

GASPARD MONTANDON

**CONSÉQUENCES À LONG TERME DE LA
CAFÉINE ADMINISTRÉE EN PÉRIODE
NÉONATALE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU
CONTRÔLE RESPIRATOIRE DU RAT**

**Étude des plasticités du contrôle respiratoire, de la fonction
cardiovasculaire et de la régulation du sommeil**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Médecine Expérimentale
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

GASPARD MONTANDON

**CONSÉQUENCES À LONG TERME DE LA
CAFÉINE ADMINISTRÉE EN PÉRIODE
NÉONATALE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU
CONTRÔLE RESPIRATOIRE DU RAT**

**Étude des plasticités du contrôle respiratoire, de la fonction
cardiovasculaire et de la régulation du sommeil**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Médecine Expérimentale
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

RÉSUMÉ

L'enfant prématuré présente à la naissance un système nerveux immature le prédisposant à des troubles de la respiration tels que l'apnée, caractérisée par un arrêt de la respiration. Les apnées sont traitées en clinique avec de la caféine qui peut être administrée pendant plusieurs semaines. Ce traitement est sûr et efficace et ne présente pas à court terme d'effets secondaires notables. Cependant, les effets à long terme sur le développement des fonctions nerveuses ont peu été étudiés. L'objectif de cet ouvrage est de déterminer, à l'aide d'un modèle animal, les conséquences d'un traitement néonatal à la caféine similaire à celui utilisé en clinique (NCT, 15 mg/kg/jour du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance) sur le contrôle respiratoire, la fonction cardiovasculaire et la régulation du sommeil des rats juvéniles et/ou adultes.

Les deux premières études de cet ouvrage montrent que le NCT accentue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie du rat juvénile en modifiant la fonction du récepteur A₁ de l'adénosine. Elles démontrent également que le NCT altère le patron respiratoire du rat adulte et que cet effet est observé chez le mâle uniquement. La troisième étude montre que le NCT augmente l'activité respiratoire du nerf phrénique et modifie l'activité cardiaque en hypercapnie chez le rat adulte anesthésié. La quatrième étude s'intéresse à la réponse à l'hypoxie et montre que le rat adulte NCT présente une fréquence respiratoire plus élevée en réponse à l'hypoxie que le rat contrôle; un effet en partie dû à une surexpression du récepteur A_{2A} de l'adénosine dans les corps carotidiens. La cinquième étude montre qu'en plus de présenter une ventilation plus élevée que le rat contrôle, le rat NCT a un sommeil plus court et plus fragmenté.

Les travaux de cet ouvrage démontrent qu'une exposition à la caféine en période néonatale altère le développement de plusieurs fonctions vitales et que ces effets persistent jusqu'à l'âge adulte. Ces études marquent les premières étapes de la compréhension des effets à long terme bénéfiques et/ou délétères du traitement à la caféine chez l'humain.

REMERCIEMENTS

Un doctorat est composé d'espoirs, de déceptions, de réussites et d'échecs. Ainsi, une thèse peut très bien marquer le début d'une carrière ou la fin de tout intérêt pour la recherche scientifique. C'est grâce à mes directeurs, Aida Bairam et Richard Kinkead, que j'ai maintenant l'énergie, les moyens et l'intérêt de continuer ma recherche. Chacun a contribué et contribue encore à sa manière à ma réussite. Aida grâce à ses conseils, ses corrections acérées, ses critiques, et son soutien, Richard grâce à ses encouragements, sa disponibilité, son enseignement pragmatique et ses conseils scientifiques. Je vous remercie pour votre mentorat qui fût essentiel à ma carrière.

La recherche ne peut pas fonctionner sans les acteurs d'un laboratoire. Ainsi, je tiens à remercier Vincent Joseph pour ses conseils en physiologie, Sophie-Emmanuelle Genest pour son accueil et son aide pendant mes premières années de doctorat, Yves Lajeunesse pour son aide technique, Evelyne Vachon et Sylvie Viger pour leur précieux soutien avec nos petits rats, Roumiana Gulemetova pour son soutien logistique, Mathieu Allard pour les mesures de pléthysmographie et Norbert Balon pour ses conseils toujours éclairés. Merci également aux collègues étudiants et assistants qui m'ont tenu compagnie à midi, Stéphanie Fournier (pour ta bonne humeur), Frédéric Dumont, Sébastien Fournier, et Van Diep Doan.

I would like to thank Dr Richard Horner from the University of Toronto for his advice, help, and expertise in the sleep study. He has convinced me of the crucial interest to study sleep in complement to breathing. I recently joined his team as postdoctoral fellow to elucidate the mechanism of respiratory rhythm generation in the naturally-sleeping animal.

Je tiens également à remercier les organismes subventionnaires qui m'ont appuyés tout au long de mes études. D'abord, la Chaire de Recherche Jeanne-et-Jean-Lévesque en Périnatalogie, mais surtout la Fondation de la Recherche sur les Maladies Infantiles qui, depuis le début de mes études en biologie, a su me faire confiance et m'épauler financièrement.

Merci à mes parents, Claude et Jo, qui ont toujours cru en moi malgré mon entêtement à faire tout à l'envers. C'est grâce à votre confiance, vos encouragements et votre soutien que j'ai lentement gravi les échelons académiques. Claude pour ton enseignement scientifique que je n'écoutais auparavant que d'une oreille mais que j'apprécie maintenant à sa juste valeur. Jo, merci pour ta confiance et ton soutien inconditionnel quelques soient mes décisions. Je ne saurai jamais assez vous remercier.

Merci également à mes beaux-parents, Jacques Larochelle et Diane Major. Jacques, c'est grâce à la rigueur, la précision et la profondeur de ton enseignement en physiologie que mon intérêt pour cette matière s'est développé. Diane merci pour tes conseils sur le monde de la recherche qui démontrent tes larges connaissances politico-scientifiques. Tu as su me donner un bon coup de pouce lorsque j'en avais le plus besoin.

Au cours de mes études, le doute, le désespoir et la déprime m'ont souvent guettés. Je n'aurai pas su persister et tenir jusqu'au bout sans l'amour, le soutien, les conseils, et l'aide de Marie-Hélène, ma douce moitié. Je t'aime et je te dédie cette thèse.

AVANT-PROPOS

Les cinq études présentées dans cette thèse ont été réalisées de 2004 à 2007 dans le laboratoire de mes directeurs le Pr. Richard Kinkead et la Pr. Aida Bairam au centre de recherche de l'Hôpital St-François D'Assise du CHUQ (Université Laval). Je suis le premier auteur de ces cinq études et j'ai bénéficié des conseils et de la supervision de mes directeurs à toutes les étapes de leur réalisation. Ces études ont été supportées financièrement par les Instituts de Recherche en Santé du Canada et par la chaire de recherche du Canada en Neurobiologie Respiratoire détenue par Richard Kinkead.

La première étude de cet ouvrage porte sur les effets de la caféine néonatale sur le contrôle respiratoire des rats juvénile et adulte.

*Long-term consequences of neonatal caffeine on ventilation, occurrence of apneas, and hypercapnic chemoreflex in male and female rats. 2006. **Montandon Gaspard, Bairam Aida, Kinkead Richard.** *Pediatric Research*, 59(4 Pt 1), 519-24.*

La deuxième étude permet de comprendre les mécanismes impliqués dans l'impact à long terme de la caféine néonatale sur le contrôle respiratoire du rat juvénile.

*Disruption of adenosinergic modulation of ventilation at rest and during hypercapnia by neonatal caffeine in young rats: role of adenosine A₁ and A_{2A} receptors. 2007. **Montandon Gaspard, Kinkead Richard, Bairam Aida.** *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative, and Comp Physiology*, 292(4), R1621-31.*

La troisième étude complète la première étude en évaluant l'activité respiratoire dans des conditions contrôlées et sous anesthésie.

*Increased phrenic nerve and cardiac activities in the adult anaesthetized rats treated with caffeine during the neonatal period. **Montandon Gaspard, Kinkead Richard, and Bairam Aida.***

La quatrième étude aborde les conséquences à long terme de la caféine sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie en utilisant plusieurs techniques complémentaires afin de comprendre les mécanismes modifiant cette réponse. J'ai réalisé les mesures physiologiques tandis que les corps carotidiens ont été prélevés par Aida Bairam et les analyses RT-PCR effectuées par Yves Lajeunesse, assistant de recherche de la Dr Bairam.

Neonatal caffeine induces sex-specific developmental plasticity of the hypoxic respiratory chemoreflex in adult rats. 2008. Montandon Gaspard, Bairam Aida, Kinkead Aida. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative, and Comp Physiology, 295(3), R922-34.

La dernière étude, portant sur les effets de la caféine néonatale sur le sommeil et la respiration du rat adulte, est le résultat d'une collaboration avec le Dr Richard Horner de l'Université de Toronto. C'est à l'occasion d'un stage dans son laboratoire que j'ai acquis l'expertise nécessaire à la réalisation de cette étude dans notre laboratoire de Québec. Le manuscrit de cette étude est en préparation.

Neonatal caffeine induces long-lasting changes on sleep and breathing in freely-behaving adult rats. Montandon Gaspard, Bairam Aida, Horner Richard L, Kinkead Richard. Manuscript in preparation.

Le travail de cette thèse fait l'objet d'une revue de la littérature parue dans un numéro spécial de *Respiratory, Physiology and Neurobiology*.

Adenosinergic modulation of respiratory activity: Developmental plasticity induced by perinatal caffeine administration. 2008. Montandon Gaspard, Kinkead Richard, Bairam Aida. Respir Physiol Neurobiol. Epub ahead of print, Jul 25.

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLES	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
INTRODUCTION	I
1. L'USAGE DE LA CAFÉINE EN PÉRIODE NÉONATALE	1
1.1. Apnée du nouveau-né prématuré	1
1.2. Traitement à la caféine chez le prématuré.....	4
1.3. Mécanismes d'action de la caféine	5
1.4. Vulnérabilité du nouveau-né prématuré.....	8
1.5. Conséquence d'une exposition chronique à la caféine sur le développement.....	10
2. NEUROMODULATION ADÉNOSINÉRGIQUE	12
2.1. Neuromodulation adénosinérgique dans le système nerveux.....	12
2.2. Système de contrôle de la respiration.....	26
2.3. Système cardio-vasculaire.....	49
2.4. Métabolisme.....	54
2.5. Régulation des stades d'éveil-sommeil.....	55
3. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE	64
3.1. Problématique de la thèse	64
3.2. Hypothèse de la thèse.....	65
3.3. Objectifs de la thèse	65

ÉTUDE I	70
1. RÉSUMÉ	71
2. INTRODUCTION	73
3. METHODS	75
3.1. Animal and housing conditions.....	75
3.2. Mating and neonatal caffeine treatment	75
3.3. Experimental groups	76
3.4. Respiratory and metabolic measurements.....	76
3.5. Respiratory measurement protocol	77
3.6. Data and statistical analysis	77
4. RESULTS	79
4.1. Plasma caffeine concentrations.....	79
4.2. Series I: resting ventilation in juvenile rats.....	79
4.3. Series I: hypercapnic ventilatory response in juvenile rats	80
4.4. Series II: resting ventilation in adult rats	81
4.5. Series II: hypercapnic ventilatory response in adult rats.....	83
4.6. Apnea index at rest.....	84
5. DISCUSSION	87
5.1. NCT-related changes in juvenile rats.....	88
5.2. NCT-related changes in adult rats.....	88
5.3. Consequences of stress related to the gavage procedure.....	89
5.4. Apnea index changes	90
5.5. Sex-specificity.....	90
5.6. Perspectives	91
6. ACKNOWLEDGMENTS	91
 ÉTUDE II	 92
1. RÉSUMÉ	93
2. INTRODUCTION	95
3. METHODS	97
3.1. Animal and housing conditions.....	97
3.2. Mating and neonatal caffeine treatment (NCT)	97
3.3. Adenosine receptor antagonists.....	98
3.4. Experimental groups	98
3.5. Respiratory and metabolic measurements.....	98
3.6. Respiratory protocol.....	99
3.7. Data and statistical analyses.....	100
4. RESULTS	102
4.1. Ventilation at rest.....	102
4.2. Hypercapnic ventilatory response	108
4.3. Occurrence of apneas.....	112
5. DISCUSSION	114
5.1. Critiques of methods.....	115
5.2. Role of adenosine receptors in control of breathing in awake young rats.....	116
5.3. Impact of NCT on adenosinergic modulation of respiratory control	118
5.4. Conclusion	121
6. ACKNOWLEDGMENTS	122

ÉTUDE III	123
1. RÉSUMÉ	124
2. INTRODUCTION	126
3. METHODS	127
4. RESULTS	129
5. DISCUSSION	133
 ÉTUDE IV	 137
1. RÉSUMÉ	138
2. INTRODUCTION	140
3. METHODS	142
3.1. Ethical information	142
3.2. Mating and neonatal caffeine treatment.	142
3.3. Study 1. Effects of neonatal caffeine on the hypoxic ventilatory response.....	142
3.4. Study 2. Impact of neonatal caffeine on phrenic nerve activity.	143
3.5. Study 3. Effect of neonatal caffeine on A _{2A} , D ₂ , TH mRNA expression in the carotid body.	145
3.6. Data analysis	147
4. RESULTS	149
4.1. Study 1. Neonatal caffeine enhances hypoxic chemoreflex in freely-behaving adult rats	149
4.2. Study 2. Neonatal caffeine increases phrenic nerve activity in anaesthetized rats.....	151
4.3. Study 3. Neonatal caffeine augments mRNA levels of A _{2A} , D ₂ receptor, and TH in CB	159
5. DISCUSSION	161
5.1. Critique of methods.....	161
5.2. NCT-related enhancement of the acute frequency response to hypoxia in adult male rats.....	162
5.3. Cardiovascular changes due to NCT.....	165
5.4. Sex-specificity.....	165
5.5. Putative mechanisms of caffeine-induced plasticity	166
5.6. Clinical relevance.....	167
6. ACKNOWLEDGMENTS	168
 ÉTUDE V	 169
1. RÉSUMÉ	170
2. INTRODUCTION	172
3. METHODS	174
3.1. Animal mating and neonatal caffeine treatment.....	174
3.2. Surgery.....	174
3.3. Protocol and measurements	175
3.4. Data analysis	176
4. RESULTS	178
4.1. Sleep-wake states	178
4.2. Breathing across sleep-wake states	182
4.3. Breathing variability across sleep-wake states.....	185
4.4. Post-sigh and spontaneous apneas across sleep-wake states.....	187

