F., Corbier, P., and Edwards, S. A. 1987. Testicular hormones during the first few hours after birth augment the tendency of adult males to mount receptive females. *Hormones and Behav.* 39:523–527.
- Lalau, J. D., Aubert, M. L., Carmignac, D. F., Grégoire, I., and Dupouy, J. P. 1990. Reduction in testicular function in rats. I. Reduction by specific gonadotropin-releasing hormone antagonist in fetal rats. *Neuroendocrinology* 51:284–288.
- Lalau, J. D., Aubert, M. L., Carmignac, D. F., Grégoire, I., and Dupouy, J. P. 1990. Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology* 51:289–293.
- Corbier, P., Edwards, D. A., and Roffi, J. 1992. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch. Int. Physiol. Bioch. Biophys.* 100:127–131.
- Siddiqui, A., and Gilmore, P. 1988. Regional differences in the catecholamine content of the rat brain: Effects of neonatal castration and androgenization. *Acta Endocrinol.* 118:483–494.
- Barraclough, C. A. 1992. Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Functional anatomy of the neuroendocrine hypothalamus*, vol. 168, Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium, pp. 233–251.
- Mendelson, S. D. 1992. A review and reevaluation of the role of serotonin in the modulation of lordosis behavior in the female rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16:309–350.
- Slotkin, T. A., Whitmore, W. L., Salvaggio, M., and Seidler, F. J. 1979. Perinatal methadone addiction affects brain synaptic development of biogenic amine systems in the rat. *Life Sci.* 24: 1223–1230.

28. Freeman, M. E. 1993. Neuropeptide Y: A unique member of the constellation of gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology* 133:2411-2412.
29. Sahu, A., Crowley, W. R., Kalra, P. S., and Kalra, S. P. 1992. A selective sexually dimorphic response in the median eminence neuropeptide Y. *Brain Res.* 573:235-242.
30. Urban, J. H., Bauer-Dantoin, A. C., and Levine, J. E. 1993. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* 132:139-145.
31. Pages, N., Orosco, M., Fournier, G., Rouch, C., Hafi, A., Gouch, A., Comoy, E., and Bohuon, C. 1991. The effects of chronic administration of morphine on the levels of brain and adrenal catecholamines and neuropeptide Y in rats. *Gen. Pharmac.* 22:943-947.
32. Lesage, J., Bernet, F., Montel, V., and Dupouy, J. P. 1996. Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. *Neurochem. Res.* 21:87-96.
33. Bernet, F., Maubert, E., Bernard, J., Montel, V., and Dupouy, J. P. 1994. In vitro steroidogenic effects of neuropeptide Y (NPY_{1-36}}), Y₁ and Y₂ receptor agonists (Leu³¹-Pro³⁴ NPY, NPY_{18-36}}) and peptide YY (PYY) on rat adrenal capsule/zona glomerulosa. *Regul. Peptides* 52:187-193.
34. Maubert, E., Dupouy, J. P., and Bernet, F. 1993. Effect of adrenal demedullation on neuropeptide Y content of the capsule/glomerulosa zone of the rat adrenal gland. *Neurosci. Lett.* 156:5-8.
35. Leret, M. L., Gonzalez, M., and Arahuetes, R. M. 1993. Effect of maternal deprivation on the content of catecholamines in fetal brain. *Life Sci.* 52:1609-1615.
36. Slotkin, T. A., Lappi, S. E., McCook, E. C., Tayyeb, M. I., Eylers, J. P., and Seidler, F. J. 1992. Glucocorticoids and the development of neuronal function: effects of prenatal dexamethasone exposure on central noradrenergic activity. *Biol. Neonate* 61:326-336.
37. Vathy, I., Rimanoczy, A., Eaton, R. C., and Katay, L. 1994. Modulation of catecholamine turnover rate in brain regions of rats exposed prenatally to morphine. *Brain Res.* 662:209-215.
38. Kuhn, C. M., Windh, R. T., and Little, P. J. 1992. Effects of perinatal opiate addiction on neurochemical development of the brain. *Development of the Central Nervous System: Effects of alcohol and opiates*, pp. 341-361, Wiley-Liss, Inc.
39. Grauer, S. M., Tao, R., and Auerbach, S. B. 1992. Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. *Brain Res.* 599:277-282.
40. Hökfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Lindth, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T., and Terenius, L. 1987. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia* 43:758-780.
41. Dupouy, J. P., Chatelain, A., Boudouresque, F., Conte-Devolx, B., and Oliver, C. 1987. Effects of chronic maternal Dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat fetus. *Biol. Neonate* 52:216-222.
42. Whitnall, M. H. 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiol.* 40:573-629.
43. Kuhn, C. M., Butler, S. R., and Schanberg, S. M. 1978. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science* 201:1034-1036.
44. Kacsóh, B., Meyers, J. S., Growley, W. R., and Grosvenor, C. E. 1990. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-offspring interactions. *J. Endocrinol.* 124:233-240.