5. DISCUSSION	189
5.1. Decreased and fragmented non-REM sleep in NCT rats	189
5.2. NCT augments ventilation	191
5.3. Hypercapnia has no effect on ventilation in NCT rats	192
5.4. High breathing variability during sleep in NCT rats	193
5.5. Reductions of sleep-disordered breathing in NCT rats	193
5.6. Clinical perspective	195
<i>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</i>	<i>196</i>
1. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES.....	196
1.1. Validité du modèle animal du nouveau-né prématuré.....	196
1.2. Traitement néonatal à la caféine	197
2. CONTRÔLE RESPIRATOIRE ET CAFÉINE NÉONATALE.....	198
2.1. Effet du NCT sur la ventilation du rat adulte non-anesthésié	198
2.2. Effets du NCT sur l'activité du nerf phrénique chez le rat anesthésié	201
2.3. Effet du NCT sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	201
2.4. Effet du NCT sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie	202
2.5. Traitement à la caféine et stress néonatal.....	203
3. FONCTION CARDIOVASCULAIRE ET CAFÉINE NÉONATALE	205
4. RÉGULATION DES STADES D'ÉVEIL-SOMMEIL ET CAFÉINE	208
5. DIFFÉRENCES LIÉES AU SEXE	210
6. DÉVELOPPEMENT ET CAFÉINE NÉONATALE.....	212
6.1. Périodes critiques du développement du rat.....	212
6.2. Caféine néonatale et développement.....	213
7. MÉCANISMES DE PLASTICITÉ DU SYSTÈME NERVEUX.....	216
7.1. Effets chroniques de la caféine	216
7.2. Modulation adénoenergique des neurotransmetteurs	219
7.3. Spécificité de la caféine	221
8. CONSÉQUENCES DU TRAITEMENT NÉONATAL À LA CAFÉINE CHEZ L'HUMAIN.....	223
8.1. Les effets potentiellement négatifs.....	223
8.2. Les effets potentiellement positifs.	224
9. CONCLUSION	226
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	<i>228</i>

LISTE DES TABLES

Table 1. Mécanismes de transduction déclenchés par l'activation des récepteurs de l'adénosine.	14
Table 2. Liste des structures nerveuses exprimant les récepteurs A ₁ de l'adénosine et leurs rôles physiologiques.	18
Table 3. Liste des structures nerveuses exprimant les récepteurs A _{2A} de l'adénosine et leurs rôles physiologiques.	19
Table 4. Effets de l'activation des récepteurs de l'adénosine sur la ventilation.	35
Table 5. Effets de l'activation ou l'inactivation des récepteurs de l'adénosine sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.	41
Table 6. Effets de l'activation des récepteurs de l'adénosine sur l'activité cardiovasculaire.	52
Table 7. Effects of NCT on resting ventilatory variables of juvenile male and female rats: <i>Series I.</i>	80
Table 8. Effects of NCT on resting ventilatory variables of adult male and female rats: <i>Series II.</i>	82
Table 9. Resting ventilatory, metabolic, and body weight data in control and NCT male young rats injected with vehicle, A ₁ (DPCPX), and A _{2A} antagonist (ZM241385).....	103
Table 10. Summary of effects of adenosine receptor inactivation on resting ventilation, apnea occurrence, hypercapnic ventilatory response, and oxygen consumption in control and NCT rats.....	115
Table 11. Arterial blood gases, pH, mean arterial, systolic and diastolic blood pressure during apnea, baseline, +5 mmHg, +10 mmHg, and CO ₂ max in control and NCT anaesthetized adult male rats.	131
Table 12. Oligonucleotide primers selected for real-time PCR, expected length of the PCR products.....	147
Table 13. Resting ventilatory, metabolic, and body weight data in control and NCT adult male and female rats.	150
Table 14. Arterial blood gases and pH during baseline and moderate hypoxia in control and NCT anaesthetized adult male rats.	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Effets de la caféine sur différents mécanismes biochimiques en fonction du niveau plasmatique de caféine chez l'humain.	6
Figure 2. Déroulement temporel des processus neurobiologiques ayant lieu durant l'ontogénie du télencéphale humain.	9
Figure 3. Schéma des mécanismes cellulaires mis en jeu lors de l'activation des récepteurs de l'adénosine par l'adénosine.....	15
Figure 4. Système de contrôle de la respiration constitué du tronc cérébral regroupant le pont et le bulbe rachidien et plusieurs nerfs commandant l'activité respiratoire.	28
Figure 5. Afférences modulant le système de contrôle de la respiration.	29
Figure 6. Représentation des principaux noyaux du tronc cérébral du rat impliqués dans le contrôle respiratoire.....	30
Figure 7. Schéma illustrant les structures impliquées dans le contrôle respiratoire et l'expression des récepteurs A ₁ et A _{2A} de l'adénosine dans chacun des noyaux.....	32
Figure 8. Distribution des chémorécepteurs au CO ₂ au niveau d'une coupe sagittale du tronc cérébral du rat adulte.	38
Figure 9. Réponse ventilatoire à l'hypoxie du rat mâle adulte.....	42
Figure 10. Schéma illustrant la disposition des corps carotidiens et les circuits responsables du chémoréflexe respiratoire à l'hypoxie chez l'homme.....	43
Figure 11. Représentation schématisée du système de contrôle cardio-vasculaire chez le rat. Les récepteurs A ₁ et A _{2A} de l'adénosine sont indiqués respectivement en orange et en vert.	49
Figure 12. Electroencéphalogramme (EEG) et électromyogramme des muscles de la nuque (EMG) du rat adulte aux différents stades d'éveil-sommeil.....	57
Figure 13. Schéma illustrant les principales structures impliquées dans la régulation des stades d'éveil-sommeil chez le rat.....	59
Figure 14. Comparison of the ventilatory responses to moderate hypercapnia between control, vehicle, and NCT treated juvenile rats	
Figure 15. Comparison of the ventilatory responses to moderate hypercapnia between control, vehicle, and NCT treated adult rats.	84
Figure 16. Incidence of spontaneous apneas at rest in juvenile (P20) and adult male and female rats.....	85
Figure 17. Incidence of post-sigh apneas at rest in juvenile (P20) and adult male and female rats.....	86
Figure 18. Mean respiratory cycles at rest after injection of either vehicle, A ₁ (DPCPX), or A _{2A} antagonist (ZM241385) in control and NCT groups of male young rats.	104
Figure 19. Density map of breaths at rest after injections with either vehicle, A ₁ (DPCPX), or A _{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT rats.	106
Figure 20. Time courses of minute ventilation during hypercapnia after injection with either vehicle, A ₁ (DPCPX), or A _{2A} (ZM241385) receptor antagonists in control and NCT male young rats.	109

Figure 21. Hypercapnic ventilatory responses after injection with either vehicle, A ₁ (DPCPX), or A _{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT male young rats.....	111
Figure 22. Occurrence of spontaneous and post-sigh apneas after injection of either vehicle, A ₁ (DPCPX), or A _{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT male young rats.	113
Figure 23. Representative integrated phrenic nerve activity of control (A) and NCT (B) adult male rats at different CO ₂ levels.	132
Figure 24. Representative and arterial blood pressure signals of control (A) and NCT (B) adult male rats at different CO ₂ levels.	134
Figure 25. Respiratory activity at rest (normoxia) and during hypoxic exposure in control and NCT adult male rats.	152
Figure 26. Respiratory activity at rest (normoxia) and during hypoxic exposure in control and NCT adult female rats.	154
Figure 27. Inspiratory phrenic nerve activity in anaesthetized, paralyzed, vagotomized, and artificially ventilated adult male rat under baseline and during 6 minute of hypoxia..	157
Figure 28. Arterial blood pressure in control and NCT adult male rats. Representative blood pressure recordings in anaesthetized, paralyzed, vagotomized, and artificially ventilated in a control (a) and a NCT (b) adult male rat under baseline and during 6 minute of hypoxia..	158
Figure 29. Relative quantification of mRNA expression levels of adenosine A ₁ and A _{2A} receptors, dopamine D ₂ receptors, and tyrosine hydroxylase (TH) in the carotid body of control and NCT adult rats..	160
Figure 30. Sleep-wake patterns and respiratory activity at room air in a control rat (A) and sleep-wake state pattern in a control (B) and a NCT rat (C) during 3-hour..	179
Figure 31. Percentage of time spent (A), durations of bout (B), and fragmentation (C) of each sleep-wake states at room air in control (n=8) and NCT (n=8) rats.....	180
Figure 32. Integrated neck EMG activity (A) and ratio between EEG frequency bands β_2 (20-30 Hz) and δ_1 (2-4 Hz) (B) in control (white bars) and neonatal caffeine treated (NCT, black bars) rats for each sleep-wake states.	181
Figure 33. Sleep changes between normocapnia and hypercapnia of proportion of time spent at each sleep-wake states in control (n=8) and NCT rats (n=8)..	182
Figure 34. Minute ventilation (A), tidal volume (B), and respiratory frequency (C) for each sleep-wake states at room air and hypercapnia in control (white circles) and NCT (black circles) rats.....	184
Figure 35. Relative changes of minute ventilation, tidal volume, and respiratory frequency due to hypercapnia for each sleep-wake states in control (n=7, white circles) and NCT (n=7, black circles) rats.	185
Figure 36. Breathing variability using Poincaré plot analysis for each sleep-wake states in a control (A) and a NCT (B) rat at room air	186
Figure 37. Occurrences of post-sigh and spontaneous apneas for each sleep-wake state during normocapnia and hypercapnia in control and NCT rats.....	188
Figure 38. Maturation des effets du traitement néonatal à la caféine sur la réponse à l'hypercapnie de la fréquence respiratoire et du volume courant des rats mâles nouveau-nés âgés de 10 jours, des rats juvéniles âgés de 20 jours et des rats adultes mesurés par pléthysmographie à corps entier.	214

LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-CPT	8-cyclopentyltheophylline.
A ₁	Récepteur A ₁ de l'adénosine.
A _{2A}	Récepteur A _{2A} de l'adénosine.
A5	Aire A5 dans la partie ventro-latérale du pont.
ADP	Adénosine diphosphate.
AMP	Adénosine monophosphate.
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique.
ANOVA	Analyse de variance.
AP	Area Postrema
ARNm	Acide ribonucléique messager.
ATP	Adénosine triphosphate.
BF	<i>Basal Forebrain</i> ou Télencéphale basal.
BTPS	<i>Body Temperature and Pressure, Saturated.</i>
CB	<i>Carotid body</i> ou corps carotidiens
CGS-21680	Agoniste spécifique au récepteur A _{2A} de l'adénosine - Acide 3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoïque.
CHA	Agoniste du récepteur A ₁ de l'adénosine - Cyclohexyladénosine
CNS	Centra Nervous System.
CO	Monoxyde de carbone.
CO ₂	Dioxyde de carbone.
CPA	N ⁶ -cyclopentyl-adénosine.
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure.
CVLM	Partie caudale de la médulla ventro-latérale.
DMPX	Antagoniste du récepteur A _{2A} - 3,7-diméthyl-1-propargylxanthine
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DPCPX	Antagoniste du récepteur A ₁ - 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine.
DPSPX	Antagoniste non-spécifique pour les récepteurs de l'adénosine - 1,3-dipropyl-8-sulfo-phenyl-xanthine.
DRG	Doral Respiratory Group.
EEG	Électroencéphalographie.
EMG	Électromyographie.
F _I CO ₂	Fraction inspirée de dioxyde de carbone.
F _I O ₂	Fraction inspirée d'oxygène.
f _R	Fréquence respiratoire.
GABA _A	Récepteur A pour l'acide γ -aminobutyrique.
GIRK	<i>G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺</i> .
Gi	Protéine Gi.
Go	Protéine Go.
Ggolf	Protéine Ggolf.
HMN	Hypoglossal Motor Nucleus.
IBMX	Inhibiteur des phosphodiésterases - 1-isobutyl-3-méthylxanthine.
i.c.v	Injection intra-cérébro-ventriculaire

i.p.	Injection intra-péritonéale.
i.v.	Injection intra-veineuse.
KF	Kolliker-Füse.
KCN	Cyanure de Potassium ou acide cyanhydrique.
KO	<i>Knock-out.</i>
LDP/PPT	Noyaux latérodorsal et tégmentaire pédonculopontin.
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (Levodopa)
LC	Locus Coeruleus.
LPGi	Nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis.
MPB	Noyau parabrachial médian.
NCT	Neonatal Caffeine Treatment.
NK ₁	Récepteur Neurokinine 1 pour la substance P.
NO	Monoxyde d'azote
non-REM	Sommeil à ondes lentes - non Rapid Eye Movement Sleep
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
O ₂	Oxygène
P3-P12	Jours postnataux 3 à 12.
P _A CO ₂	Pression alvéolaire partielle du dioxyde de carbone.
P _a CO ₂	Pression artérielle partielle du dioxyde de carbone.
pCO ₂	Pression partielle du dioxyde de carbone.
pFRG	Groupe respiratoire parafacial.
PGD2	Récepteur 2 des prostaglandines.
PnOc	Formation réticulaire pontine orale.
PKA	Protéine kynase A
préBotzC	Complexe préBötzingier.
REM	Sommeil paradoxal – Rapid Eye Movement.
RTN	Noyau rétrotrapézoïde.
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase chain Reaction
RVLM	Partie ventrale de la médulla ventrolatérale.
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
STPD	Standard temperature (0 °C), barometric pressure at sea level (101.3 kPa) and dry gas: standard temperature and pressure, dry.
T _E	Expiratory duration.
T _I	Inspiratory duration.
TMN	Noyau tubéro-mammillaire.
\dot{V}_E	Ventilation minute.
VLPO	Aire préoptique ventrolatérale de l'hypothalamus.
VLM	Médulla ventrolatérale.
\dot{V}_{O_2}	Consommation d'oxygène.
\dot{V}_{CO_2}	Production de dioxyde de carbone.
V _T	Volume courant – Tidal volume.
ZM241384	Antagoniste pour les récepteurs A _{2A} et A _{2B} de l'adénosine – 4-(-2-[7-amino-2-{1,2,4}triazolò{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol.

INTRODUCTION

1. L'USAGE DE LA CAFÉINE EN PÉRIODE NÉONATALE

1.1. Apnée du nouveau-né prématuré

1.1.1. Définition de l'apnée

L'apnée de l'enfant nouveau-né est définie comme un arrêt de la respiration pouvant varier de quelques secondes à plusieurs dizaines de secondes. Une apnée est dite pathologique si sa durée excède 20 secondes ou si elle excède 10 secondes accompagnée de désaturations en oxygène (i.e. < 80-85%) et/ou de bradycardies (i.e. < 80 battements par minute) (Finer *et al.*, 2006; Marchal *et al.*, 1987; American Academy of Pediatrics, 1985). Cependant, des apnées plus courtes que 10 secondes peuvent également présenter des désaturations et des bradycardies et sont régulièrement observées chez l'enfant prématuré, tel que décrit par Poets et ses collègues où des apnées de 4 secondes et plus sont associées à des bradycardies de 33% et des désaturations répétitives inférieures à 80% chez les prématurés de 30 semaines (1993).

1.1.2. Incidence

Au Canada en 1996, 7.1 % des nouveau-nés naissaient prématurément à un âge post-conceptionnel inférieur à 37 semaines (Agence de santé publique du Canada, 2006). Il a été démontré dans les années 70, que la prématurité contribue au taux de mortalité. En effet, sur 161 prématurés de moins de 27 semaines (<1000 g) admis en clinique, le taux de mortalité était de 87% (Alden *et al.*, 1972). L'apnée est un trouble respiratoire régulièrement observé chez l'enfant prématuré et elle est une des causes majeures de morbidité néonatale (Marchal *et al.*, 1987; Hascoet *et al.*, 2000; Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003). L'apparition des apnées est inversement proportionnelle à l'âge du

prématuré. En effet, 84% des prématurés d'âge gestationnel de moins de 27 semaines (<1000g) présente des apnées (Alden *et al.*, 1972), 17% des prématurés entre 30 et 33 semaines (1250 et 1750 g) (Miller *et al.*, 1959) et 7% des prématuré de 37 semaines (Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003). Actuellement, l'apnée du prématuré est bien traitée grâce à différentes thérapies comme les soins infirmiers, l'usage de stimulants respiratoires et la ventilation assistée (Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003).

1.1.3. Types d'apnées

Traditionnellement, trois types d'apnées sont définies chez le nouveau-né prématuré : les apnées centrales, obstructives et mixtes (Martin *et al.*, 2004). Les apnées centrales ou apnées diaphragmatiques se caractérisent par un arrêt de l'effort inspiratoire sans évidence d'obstruction des voies aériennes supérieures. Dans le cas des apnées obstructives, l'inspiration est bloquée par une obstruction des voies aériennes supérieures. Un effort au niveau de la poitrine est visible, mais sans débit d'air au niveau des voies aériennes. Les apnées mixtes sont généralement constituées d'une apnée obstructive suivie par des apnées centrales. Les apnées mixtes représentent 50% des apnées de longue durée (plus de 15 secondes) que l'on observe chez les prématurés (Martin *et al.*, 2004).

1.1.4. Origine

Les réponses ventilatoires à l'hypercapnie et à l'hypoxie sont immatures chez l'enfant prématuré et il a été proposé que cette immaturité soit à l'origine des apnées centrales observées chez cette population de nouveau-nés (Martin *et al.*, 2004). En effet, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de l'adulte est caractérisée par une augmentation de la ventilation, due à une augmentation du volume courant et de la fréquence respiratoire, tandis que celle des nouveau-nés prématurés est réduite – chez ces derniers il n'y a pas de changement de la fréquence respiratoire en réponse à l'hypercapnie (Gerhardt & Bancalari, 1984). Cette réduction est observée en particulier chez l'enfant prématuré qui présente des apnées (Rigatto *et al.*, 1975b). L'étude du rat nouveau-né permet de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'immaturité de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. En

effet, chez le rat nouveau-né, le site d'origine de l'immaturation de la réponse à l'hypercapnie est de nature centrale - au niveau du tronc cérébral - et implique une immaturité de la neurotransmission GABAergique (Abu-Shaweesh *et al.*, 1999). Chez l'adulte, une altération de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, ainsi qu'un changement de la réserve de CO₂ (i.e. la différence de PaCO₂ entre l'eupnée et le seuil d'apnée) sont des déterminants importants de la stabilité respiratoire (Dempsey *et al.*, 2004). À cet égard, il a été montré que le nouveau-né possède un seuil d'eupnée très proche de leur seuil d'apnée comparé à l'adulte (Khan *et al.*, 2005). Pour cette raison, le nouveau-né a plus de chance que l'adulte de franchir son seuil d'apnée et de présenter des apnées. Ces données ont permis de développer un nouveau traitement de l'apnée du prématuré. Il a en effet été démontré que l'ajout d'un faible niveau de CO₂ (~1%) dans le gas inspiré (ayant pour effet d'augmenter faiblement la PaCO₂) permet d'éliminer sensiblement les apnées et que ce traitement semble plus efficace que le traitement à la caféine (Al-Aif *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données suggère que le nouveau-né, qu'il soit animal ou humain, possède une réponse ventilatoire à l'hypercapnie immature et que sa réserve de CO₂ est faible comparé à l'adulte. Ces deux facteurs peuvent donc contribuer à la génération des apnées centrales.

La réponse ventilatoire à l'hypoxie du nouveau-né est également différente de celle de l'adulte. En effet, chez ce dernier, la réponse ventilatoire à l'hypoxie est caractérisée par une augmentation progressive en quelques minutes de la ventilation suivie d'une ventilation stable plus élevée que celle observée au repos. Chez le nouveau-né, la réponse à l'hypoxie est biphasique et est caractérisée par une augmentation de la ventilation suivie d'une dépression ventilatoire. Chez le nouveau-né prématuré, la ventilation peut descendre à des niveaux inférieurs à ceux observés au repos (Rigatto *et al.*, 1975a). Bien que les mécanismes responsables de cette dépression ventilatoire ne soient pas encore compris, une immaturité du système adénoenergique ou des récepteurs opioïdes au niveau central pourrait expliquer cette dépression (Koos *et al.*, 2005; Martin & Abu-Shaweesh, 2005). En effet, le blocage de ces récepteurs élimine la dépression ventilatoire observée chez le nouveau-né (Neubauer *et al.*, 1987). Cette dépression ventilatoire anormale chez le prématuré peut être vue comme un facteur aggravant l'apnée du prématuré favorisant ainsi la répétition de la pathologie chez ces enfants (Martin & Abu-Shaweesh, 2005). Bien que l'immaturation des réponses ventilatoires à l'hypercapnie et à l'hypoxie semble jouer un rôle

dans l'apparition des apnées chez le nouveau-né prématuré, il n'y a pour l'instant pas de relation de cause à effet entre cette immaturité et l'occurrence des apnées chez les prématurés (Martin *et al.*, 2004).

L'apnée du prématuré est souvent associée à une obstruction des voies aériennes supérieures. L'immaturité du système contrôlant l'activité des voies aériennes supérieures semble être, en partie, à l'origine de cette obstruction. En effet, le seuil de réponse au CO₂ des voies aériennes supérieures de l'enfant prématuré est anormalement élevé comparé au seuil d'activation des muscles inspiratoires tels que le diaphragme (Carlo *et al.*, 1988). La différence observée entre le seuil d'activité des voies aériennes supérieures et celui des muscles inspiratoires pourrait être à l'origine de l'obstruction observée chez l'enfant prématuré. Cette hypothèse reste cependant à être testée.

1.2. Traitement à la caféine chez le prématuré

1.2.1. Modalité du traitement à la caféine

Le traitement des apnées du prématuré s'effectue principalement par deux types d'intervention : non-pharmacologique et pharmacologique. L'approche non-pharmacologique peut aller de la stimulation tactile jusqu'à la ventilation mécanique assistée soit nasale (*continuous positive airway pressure*, CPAP) ou trachéal (intubations). Ces méthodes stimulent l'inspiration, réduisent l'obstruction ou encore facilitent l'entrée d'air. L'approche pharmacologique est l'usage des stimulants respiratoires tels que le doxapram et les méthylxanthines. Ces médicaments sont utilisés avant tout recours à la ventilation assistée (Hascoet *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 1987). Les méthylxanthines les plus utilisées sont la caféine (1-3-7-triméthylxanthine) et la théophylline (1-3-diméthylxanthine).

1.2.2. Choix de la caféine

Bien que la théophylline ait longtemps été utilisée, la caféine est actuellement le traitement privilégié (Marchal *et al.*, 1987; Hascoet *et al.*, 2000). En effet, comparé à la théophylline, la caféine a une demi-vie plus longue, un index thérapeutique plus élevé et moins d'effets secondaires (De Carolis *et al.*, 1991; Bairam *et al.*, 1987). Le traitement

néonatal à la caféine consiste généralement en une dose de charge de citrate de caféine de 20 mg/kg suivie de doses quotidiennes d'entretien de 5 mg/kg (De Carolis *et al.*, 1991; Bairam *et al.*, 1987). Les concentrations sériques de caféine atteintes à l'aide de ce traitement se situent entre 8 et 23 mg/L et restent stables tout au long du traitement (Leon *et al.*, 2007; Bairam *et al.*, 1987). La caféine est métabolisée par le foie en métabolites actifs tels que la théophylline et la paraxanthine ayant des effets similaires à la caféine (Fredholm *et al.*, 1999b). En clinique, L'administration de caféine peut s'étaler sur de longues durées allant de quelques jours voire plusieurs semaines (Leon *et al.*, 2007). On parle alors de traitement chronique.

1.3. Mécanismes d'action de la caféine

1.3.1. Au niveau du neurone

Les mécanismes d'action de la caféine peuvent être classés en fonction de la dose administrée ou le taux plasmatique de caféine (Figure 1) :

1) Blocage des récepteurs de l'adénosine (caféine plasmatique entre 5 μ M et 0.5 mM) (Fredholm *et al.*, 1999b).

2) Inhibition de l'activité des isoenzymes phosphodiésterases augmentant ainsi les niveaux d'AMP et de GMP cyclique (caféine plasmatique entre 0.5 – 1 mM) (Polson *et al.*, 1978). Cette élévation serait responsable de la relaxation des muscles lisses des voies aériennes lors de l'administration de la caféine (Brackett *et al.*, 1990).

3) Une concentration de caféine plasmatique supérieure à 0.5 mM est considérée toxique, bloque les récepteurs GABA_A et provoque un relâchement de Ca²⁺ intracellulaire (Fredholm *et al.*, 1999b).

Le traitement néonatal à la caféine utilise une dose de caféine atteignant au maximum 10 mg/kg (soit < 0.1 mM), une dose largement inférieure à la dose toxique, ayant principalement pour effet de bloquer les récepteurs de l'adénosine et d'empêcher la liaison des agonistes à ces récepteurs. Cependant, bien qu'une participation d'autres mécanismes tels que l'inhibition des phosphodiésterases ne puisse pas être éliminée complètement (Howell, 1993), nous considérons dans les chapitres suivants que le principal mécanisme

d'action du traitement à la caféine est de bloquer de façon non-spécifique les récepteurs de l'adénosine.

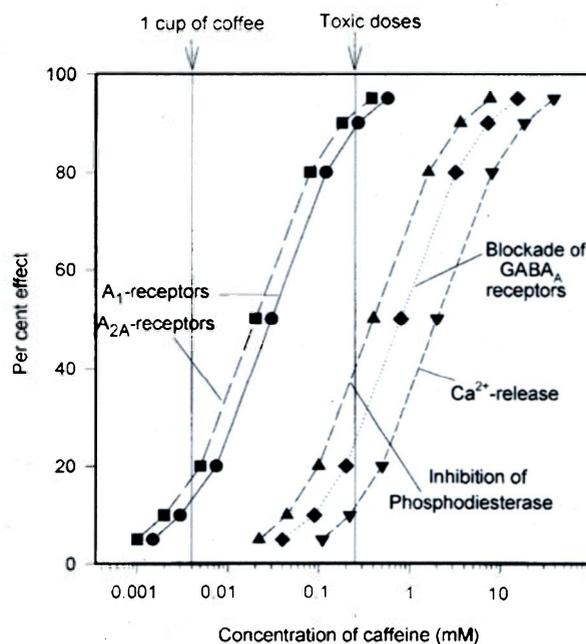


Figure 1. Effets de la caféine sur différents mécanismes biochimiques en fonction du niveau plasmatique de caféine chez l'humain. Figure empruntée à Fredholm et al., (1999b).

1.3.2. Au niveau du contrôle de la respiration

Au niveau central. La caféine se fixe aux récepteurs de l'adénosine et bloque l'action inhibitrice de l'adénosine au niveau des structures nerveuses régulant la respiration. Bien que les mécanismes par lesquels la caféine stimule la respiration sont encore mal compris, il a été proposé que le blocage de l'activité inhibitrice de l'adénosine contribue à stimuler l'activité respiratoire et d'accentuer les réponse ventilatoires à l'hypercapnie et à l'hypoxie (Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003).

Le traitement néonatal à la caféine a pour effet de diminuer l'apparition des apnées du prématuré d'au moins 50% (Erenberg *et al.*, 2000), d'augmenter le rythme respiratoire, la ventilation et de diminuer la pCO₂ artériel chez le prématuré (Aranda *et al.*, 1977). La

théophylline, un antagoniste similaire à la caféine, augmente la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des prématurés (Davi *et al.*, 1978). La caféine augmente également le métabolisme du nouveau-né prématuré (Bauer *et al.*, 2001), contribuant ainsi à la demande ventilatoire. Bien que de nombreuses études démontrent que la caféine stimule l'activité respiratoire du nouveau-né, les mécanismes d'action par lesquels la caféine diminue l'apparition d'apnées sont encore inconnus et leurs compréhensions requièrent des études complémentaires.

Au niveau périphérique. Il a été proposé que la caféine modifie la sensibilité des structures chémosensibles périphériques. En effet, chez l'enfant prématuré, la caféine augmente la sensibilité à l'oxygène, évaluée à l'aide du test de Dejours (Chardon *et al.*, 2004). Cependant, dans cette étude réalisée chez l'enfant prématuré, le rôle spécifique des structures périphériques n'a pas été déterminé. En effet, bien que le test de Dejours soit un bon indice de l'activité des structures chémosensibles périphériques, il est possible que la caféine agisse également au niveau de structures centrales relayant l'information provenant de ces structures (Mifflin, 1997). Cet aspect du mécanisme d'action de la caféine n'a pas été élucidé chez l'humain, mais quelques études chez l'animal permettent de répondre en partie à cette question. En effet, la chémodénervation du nerf du sinus carotidien chez l'agneau a pour conséquence d'annuler l'effet stimulateur de la caféine sur la respiration, suggérant ainsi que les structures périphériques jouent un rôle prépondérant dans l'action de la caféine (Blanchard *et al.*, 1986). Cependant, parce que la chémodénervation supprime l'information sensorielle provenant des corps carotidiens, l'activité des structures centrales, telles que le NTS, est également modifiée (Mifflin, 1997). Dans cette situation, il est possible que la caféine n'ait pas le même impact sur la respiration que lorsque les structures centrales étaient activées par le nerf du sinus. Finalement, l'hypothèse selon laquelle la caféine augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie, et par conséquent diminue l'apparition des apnées a été récemment mise en question. En effet, chez l'enfant prématuré, l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie est positivement corrélée avec l'augmentation des apnées (Cardot *et al.*, 2007). D'après les auteurs, l'hyperventilation observée lors de la réponse ventilatoire à l'hypoxie a pour conséquence de diminuer le contenu sanguin en gaz carbonique et provoquer un arrêt de la respiration. Parce que le seuil d'apnée est plus bas chez le nouveau-né que chez l'adulte (Khan *et al.*,

2005), ce phénomène peut expliquer l'apparition des apnées chez le prématuré. Cela suggère que la caféine agirait plutôt au niveau central en bloquant l'effet inhibiteur de l'adénosine dans les structures chémosensibles. En conclusion, plusieurs études sont en faveur d'un rôle des corps carotidiens dans l'effet de la caféine, mais la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'administration de la caféine mérite des études supplémentaires.

1.4. *Vulnérabilité du nouveau-né prématuré*

Durant la gestation, le système nerveux du fœtus traverse plusieurs phases critiques de son développement (deGraaf-Peters & Hadders-Algra, 2006). La Figure 2 présente les différentes étapes temporelles (mesurées en semaines post-gestationnelles et en mois post-partum) des processus neurobiologiques prenant place durant l'ontogénie du télencéphale chez l'humain. L'ontogénie du système nerveux est caractérisée par la production de nouveaux neurones et de l'acquisition de nouvelles propriétés cellulaires (entre 5 et 25 semaines). Durant cette ontogénie, des événements progressifs prennent place tels que la prolifération et la migration neuronale (entre 10 et 20 semaines), la synaptogenèse (entre 30 semaines et 12 mois après la naissance), et la détermination du phénotype neuronal (durant toute la gestation). A l'opposé, des événements régressifs ont lieu comme la mort cellulaire (20-30 semaines) ou l'élimination synaptique (10 et 20 ans). Durant le développement normal du système nerveux, un équilibre s'installe entre les événements progressifs et régressifs grâce aux signaux de survie appropriés (facteurs trophiques) induisant des changements dans les événements transcriptionnels nécessaires à la survie et la différenciation neuronale. Le dysfonctionnement des mécanismes régulant la balance entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire peut mener à des pathologies liées à la croissance des tissus (i.e. cancer) ou à une dégénérescence anormale du neurone (i.e. pathologies neurodégénératives comme la leucodystrophie chez l'enfant). L'apparition de ces événements progressifs et régressifs a lieu durant des périodes dites sensibles. Bien que le système nerveux soit capable de s'ajuster à l'environnement durant l'ensemble de son développement, durant ces périodes, sa capacité d'ajustement est de loin supérieure à celle de l'adulte. En effet, les neurones établissent des connexions permanentes choisies parmi un large répertoire de possibilités et ils acquièrent leurs propriétés fonctionnelles définitives.

Si le système nerveux n'est pas exposé aux facteurs neurotrophiques appropriés durant ces périodes, les fonctions nerveuses sont altérées de façon permanente.

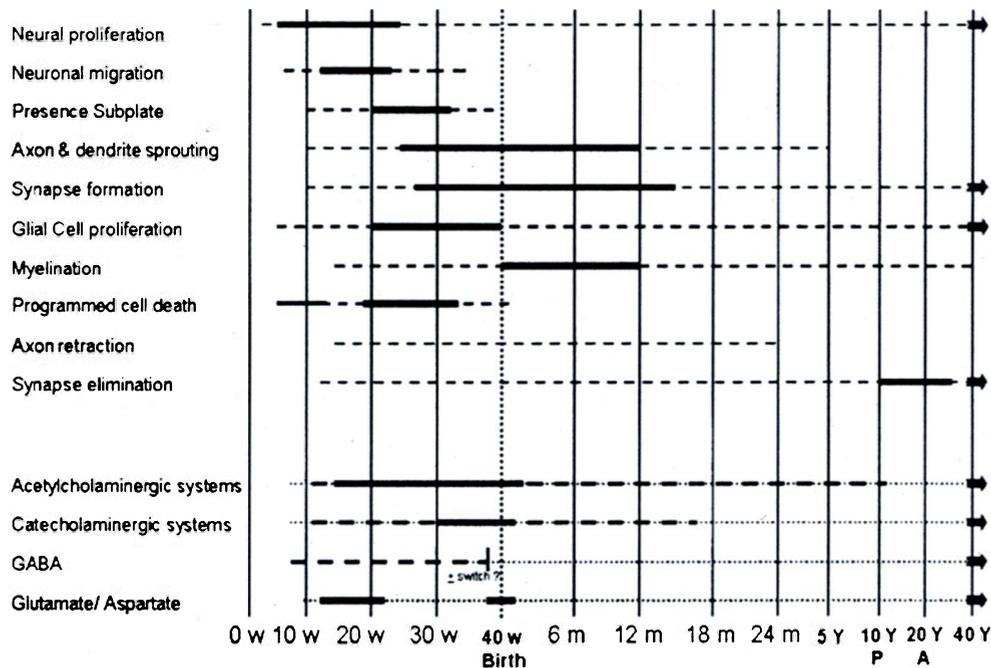


Figure 2. Déroulement temporel des processus neurobiologiques ayant lieu durant l'ontogénie du télencéphale humain. Illustration empruntée à de Graaf-Peters et ses collaborateurs (2006). Pour la partie supérieure de la figure, les lignes pleines indiquent lorsque le processus est extrêmement actif et les lignes en pointillés indiquent un processus actif. Pour la partie inférieure, les lignes pleines indiquent une surexpression du neurotransmetteur, les lignes en pointillés indiquent que le neurotransmetteur est présent. w, week; m, month; y, year.

Chez le prématuré, le système nerveux n'a pas encore traversé toutes les périodes sensibles et la prématurité modifie l'environnement du fœtus. Les facteurs trophiques auxquels le fœtus est normalement exposé dans l'utérus de la mère sont donc absents ayant pour conséquences de déséquilibrer les mécanismes régulant l'ontogénie. Ainsi, plusieurs

types de stimulations environnementales peuvent potentiellement altérer un ou plusieurs processus se déroulant durant le développement du nouveau-né prématuré: le stress (Genest *et al.*, 2004; Kinkead *et al.*, 2005a), l'absence de l'apport des hormones par le placenta (Doan *et al.*, 2004), les hypoxies intermittentes (Reeves & Gozal, 2005), et divers traitements thérapeutiques pharmacologiques et non-pharmacologiques (Finer *et al.*, 2006). Bien que ces études aient été réalisées chez l'animal, elles suggèrent fortement que l'expérience vécue durant les premiers mois de vie du prématuré a le potentiel d'influencer le développement neuronal du nouveau-né et donc les fonctions nerveuses qui en découlent.

1.5. Conséquence d'une exposition chronique à la caféine sur le développement du nouveau-né prématuré

1.5.1. Effets à court terme de la caféine

L'exposition à la caféine en période néonatale accentue le métabolisme de l'enfant prématuré d'au moins 20% (Bauer *et al.*, 2001). Un effet similaire est observé lors d'un traitement à la théophylline chez le prématuré (Carnielli *et al.*, 2000). Parce que chez l'adulte une augmentation du métabolisme induit généralement une perte de poids (Fredholm *et al.*, 1999b), on peut s'attendre au même effet chez le nouveau-né prématuré. Une étude récente a suivi le développement d'une grande cohorte d'enfants prématurés (2007 enfants) de poids moyen de 1000 g, traités à la caféine ou recevant un placebo (Schmidt *et al.*, 2006). Dans cette étude, le traitement néonatal à la caféine (20 mg/kg de caféine citrate le premier jour suivi de doses de maintenance quotidiennes de 5 mg/kg) réduit la prise de poids durant les trois premières semaines du traitement. Ces prématurés récupèrent cependant leurs poids après 4 semaines de traitement. Toujours dans la même étude, le suivi clinique lors de l'hospitalisation démontre que les enfants prématurés traités à la caféine présentent moins de dysplasie bronchopulmonaire en comparaison aux enfants prématurés ayant reçu le placebo. Cependant, on peut s'interroger sur les effets à long terme de la caféine administrée en période néonatale sur les développements neuromoteur et/ou neurocognitif du nourrisson.

1.5.2. Effet à long terme de la caféine sur le développement du nouveau-né

Quelques études se sont intéressées aux effets à long terme du traitement néonatal à base de méthylxanthine sur les développements neuromoteur ou cognitif. Une première étude portant sur le développement du nouveau-né ayant reçu un traitement à base de théophylline en période néonatale montre que le traitement n'a pas d'effet chez l'enfant de 21 mois (Nelson *et al.*, 1980). Une autre étude observant des enfants de 14 ans ayant été traités à la théophylline durant les premières semaines de vie montrent que ces enfants présentent un taux plus élevé de paralysie cérébrale que les enfants n'ayant pas reçu de traitement (Davis *et al.*, 2000). Les contradictions apparaissant entre ces études sont probablement dues au nombre limité d'enfants étudiés et à l'absence d'homogénéité du traitement. Ainsi, une étude longitudinale suivant l'état de santé d'une cohorte de 2007 nouveau-nés prématurés ayant reçu un traitement néonatal à la caféine similaire est actuellement en cours (Schmidt, 2005) et devrait permettre de répondre à plusieurs questions concernant l'impact à long terme du traitement sur le développement nerveux. Cependant, cette étude n'a pas pour but d'évaluer les conséquences du traitement sur le développement du système de contrôle de la respiration et d'en comprendre les mécanismes. Pourtant, étant donné l'impact de la caféine lors des périodes sensibles du développement sur la neuromodulation adénosinergique et le rôle de l'adénosine dans plusieurs fonctions nerveuses, il est probable que ce traitement induise des effets persistants inattendus sur ces fonctions (Finer *et al.*, 2006).

2. NEUROMODULATION ADÉNOSINERGIQUE

2.1. Neuromodulation adénosinergique dans le système nerveux

2.1.1. Les récepteurs de l'adénosine

L'adénosine. L'étude de la caféine et de ses effets sur la physiologie du mammifère nécessite une compréhension du système de neuromodulation adénosinergique. L'adénosine est un neuromodulateur endogène, un constituant normal des cellules de l'organisme, influençant de nombreuses fonctions du système nerveux. Il est important de comprendre que l'adénosine n'est pas un neurotransmetteur proprement dit; il n'est pas stocké dans des vésicules, n'est pas relâché par exocytose, il ne transfère pas l'information de façon unidirectionnelle de pré- à post-synaptique et il n'agit pas uniquement au niveau des synapses. L'adénosine est un messenger homéostatique (i.e. qui participe au maintien de conditions stables dans l'organisme) trans-cellulaire qui agit comme neuromodulateur au niveau des neurones dans lesquels il contrôle leur excitabilité et le relâchement des neurotransmetteurs.

Sources de l'adénosine. L'utilisation d'énergie par la cellule requiert la dégradation de l'ATP par déphosphorylation induisant plusieurs cascades moléculaires qui débouchent au relâchement d'adénosine (Fredholm *et al.*, 2001). Par exemple, lorsque le neurone est en hypoxie, une grande quantité d'énergie est requise pour maintenir l'homéostasie de la cellule, utilisant ainsi de l'ATP et augmentant le niveau d'adénosine (Newby, 1991). Ainsi, les facteurs régulant le niveau d'adénosine sont les taux relatifs de dégradation et de synthèse de l'ATP qui dépendent à leur tour du taux d'utilisation d'énergie et de la disponibilité des substrats métabolisables dans la cellule. Au niveau extracellulaire, l'adénosine provient de trois différentes voies : (1) il est relâché par des transporteurs nucléosidiques après une augmentation de la concentration d'adénosine intracellulaire ou une inversion du gradient sodique; (2) il est formé au niveau extracellulaire par la dégradation d'ATP ou de l'ADP en AMP et (3) il est produit par la dégradation de l'AMP.

Rôle de l'adénosine. L'adénosine est donc un indicateur de la consommation en énergie; dès qu'un certain niveau est atteint, l'activation des récepteurs de l'adénosine inhibe l'activité neuronale de la cellule et le métabolisme est ralenti. Les niveaux d'adénosine extracellulaire observés chez le rat adulte éveillé au repos sont situés entre 30 et 300 nM (Ballarin *et al.*, 1991; Fredholm *et al.*, 1999b). Il est considéré dans la littérature que l'adénosine a pour principal effet de se fixer aux récepteurs de l'adénosine et d'activer ces derniers. Cette hypothèse est acceptable car les niveaux physiologiques d'adénosine endogène observés chez l'animal *in vivo* sont suffisants pour activer les récepteurs de l'adénosine.

Les récepteurs de l'adénosine. Quatre types de récepteurs de l'adénosine ont été découverts chez le mammifère et sont activés en fonction de la dose et de l'affinité pour l'adénosine (Table 1): les récepteurs de l'adénosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ (Fredholm *et al.*, 2001). Voici les principales caractéristiques de ces récepteurs. L'activation du récepteur A₁ par l'adénosine ou d'autres ligands provoque une inhibition de l'activité neuronale. Cette activation inhibe préférentiellement le relâchement de plusieurs neurotransmetteurs excitateurs, mais en particulier le glutamate, et dans une moindre mesure le relâchement des neurotransmetteurs inhibiteurs, comme le GABA (Dunwiddie & Masino, 2001). L'effet inhibiteur résulte d'une inhibition pré-synaptique du relâchement des neurotransmetteurs, mais également d'une hyperpolarisation post-synaptique due à l'activation de canaux potassique et de la protéine GIRK (Ehrengruber *et al.*, 1997). Cependant, parce que l'effet post-synaptique de l'adénosine est difficile à distinguer de l'effet pré-synaptique (Dunwiddie & Fredholm, 1989), il est généralement considéré que l'effet principal des récepteurs A₁ de l'adénosine est l'inhibition du relâchement des neurotransmetteurs excitateurs. Le récepteur A₁ est couplé à des protéines G_i et G_o (Nanoff *et al.*, 1995). La liaison de l'adénosine au récepteur active les protéines G_i et G_o qui, respectivement, inhibent l'activité de l'adénylate cyclase (Figure 2) et active les canaux potassiques (type β et γ). L'activation de ces deux protéines a également pour effet de désactiver les canaux calciques de type N, P, et Q. L'effet neuromodulateur inhibiteur de l'adénosine est cependant principalement dû à la désactivation des canaux calciques de type N inhibant ainsi le relâchement des neurotransmetteurs (Greene & Haas, 1991).

Table 1. Mécanismes de transduction déclenchés par l'activation des récepteurs de l'adénosine.

Récepteur	Affinité pour l'adénosine	Type de protéine G	Mécanisme de transduction	Action physiologique
A ₁	70 nM	G _i et G _o	Inhibe adénylate cyclase Inhibe canaux calciques Active PLC	Inhibe transmission synaptique Hyperpolarise le neurone
A _{2A}	150 nM	G _s et G _{olf}	Active adénylate cyclase Inhibe canaux calciques Active canaux calciques	Facilite le relâchement des neurotransmetteurs Inhibe le relâchement des neurotransmetteurs
A _{2B}	5100 nM	G _s	Active adénylate cyclase Active PLC	Facilite transmission synaptique Inhibe AMP cyclique
A ₃	6500 nM	G _{i3} et G _q	Inhibe adénylate cyclase Augmente calcium intracellulaire Active PLC	Inhibe transmission synaptique Découple les récepteurs A ₁

PLC, phospholipase C. Table modifié de Dunwiddie et Masino (2001).

Il existe 2 sous-types de récepteurs A₂ : les récepteurs A_{2A} et A_{2B}. Le sous-type A_{2B} a une affinité pour l'adénosine très faible (5100 nM) comparée à celles des récepteurs A₁ et A_{2A} (Table 1); ce récepteur n'est donc pas impliqué dans la neuromodulation adénoenergique à des doses physiologiques d'adénosine et ne sera pas abordé dans ce chapitre. A l'opposé du récepteur A₁, le récepteur A_{2A} a un effet excitateur sur le neurone (Table 1). En effet, il stimule le relâchement des neurotransmetteurs excitateurs tel que l'acétylcholine, le glutamate, et l'aspartate, mais aussi d'autres neurotransmetteurs comme la noradrénaline et la dopamine (Sebastiao & Ribeiro, 1996). Le récepteur A_{2A} est couplé à des protéines G_s qui stimulent la production d'adénylate cyclase (Figure 3) et facilite l'activation des canaux calciques. On remarque que le récepteur A_{2A} de l'adénosine requiert pour être activé une concentration plus élevée d'adénosine que le récepteur A₁ (2x). Dans

une moindre mesure, l'activation des récepteurs A_{2A} inhibe la production d'adénylate cyclase par la protéine G_{olf} et inhibe l'activation des canaux calciques (Edwards & Robertson, 1999).

Le récepteur A_3 de l'adénosine est peu caractérisé et possède une affinité très faible pour l'adénosine (Table 1). Son rôle est de moduler dans certaines conditions d'autres récepteurs tels que le récepteur A_1 de l'adénosine (Dunwiddie *et al.*, 1997).

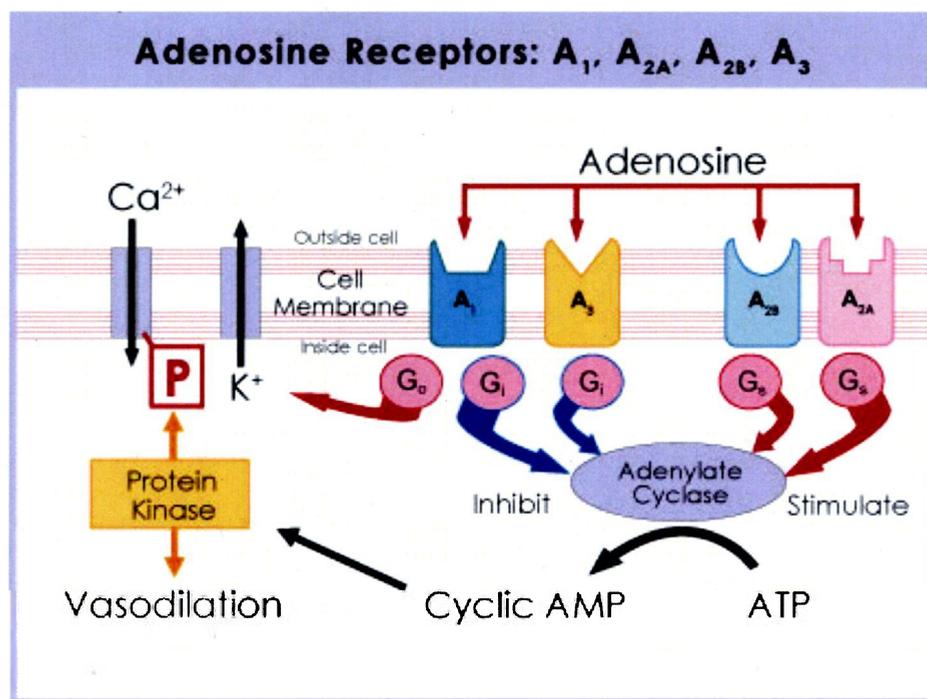


Figure 3. Schéma des mécanismes cellulaires mis en jeu lors de l'activation des récepteurs de l'adénosine par l'adénosine. Illustration issue de Adenosine Therapeutics, <http://www.adenrx.com/about.html>, téléchargée le 7 juillet 2007.

Rôle des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau. Parce que les récepteurs de l'adénosine sont exprimés dans toutes les cellules nerveuses, en particulier le récepteur A_1 de l'adénosine, et qu'ils modulent le relâchement des neurotransmetteurs, ils sont impliqués dans plusieurs fonctions du système nerveux. En effet, la manipulation des récepteurs de l'adénosine influence les processus cognitifs comme la mémoire (Prediger & Takahashi,

2005), les fonctions motrices (Nagel et al., 2003), la régulation du sommeil (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2002) ou encore les fonctions du système nerveux autonome tel que les fonctions cardiovasculaire (Scislo & O'Leary, 2005) et respiratoire (Wessberg *et al.*, 1984). Les rôles des récepteurs de l'adénosine dans les régulations de la respiration, de la fonction cardiovasculaire et du sommeil sont abordés dans les chapitres suivants.

2.1.2. Distribution des récepteurs de l'adénosine

L'étude de la distribution des récepteurs de l'adénosine dans les cellules nerveuses est importante car elle nous permet de mieux comprendre le rôle de la neuromodulation adénosinergique dans le fonctionnement du système nerveux. L'adénosine est présente dans la plupart des cellules du système nerveux et son niveau endogène en conditions physiologiques est entre 30-300 nM dans le cerveau du rat (Dunwiddie & Diao, 1994). Ainsi, la densité des récepteurs de l'adénosine dans la cellule est primordiale dans l'activation ou l'inhibition du neurone par l'adénosine. De plus, parce que les propriétés des deux principaux récepteurs de l'adénosine (A_1 et A_{2A}) sont opposés (inhibition *versus* excitation, respectivement), leurs distributions respectives influencent fortement leurs rôles fonctionnels. Dans ce chapitre, seules les distributions des récepteurs A_1 et A_{2A} seront abordées car ils sont les seuls à être activés par l'adénosine à des niveaux physiologiques d'adénosine.

Le récepteur A_1 de l'adénosine. Le récepteur A_1 se retrouve dans presque toutes les structures nerveuses du système nerveux, cependant l'intensité de son expression varie d'une structure à l'autre. Le récepteur A_1 est présent en grande densité dans le cortex, le cervelet, l'hippocampe, et la corne dorsale de la moelle épinière (Fredholm *et al.*, 2005). La table 2 présente les structures impliquées dans le contrôle respiratoire, le contrôle de la fonction cardiovasculaire et la régulation du sommeil qui expriment ce récepteur, les rôles physiologique de ces structures, les modèles et les techniques utilisées. Au niveau des noyaux respiratoires du bulbe rachidien, le récepteur A_1 est exprimé dans la médulla rostroventrolatérale (RVLM) et dans le nucleus tractus solitarius (NTS). Au niveau du pont, le récepteur A_1 est présent dans le locus coeruleus (LC), l'aire A5, les noyaux

parabrachiaux médians et le Kölliker Fuse (MPB/KF). Au niveau des autres structures du SNC impliquées dans la régulation du sommeil, ce récepteur est exprimé dans le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi), la formation réticulaire pontine orale (PnOc), les noyaux tégmental latérodorsal et pédonculopontin (LDT/PPT), le télencéphale basal (BF, *basal forebrain*) et l'aire préoptique ventro-latérale de l'hypothalamus (VLPO). Au niveau périphérique, dans les corps carotidiens, le récepteur A₁ de l'adénosine n'est pas exprimé (Gauda *et al.*, 2000). Cependant, il est largement exprimé au niveau des ganglions pétreux qui contiennent les corps cellulaires des neurones formant le nerf du sinus (Gauda & Lawson, 2000).

Le récepteur A_{2A} de l'adénosine. Ce récepteur est beaucoup moins exprimé dans le système nerveux que le récepteur A₁. Au niveau des noyaux respiratoires du tronc cérébral (Table 3), le récepteur A_{2A} a été identifié au niveau de la RVLM, la CVLM, le NTS, le noyau de l'hypoglosse, le noyau moteur du nerf vague. Au niveau des structures régulant le sommeil, la plupart des études relève les effets d'une micro-injection locale d'agoniste. Grâce à cette technique, ce récepteur a été trouvé au niveau de la formation réticulaire pontique (PRF), de l'aire préoptique latérale de l'hypothalamus (VLPO), et du noyau tubéromamillaire (TMN); voir Table 3. Au niveau périphérique, une littérature plus abondante s'intéresse à la présence des récepteurs de type A₂ de l'adénosine dans les corps carotidiens (CB). En effet, chez le rat l'ARM messenger pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine a été détecté dans les corps carotidiens par hybridation in-situ (Gauda *et al.*, 2000), RT-PCR, et immunohistochimie (Bairam & Carroll, 2005; Kobayashi *et al.*, 2000). Le récepteur A_{2B} a également été identifié dans les corps carotidiens du rat en culture par immunohistochimie (Conde *et al.*, 2006) et RT-PCR (Kobayashi *et al.*, 2000).

Table 2. Liste des structures nerveuses exprimant les récepteurs A₁ de l'adénosine et leurs rôles physiologiques.

Structures	Rôle physiologique de la structure	Récept A ₁	Modèle	Techniques	Références
Pré-Bötzinger	Génération du rythme respiratoire	?	-	-	-
RVLM	Contrôle respiratoire	+++	Agneau nouveau-né	Autoradiographie avec ligands radioactifs	(Bissonnette & Reddington, 1991; Conde <i>et al.</i> , 2006)
NTS	Contrôle respiratoire, Chémosensibilité au CO ₂ , Contrôle cardiovasculaire,	++	Jeune rat (P21) Agneau nouveau-né Rats	Immunohistochimie, Autoradiographie avec ligands radioactifs Immunohistochimie,	(Gaytan <i>et al.</i> , 2006) (Bissonnette & Reddington, 1991) (Pickel <i>et al.</i> , 2006) (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004)
LC	Contrôle respiratoire, Régulation du sommeil.	++	Jeune rat (P21)	Immunohistochimie	(Gaytan <i>et al.</i> , 2006)
A5	Contrôle respiratoire, Fonction cardiovasculaire.	++	Jeune rat (P21)	Immunohistochimie	(Gaytan <i>et al.</i> , 2006)
MPB / KF	Contrôle moteur du diaphragme, Modulation du rythme respiratoire, Fonction cardiovasculaire.	+++	Jeune rat (P21)	Immunohistochimie, Autoradiographie avec ligands radioactifs	(Gaytan <i>et al.</i> , 2006) (Bissonnette & Reddington, 1991)
PRF	Induction du sommeil paradoxal (REM)	++	Rat adulte	Microinjection d'agoniste du récepteur A ₁ .	(Marks <i>et al.</i> , 2003; Marks <i>et al.</i> , 2005)
BF	Induction du sommeil à ondes lentes (non-REM)	++	Rat adulte	Microinjection d'agoniste A ₁ , RT-PCR, hybridation <i>in situ</i>	(Alam <i>et al.</i> , 1999) (Basheer <i>et al.</i> , 2001)
VLPO	Induction du sommeil	++	Rat adulte	Microdialyse d'agoniste du récepteur A ₁ .	(Methippara <i>et al.</i> , 2005)
LPGi		+	Jeune rat (P21)	Immunohistochimie	(Gaytan <i>et al.</i> , 2006)
LDT/PPT	Régulation du sommeil	++	Rat adulte	Microinjection d'agoniste du récepteur A ₁ .	(Rainnie <i>et al.</i> , 1994)
CB	Chémosensibilité à l'oxygène	-	Rat adulte	Northern blot RT-PCR	(Bairam & Carroll, 2005) (Gauda <i>et al.</i> , 2000)

BF, télencéphale basal; NTS, nucleus tractus solitarius; LC, locus coeruleus, A5, aire A5, MPB/KF, noyau parabrachial médian et Kölliker Fuse; LPGi, noyau paragigantocellulaire latéral; RVLM, rostro-ventro-latérale medulla; PRF, formation réticulaire pontine; LDT/PPT, noyaux tégmental latérodorsal et pédonculopontin; CB, corps carotidiens; VLPO, aire préoptique ventrolatérale de l'hypothalamus.

Table 3. Liste des structures nerveuses exprimant les récepteurs A_{2A} de l'adénosine et leurs rôles physiologiques.

Structures	Rôle physiologique de la structure	Expression relative A _{2A}	Modèle	Techniques	Références
PréBötzinger	Génération du rythme respiratoire	?			
RVLM	Contrôle respiratoire Contrôle cardiovasculaire	++	Rat nouveau-né Rat adulte	Hybridation in-situ Autoradiographie	(Zaidi <i>et al.</i> , 2006) (Thomas <i>et al.</i> , 2000b)
CVLM	Contrôle respiratoire	++	Rat adulte	Autoradiographie	(Thomas <i>et al.</i> , 2000b)
NTS	Contrôle respiratoire, Chemosensibilité au CO ₂ , Contrôle cardiovasculaire.	++	Rat adulte	Immunohistochimie	(Pickel <i>et al.</i> , 2006) (Rosin <i>et al.</i> , 1998) (Thomas <i>et al.</i> , 2000b)
LC	Contrôle respiratoire, Régulation du sommeil	?			
A5	Contrôle respiratoire, Fonction cardio-vasculaire	?			
MPB / KF	Contrôle moteur du diaphragme, Modulation du rythme respiratoire, Fonction cardio-vasculaire	?			
PRF	Induction du sommeil paradoxal (REM)	++	Souris adulte	Microdialyse de l'agoniste A _{2A}	(Coleman <i>et al.</i> , 2006)
TMN	Induction du sommeil (histamine)	++			
BF	Induction du sommeil à ondes lentes (non-REM)	--	Rat adulte	Hybridation <i>in situ</i> , RT-PCR	(Basheer <i>et al.</i> , 2001)
VLPO	Induction du sommeil	++	Rat adulte	Microinjection d'agoniste	(Methippara <i>et al.</i> , 2005) (Scammell <i>et al.</i> , 2001)
LDT/PPT	Régulation du sommeil	?			
CB	Chemosensibilité à l'oxygène	++	Rat adulte	Immunocytochimie, Northern blot Hybridation in situ	(Conde <i>et al.</i> , 2006) (Bairam & Carroll, 2005) (Kobayashi <i>et al.</i> , 2000)
Vagal motor nucleus	Système parasympathique	++	Rat adulte	Autoradiographie	(Thomas <i>et al.</i> , 2000b)
HMN	Voies aériennes supérieures	++	Rat adulte	Autoradiographie	(Thomas <i>et al.</i> , 2000b)

NTS, nucleus tractus solitarius; LC, locus coeruleus, A5, aire A5, BF, télencéphale basal; MPB/KF, noyau parabrachial médian et Kölliker Fuse; LPGi, noyau paragigantocellulaire latéral; RVLM, partie rostrale de la médulla ventro-latérale; CVLM, partie caudale de la médulla ventro-latérale; PnOc, formation réticulaire pontine orale; LDT/PPT, noyaux tégmental latérodorsal et pédonculopontin; CB, corps carotidiens; PRF, formation réticulaire pontine; TMN, noyau tubéromamillaire; VLPO, aire préoptique ventro-latérale; HMN, noyau moteur de l'hypoglosse.

2.1.3. Récepteurs de l'adénosine dans les autres tissus

Les récepteurs de l'adénosine sont également présents dans d'autres types de cellules que la cellule nerveuse. Au niveau des poumons, les récepteurs de l'adénosine sont exprimés dans les cellules épithéliales des bronches, les cellules endothéliales, et les cellules des muscles lisses, et y jouent un rôle anti-inflammatoire (Caruso *et al.*, 2006). Également au niveau des muscles lisses des bronches, l'activation du récepteur A_1 de l'adénosine provoque une bronchoconstriction (Ali *et al.*, 1994). Au niveau des muscles lisses des vaisseaux sanguins, les récepteurs de l'adénosine modulent la vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux, affectant ainsi le débit sanguin (O'Regan, 2005). Au niveau du cœur, les récepteurs de l'adénosine sont exprimés dans les myocytes cardiaques, servant de régulateurs de la conduction cardiaque et de modulateurs du débit sanguin coronaire (Lasley & Smart, 2001). Au niveau des reins, les récepteurs de l'adénosine jouent un rôle dans les désordres de rétention des fluides et l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'adénosine favorise la diurèse (Modlinger & Welch, 2003). Par conséquent, l'étude du système adénoenergique ne peut se limiter aux rôles des récepteurs de l'adénosine au niveau des cellules nerveuses, mais doit tenir compte de plusieurs autres variables interagissant entre elles.

2.1.4. Ontogénèse des récepteurs de l'adénosine

Durant l'embryogenèse et la maturation du nouveau-né, l'expression et la distribution des récepteurs de l'adénosine présentent plusieurs changements. L'ontogénie des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine a été évaluée en mesurant l'expression de l'ARNm pour ces récepteurs et de la liaison de ligands radioactifs aux récepteurs chez le rat.

Récepteur A_1 de l'adénosine. Par hybridation *in situ* de l'ARNm du récepteur A_1 de l'adénosine dans le cortex du rat, il a été démontré que l'ARNm augmente progressivement son niveau d'expression durant la gestation pour atteindre son maximum à la naissance (Rivkees, 1995). L'ontogénie des récepteurs A_1 de l'adénosine a été évaluée durant

l'embryogenèse et le développement postnatal par autoradiographie du ligand [^3H]DPCPX chez le rat (Aden *et al.*, 2000). Durant l'embryogenèse et jusqu'au 3^{ème} jour suivant la naissance (P3), l'affinité du ligand pour le récepteur A_1 est assez stable au niveau du cortex cérébral, mais elle augmente très fortement par la suite pour atteindre son maximum à P21 (Aden *et al.*, 2000). Au niveau du thalamus, l'ARNm est exprimé à son maximum dès le 14^{ème} jour suivant la conception (E14) (Rivkees, 1995). Le récepteur A_1 suit un développement similaire dans le thalamus à celui observé dans le cortex avec une forte augmentation après la naissance et un maximum à P21 (Aden *et al.*, 2000). Au niveau du bulbe rachidien, le niveau d'ARNm codant pour le récepteur A_1 atteint tôt son niveau maximum au alentour de E17 (Aden *et al.*, 2000). Toujours chez le rat, l'expression du récepteur A_1 évaluée par immunohistochimie est relativement stable de la naissance à P21 (Gaytan *et al.*, 2006). Au niveau des structures du pont, cependant, l'expression du récepteur A_1 double durant les 3 premières semaines suivant la naissance du rat (Gaytan *et al.*, 2006).

Récepteur A_{2A} de l'adénosine. L'ontogénie de ce récepteur de la naissance à l'âge adulte a été déterminé chez le rat par autoradiographie du ligand [^3H]CGS-21680 (Johansson *et al.*, 1997a). Au niveau du cortex cérébral, l'affinité du ligand pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine double durant la première semaine suivant la naissance et triple à l'âge adulte. L'affinité du ligand pour le récepteur A_{2A} est plus prononcée au niveau des ganglions de la base, plus précisément dans le striatum, que dans le cortex lors de la naissance du rat nouveau-né. Par la suite, une progression similaire à celle du cortex est observée durant la croissance du striatum du nouveau-né, bien que l'affinité y reste toujours plus élevée que dans le cortex. Au niveau des structures du tronc cérébral du rat, les niveaux d'ARNm du récepteur A_{2A} ne change pas durant le développement postnatal du nouveau-né (Zaidi *et al.*, 2006). Cependant, les changements d'expression du récepteur A_{2A} durant l'embryogenèse sont encore peu connus. Pourtant, parce que le récepteur A_{2A} de l'adénosine possède un rôle excitateur, opposé à celui du récepteur A_1 , son expression durant le développement du nouveau-né est d'une importance considérable. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux de comprendre les changements d'expression de ce récepteur durant la maturation du système nerveux central, particulièrement au niveau du tronc cérébral du rat. Au niveau périphérique, dans les corps

carotidiens, l'adénosine et le récepteur A_{2A} jouent un rôle important dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Durant les premiers jours suivants la naissance du nouveau-né, le niveau d'expression de l'ARNm du récepteur A_{2A} (déterminé par hybridation *in situ*) reste constant, mais il diminue au 14^{ème} jour (Gauda *et al.*, 2000). Dans la même étude, le récepteur A_1 n'a pas été détecté quelque soit l'âge du nouveau-né.

Les études citées précédemment permettent de tirer quelques conclusions quant aux développements respectifs des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine. Le récepteur A_1 de l'adénosine est bien distribué dans le système nerveux central et son expression varie peu durant la gestation, mais augmente durant les premières semaines de vie du rat nouveau-né pour atteindre un maximum à l'âge de 20 jours. Ainsi, parce qu'une large quantité de récepteurs A_1 de l'adénosine sont exprimés durant les premières semaines de vie du rat nouveau-né, cette période du développement est un moment-clé pour le système de neuromodulation adénergique. L'expression du récepteur A_{2A} de l'adénosine est cependant plus progressive que celle du récepteur A_1 avec une augmentation constante jusqu'à l'âge adulte. Peu de données sont disponibles quant à l'expression du récepteur A_{2A} chez le fœtus.

2.1.5. Effet chronique de la caféine sur le système nerveux

Chez l'adulte. Chez l'humain, la source la plus importante de caféine est la consommation de toutes substances contenant des méthylxanthines comme le café ou autres breuvages à base de caféine (Fredholm *et al.*, 1999b). La consommation chez l'humain adulte de caféine (3x250 mg par jour pendant 7 jours) induit une surexpression du nombre de récepteurs de l'adénosine au niveau des plaquettes sanguines 60 heures après l'arrêt de la consommation (Biaggioni *et al.*, 1991b; Paul *et al.*, 1993). Chez la souris adulte, l'exposition chronique à la caféine (100 mg/jour pendant 7 jours) augmente la densité des récepteurs A_1 dans le striatum, sans altérer la densité du récepteur A_{2A} (Shi *et al.*, 1993), diminue la densité des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques et augmente celles des récepteurs sérotoninergiques, muscariniques et nicotinergiques dans le cortex (Shi *et al.*, 1993). L'exposition à la théophylline produit des effets similaires à ceux de la caféine (Shi &

Daly, 1999). L'exposition chronique au IBMX (1-isobutyl-3-méthylxanthine), un puissant antagoniste des récepteurs de l'adénosine et inhibiteur des phosphodiésterases, cause seulement une légère augmentation de l'expression des récepteurs A₁ dans le cortex de la souris (Shi & Daly, 1999), suggérant que l'inhibition chronique des phosphodiésterases n'est pas responsable des modifications d'expression des récepteurs de l'adénosine. L'exposition chronique au DMPX (3,7-diméthyl-1-propargylxanthine), un antagoniste des récepteurs A_{2A}, induit également une légère augmentation de l'expression des récepteurs A₁ au niveau du cortex de la souris adulte (Shi & Daly, 1999). Le fait que la caféine traverse la barrière hémato-encéphalique comparé aux autres drogues utilisées dans cette étude explique pourquoi la caféine induit un effet prononcé sur plusieurs récepteurs (Shi & Daly, 1999). Toujours chez la souris, une administration chronique de caféine plus longue à des doses plus élevées (200 mg/kg/jour pendant 40 jours) augmente l'expression des récepteurs de l'adénosine dans le cervelet et le tronc cérébral (Boulenger *et al.*, 1983; Marangos *et al.*, 1984). Un traitement chronique de 14 jours chez la souris adulte augmente uniquement l'expression des récepteurs A_{2A} au niveau du striatum, ainsi que l'ARNm de ce récepteur dans cette structure (Johansson *et al.*, 1997b). Chez le rat adulte, l'administration de caféine (75 mg/kg/jour) pendant 12 jours augmente également l'expression des récepteurs A₁ de l'adénosine au niveau du cortex et du cervelet (Hawkins *et al.*, 1988). Un traitement chronique de théophylline (un antagoniste non-spécifique des récepteurs de l'adénosine) à une dose de 100 mg/kg pendant 7 jours chez le rat adulte augmente l'expression des récepteurs A₁, mais non des récepteurs A_{2A}, dans le thalamus, l'hippocampe, et le cervelet (Lupica *et al.*, 1991). L'ensemble de ces études suggèrent qu'une courte exposition à un antagoniste des récepteurs de l'adénosine (théophylline ou caféine) est suffisante pour augmenter l'expression des récepteurs A₁, tandis qu'une exposition plus longue est nécessaire pour augmenter celle des récepteurs A_{2A}. Il est cependant clair que l'effet principal d'un blocage chronique des récepteurs de l'adénosine chez l'adulte est d'augmenter l'expression de ces récepteurs. Cependant, ces modifications dépendent de plusieurs facteurs, tels que la dose, la durée et le type de méthylxanthine utilisé. Cependant, qu'en est-il de l'impact de l'administration chronique de méthylxanthine lors d'une période sensible du développement chez le fœtus ou le nouveau-né?

Durant le développement. Une première série d'études s'est intéressée aux effets d'une consommation de caféine par la mère pendant la gestation sur le développement du fœtus et du nouveau-né après la naissance. La consommation de caféine (80 mg/kg/jour) par la mère durant toute la gestation du rat induit un taux de liaison du ligand radioactif au récepteur A₁ du cerveau du fœtus (mesuré juste avant la naissance) plus bas dans le groupe ayant reçu de la caféine, suggérant une régulation négative de ce récepteur (Leon *et al.*, 2002). La consommation d'une dose moins élevée par la mère (25 mg/kg/jour) ne modifie pas l'expression des récepteurs dans le cerveau des ratons à la naissance, ainsi que 1, 2 ou 3 semaines après la naissance (Aden *et al.*, 2000). Une deuxième série d'études s'est intéressée aux conséquences de la caféine administrée directement aux ratons en période postnatale sur l'expression des récepteurs de l'adénosine dans plusieurs structures nerveuses du nouveau-né, mais aussi plusieurs mois après le traitement chez l'adulte. Un traitement à la caféine ayant eu lieu du 2^{ème} au 6^{ème} jour suivant la naissance (20 mg/kg/jour le premier jour et 15 mg/kg/jour les jours suivants) augmente la densité du récepteur A₁ (estimée par autoradiographie avec le ligand radioactif [³H]CHA) au niveau du thalamus du rat âgé de 30 jours (Etzel & Guillet, 1994). Ce traitement augmente également la densité des récepteurs A₁ dans l'hippocampe, le cortex, mais aucune différence n'est observée dans l'hypothalamus et le tronc cérébral du rat adulte (Guillet & Kellogg, 1991a). Cependant, il est probable que des mesures plus précises au niveau des structures du tronc cérébral révéleraient une altération des récepteurs A₁ de l'adénosine. En effet, le même traitement à la caféine augmente la densité des récepteurs A₁ dans certains noyaux respiratoires du pont chez le nouveau-né âgé de 6 jours (Gaytan *et al.*, 2006). Cependant, dans cette étude, cet effet semble se dissiper avec l'âge car aucune différence n'est observée à 30 jours. Une étude récente s'est intéressée aux effets à long terme de la caféine administrée en période néonatale sur la formation des dendrites des neurones corticaux chez le rat adulte. Ils ont démontré que les dendrites des neurones pyramidaux du cortex préfrontal sont plus long chez le groupe traités que chez le groupe contrôle (Juarez-Mendez *et al.*, 2006). Bien qu'une modification morphologique des neurones soit d'un grand intérêt, la dose utilisée dans cette étude (50 mg/kg chaque jour de P1 à P12) est plus élevée que celles des études ci-dessus et met probablement en jeu d'autres mécanismes que l'inactivation des récepteurs de l'adénosine. Ainsi, on peut conclure que l'administration de caféine en période néonatale

influence le développement du système adénoenergique et que ces effets sont d'autant plus prononcés lorsque le traitement s'étalent sur une longue période temporelle. Cet effet persiste jusqu'à l'âge adulte dans certaines études bien que la dose utilisée soit dans des limites physiologiques et bien au dessous d'une dose toxique. Ainsi, on peut s'interroger sur les conséquences d'un tel traitement sur les fonctions nerveuses chez le jeune rat ainsi que chez l'adulte.

2.1.6. Effet chronique de la caféine en période postnatale sur le comportement

Plusieurs études ont abordé les conséquences de la caféine administrée en période postnatale sur le développement comportemental et cognitif à long terme du rat parce qu'un tel traitement affecte le système adénoenergique. En effet, un traitement postnatal à la caféine administré du 2^{ème} au 6^{ème} jour après la naissance du raton modifie la capacité du rat juvénile à mémoriser des tâches (Fisher & Guillet, 1997). En effet, à l'âge d'un mois, le rat juvénile traité à la caféine présente une moins bonne capacité à mémoriser des tâches que le rat contrôle. À l'âge adulte, le traitement néonatal à la caféine diminue les performances mnésiques mais cet effet n'est observé que chez les mâles. L'activité motrice en réponse à la caféine a également été évaluée chez le rat traité à la caféine. À l'âge d'un mois, le rat traité présente une réponse locomotrice à la caféine plus faible que le rat contrôle au même âge (Guillet, 1990). Dans cette étude, l'effet à long terme de la caféine néonatale est spécifique au sexe puisque seuls les mâles sont affectés. Une étude récente montre également que le traitement néonatal à la caféine induit chez le rat âgé entre 1 et 2 mois une baisse de l'anxiété, une plus grande sensibilité à la chaleur et de mauvaises performances de conditionnement à la douleur (Pan & Chen, 2007). À l'âge adulte, les rats traités à la caféine en période néonatale présentent des performances d'apprentissage spatial moins élevées que les rats contrôles (Zimmerberg *et al.*, 1991). En conclusion, l'exposition à la caféine durant les premiers jours de vie du raton altère le système adénoenergique du rat juvénile et adulte, et par conséquent modifie plusieurs fonctions comportementales. Cependant, aucune étude ne fait état des conséquences du traitement néonatal à la caféine sur d'autres fonctions du système nerveux, telles que le contrôle de la respiration, le contrôle de la fonction cardiovasculaire ou la régulation du sommeil. Pourtant, l'altération

de ces fonctions vitales du système nerveux par la caféine peut avoir un impact important sur les fonctions physiologiques du système adénoenergique.

2.2. *Système de contrôle de la respiration*

Le rôle principal du système de contrôle de la respiration chez les mammifères est de maintenir un approvisionnement constant en oxygène et d'éliminer le gaz carbonique produit lors de la consommation d'oxygène. Pour y parvenir, le système nerveux commande les muscles respiratoires afin de générer une ventilation pulmonaire appropriée permettant les échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires et ainsi de maintenir des niveaux de O₂ et CO₂ sanguins dans des limites physiologiques optimales. Le système de contrôle de la respiration doit s'adapter aux différences demandes du métabolisme (exercice, maladie), ainsi qu'à une multitude de changements environnementaux (hypoxie, hypercapnie, altitude). Une altération du fonctionnement du contrôle respiratoire peut mener à des pathologies graves telles que les apnées obstructives du sommeil ou des apnées centrales, qui peuvent mettre en jeu l'homéostasie de l'organisme.

Dans ce chapitre, les mécanismes du système de contrôle de la respiration ne seront pas abordés de façon exhaustive. En effet, un intérêt particulier sera porté sur le rôle de la neuromodulation adénoenergique dans le système de contrôle de la respiration, permettant ainsi de mieux comprendre l'impact potentiel d'un changement du système adénoenergique sur le fonctionnement du système nerveux. Le rôle des principaux neurotransmetteurs impliqués dans le contrôle respiratoire ne sera pas abordés, sauf lorsqu'ils interagissent avec le système adénoenergique.

2.2.1. **Génération de la respiration**

Commande respiratoire. Les centres de contrôle de la respiration sont situés dans le tronc cérébral (Figure 4), s'étalant du pont (la protubérance) à la moelle épinière. Le système de contrôle de la respiration est constitué de noyaux respiratoires recevant des

afférences des aires corticales supérieures, du thalamus, des chémorécepteurs périphériques, des propriocepteurs musculaires (Figure 5) et envoyant des commandes motrices via des motoneurones au niveau des nerfs phréniques en direction du diaphragme (Figure 4) et au niveau des nerfs innervant les muscles des voies aériennes supérieures. Ce système produit une alternance entre l'activité inspiratoire générée par le diaphragme, les muscles intercostaux et les muscles des voies aériennes supérieures et l'activité expiratoire soit passive lors du repos ou active grâce aux muscles des voies aériennes supérieures, muscles abdominaux et intercostaux.

Noyaux respiratoires du tronc cérébral. Au niveau de la partie ventrolatérale du bulbe rachidien se situent plusieurs noyaux générant le rythme respiratoire (Figure 6). Le complexe préBotzinger (préBotzC) est considéré comme le centre générateur du rythme respiratoire (Smith *et al.*, 1991). Le préBotzC contient plusieurs centaines de neurones générant spontanément une activité rythmique et exprimant le récepteur neurokinin NK1 (récepteur cible pour la substance P), un marqueur unique du préBotzC au niveau de la partie ventrale du bulbe rachidien (Gray *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2001). Le rôle du préBotzC comme seul générateur du rythme respiratoire est actuellement le sujet d'un débat adroitement résumé dans une revue récente ayant pour titre *Looking for inspiration* (Feldman & Del Negro, 2006). En effet, des études proposent l'existence de nouveaux noyaux respiratoires formant le groupe respiratoire parafacial et chevauchant partiellement le noyau rétrotrapézoïde (pFRG/RTN), générant également un rythme respiratoire indépendant du préBotzC et dont le cycle respiratoire débute légèrement avant (activité pré-inspiratoire) le cycle généré par le préBotzC (Onimaru & Homma, 2003). À l'opposé de cette théorie, il a été proposé que les pFRG/RTN seraient responsables de l'activité dite expiratoire (Janczewski & Feldman, 2006; Mellen *et al.*, 2003). Parce que l'existence d'un réseau respiratoire composé de deux générateurs indépendant l'un de l'autre (le préBotzC et les pFRG/RTN) a été démontré uniquement chez les rats nouveau-nés anesthésiés ou avec des préparations *in vitro*, des études complémentaires chez le rat adulte *in vivo* restent à réaliser.

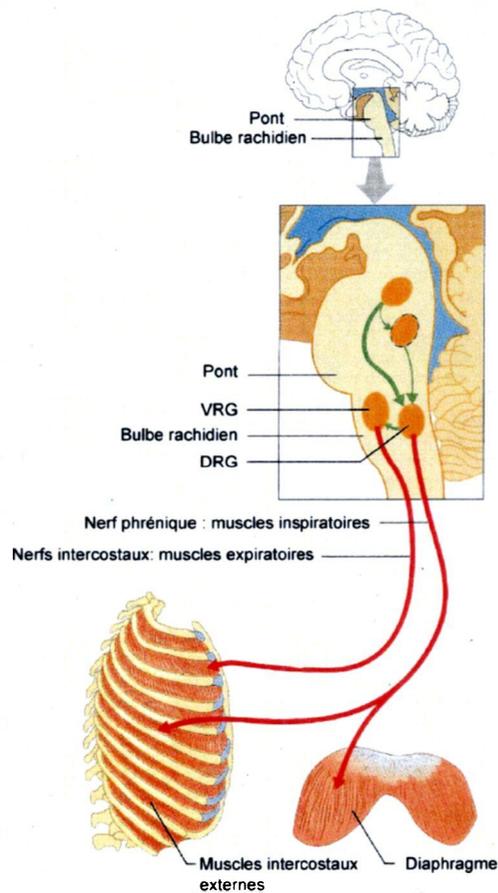


Figure 4. Système de contrôle de la respiration constitué du tronc cérébral regroupant le pont et le bulbe rachidien et plusieurs nerfs commandant l'activité respiratoire. Le nerf phrénique constitué de motoneurones commande l'activité du diaphragme et est responsable de l'activité lors de l'inspiration. Figure adaptée de Feldman et McCrimmon, *Fundamentals of Neurosciences*, 2^{ème} édition, Academic Press.

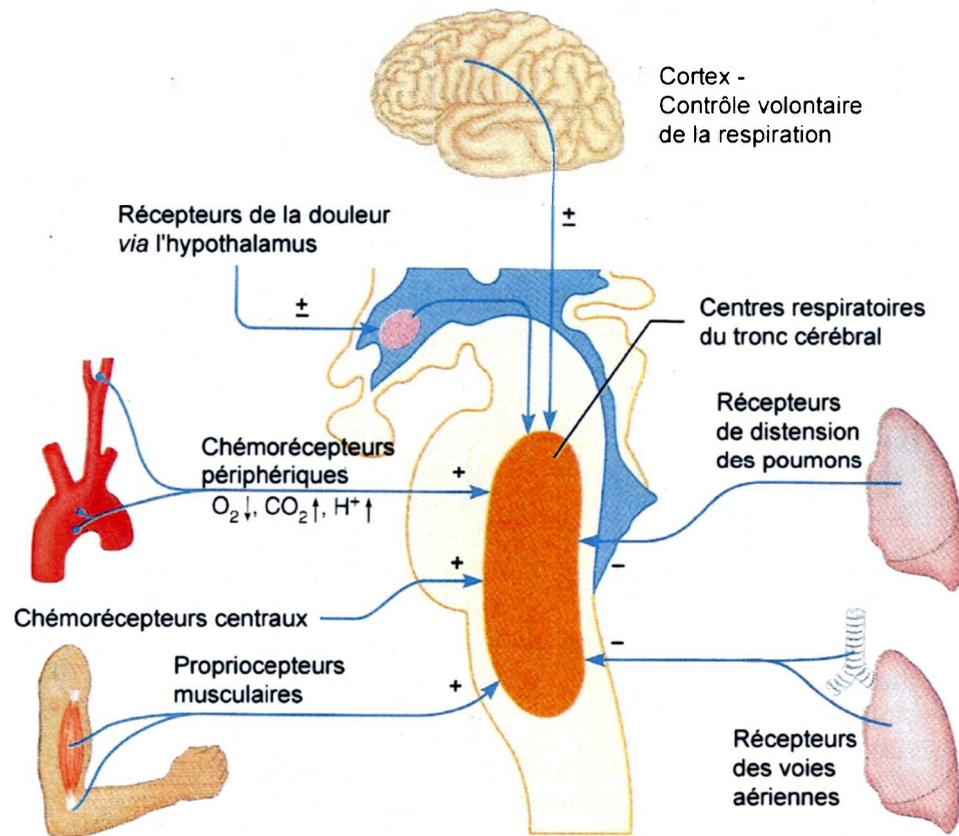


Figure 5. Afférences modulant le système de contrôle de la respiration. Figure adaptée de Feldman et McCrimmon, *Fundamentals of Neurosciences*, 2^{ème} édition, Academic Press.

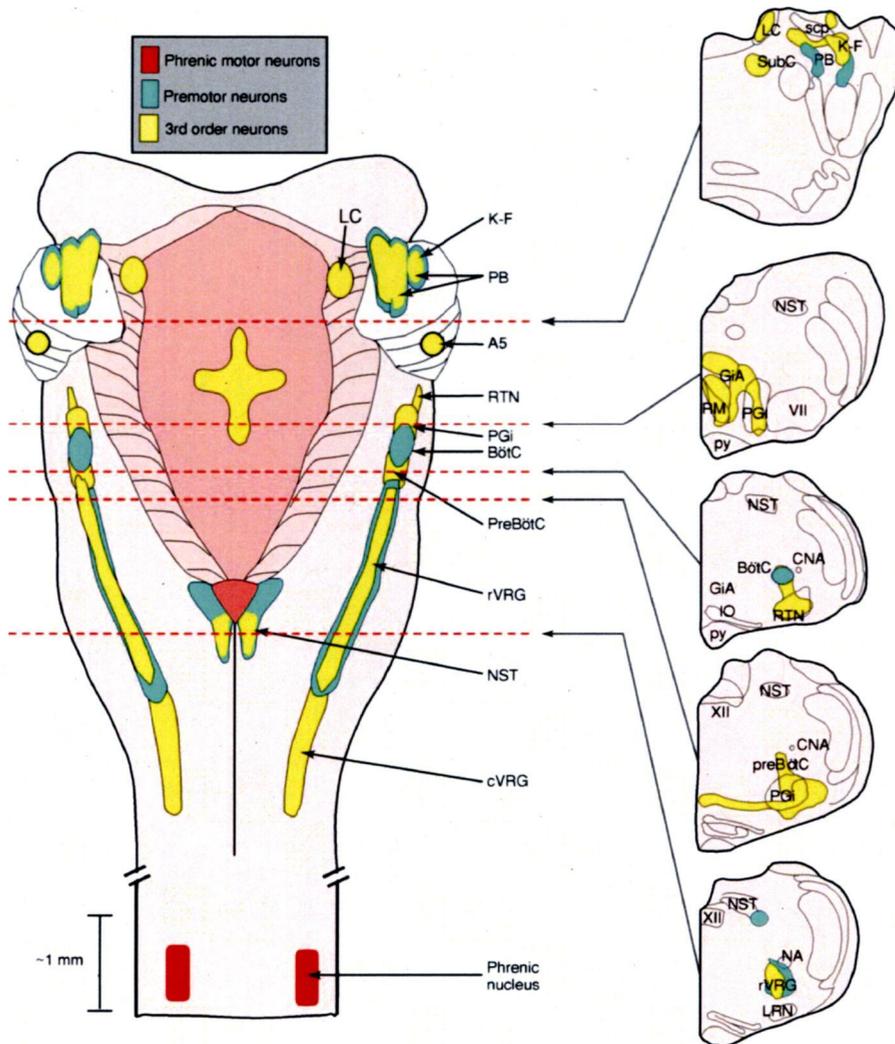


Figure 6. Représentation des principaux noyaux du tronc cérébral du rat impliqués dans le contrôle respiratoire. Cette figure est issue du chapitre de Feldman et McCrimmon du livre *Fundamentals of Neuroscience*, 1st Edition, L. Squire, Academic Press. NTS, nucleus tractus solitarius; LC, locus coeruleus; A5, aire A5; MPB/KF, noyau parabrachial médian et Kolliker Fuse; PGI, noyau paragigantocellulaire latéral; PréBötC, complexe préBötzinger, rVRG, partie rostrale du groupe ventral respiratoire; cVGR, partie caudale du groupe respiratoire ventral; BötC, complexe Bötzinger.

Le rythme respiratoire est modulé par les structures pontiques du groupe respiratoire dorsal ou DRG (Figure 6 et 7) telles que le locus coeruleus (LC), le noyau parabrachial (MPB), le noyau Kölliker-Fuse (KF) et l'aire A5 (Alheid *et al.*, 2004) dont certains neurones projettent au niveau des noyaux respiratoires de la partie ventrolatérale du bulbe rachidien (VLM) et du nucleus tractus solitarius (NTS). Thomas Lumsden en 1923 fût le premier scientifique à noter le rôle du pont dans la génération du rythme respiratoire (Lumsden, 1923). En effet, en effectuant des transections au niveau du pont, il remarqua l'apparition progressive d'apnées ou arrêts de la respiration. Par la suite, il a été démontré que le MPB et le KF sont deux structures ayant une activité phasique synchronisée à celle du RVLM et modulant l'activité rythmique du RVLM (pour des revues : St-John & Paton, 2004; Ezure, 2004). La présence de projections allant du bulbe rachidien (NTS et complexe Botzinger) au pont a également été démontrée dans plusieurs études de traçage neuronale (Smith *et al.*, 1989; Kalia, 1977). D'un point de vue fonctionnel, le rôle du pont n'est pas très clair. Il a été proposé que ces structures stimulent l'activité respiratoire en facilitant la transition entre inspiration et expiration (Feldman, 1976). Cependant, les structures du pont n'ont pas toutes les mêmes influences sur la respiration. En effet, le LC a un effet facilitateur noradrénergique sur le rythme respiratoire du rat (Li & Nattie, 2006), tandis que l'aire A5 un effet inhibiteur également noradrénergique chez le rat nouveau-né *in vitro* (Hilaire *et al.*, 2004). Également, les structures pontiques régulent d'autres fonctions du système nerveux telles que la fonction cardiovasculaire et le sommeil.

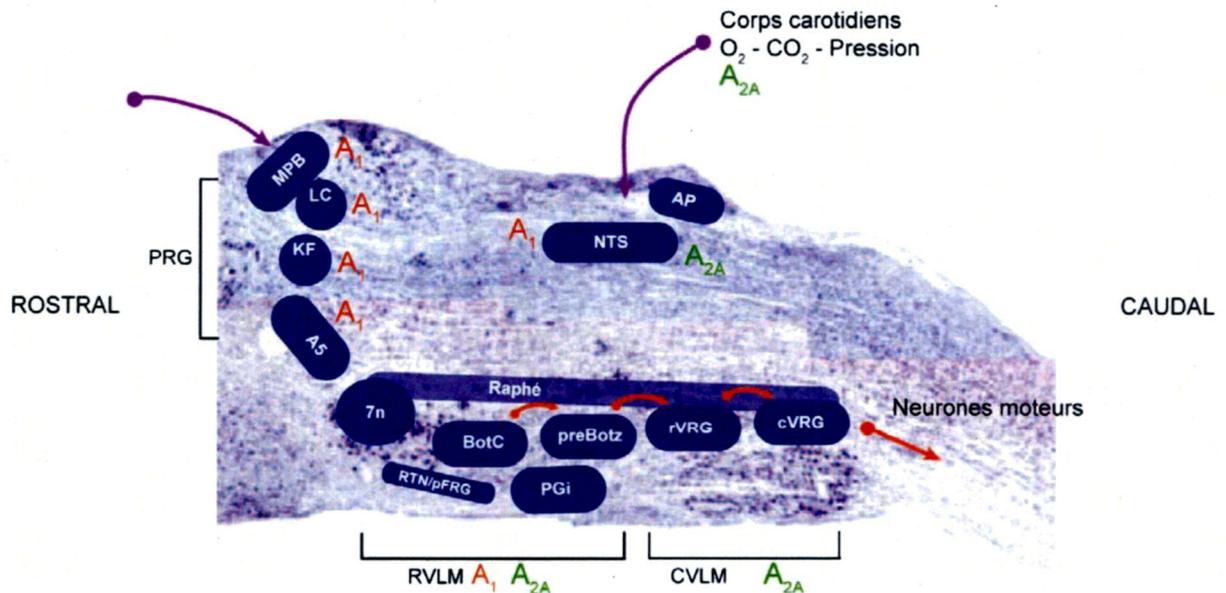


Figure 7. Schéma illustrant les structures impliquées dans le contrôle respiratoire et l'expression des récepteurs A₁ (en orange) et A_{2A} (en vert) de l'adénosine dans chacun des noyaux. Les structures sont projetées sur une coupe sagittale du tronc cérébral du rat pour permettre une meilleure représentation et compréhension de l'interaction des noyaux. NTS, nucleus tractus solitarus; LC, locus coeruleus; A5, aire A5; MPB/KF, noyau parabrachial médian et Kolliker Fuse; PGI, noyau paragigantocellulaire latéral; PréBotC, complexe préBötzingier, rVRG, partie rostrale du groupe ventral respiratoire; cVGR, partie caudale du groupe respiratoire ventral; BotC, complexe Bötzingier; pFRG/RTN, noyaux du groupe parafacial et rétro-trapézoïde; 7n, noyau facial; AP, area postrema; RVL, médulla rostro-ventro-latérale, CVL, médulla caudo-ventro-latérale. Coupe sagittale du tronc cérébral du rat empruntée à Guyenet (2006).

Le NTS est également une structure importante régulant l'activité respiratoire (Figure 7). Cette structure reçoit des afférences provenant du nerf du sinus carotidiens (chémo-réception et baroréception), ainsi que des afférences provenant du nerf vague : fibres C bronchopulmonaires et mécanoréception (pour une revue : Kubin *et al.*, 2006). Cette structure projette ses neurones en direction de la RVLM et des structures pontiques. Le NTS participe à des fonctions vitales de l'organisme, telles que la fonction cardiovasculaire et les réponses à l'hypoxie et l'hypercapnie. La micro-injection d'acides aminés excitateurs dans la partie rostroventrolatérale du NTS (rNTS) augmente la fréquence respiratoire du rat anesthésié, tandis que la même injection dans la partie caudale (cNTS) la diminue (Subramanian *et al.*, 2007). Chez l'animal conscient, l'excitation du NTS par une acidification locale augmente la ventilation en augmentant le volume et la fréquence respiratoire (Nattie & Li, 2002). Ainsi, le NTS, en plus d'être un centre intégrateur des afférences chémo- et baro-sensibles, module également la génération de la ventilation au niveau de la RVLM.

Rôle des récepteurs de l'adénosine dans le contrôle de la respiration. L'adénosine joue un rôle important au niveau du système de contrôle de la respiration. En effet, comme il l'a été démontré dans le chapitre précédent, les récepteurs A_1 et A_{2A} sont exprimés dans plusieurs noyaux respiratoires du tronc cérébral. La figure 7 présente une illustration schématisée des principaux noyaux respiratoires et de la présence de récepteurs de l'adénosine dans ces noyaux. Les récepteurs A_1 (en orange) et A_{2A} (en vert) de l'adénosine présentent des distributions hétérogènes au niveau du tronc cérébral et des corps carotidiens, et l'activation des récepteurs de l'adénosine au niveau de ces structures produit des effets divers sur l'activité respiratoire. En effet, plusieurs études se sont intéressées au rôle d'une administration systémique d'agonistes des récepteurs de l'adénosine sur l'activité respiratoire. La table 4 résume les effets physiologiques respiratoires de chacun des récepteurs de l'adénosine en tenant compte de l'état de conscience, de l'espèce et du ligand utilisé. En résumé, l'activation systémique du récepteur A_1 de l'adénosine diminue la ventilation chez le rat anesthésié ou éveillé. Cet effet est probablement dû à l'activation des récepteurs A_1 au niveau de la RVLM puisque l'application d'agoniste à ce niveau diminue la respiration. Cependant, l'utilisation d'un ligand activant les deux types de récepteurs produit des effets différents. En effet, chez le singe, l'activation des récepteurs

de l'adénosine à l'aide d'un agoniste non-spécifique augmente la fréquence respiratoire, tandis que chez l'humain, une augmentation de la ventilation est présente. Finalement, l'augmentation du niveau d'adénosine au niveau des corps carotidiens augmente la ventilation précisant le lieu probable d'action de l'adénosine sur la ventilation. En effet, les récepteurs excitateurs A_{2A} et A_{2B} de l'adénosine sont exprimés au niveau des corps carotidiens (Conde *et al.*, 2006) et pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la ventilation lors de l'injection systémique d'un agoniste non-spécifique pour les récepteurs de l'adénosine.

En conclusion, au niveau central, l'activation des récepteurs A_1 de l'adénosine diminue l'activité respiratoire et au niveau périphérique, l'adénosine l'augmente (le rôle périphérique de l'adénosine sera abordé ultérieurement dans la section s'intéressant à la réponse ventilatoire à l'hypoxie). Cependant, la plupart des études ayant étudié le rôle de l'adénosine au niveau central ont utilisé des ligands ayant peu de spécificités pour chacun des récepteurs de l'adénosine. Pourtant, les effets des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine sont opposés et les deux types de récepteurs sont présents dans le tronc cérébral. Ainsi, il est difficile de définir leurs rôles dans le contrôle respiratoire en utilisant de tels ligands. Par conséquent, l'injection d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques à chaque type de récepteur permettrait de mieux cibler le rôle de ces récepteurs dans l'activité respiratoire, en particulier le rôle du récepteur A_{2A} de l'adénosine qui a été peu étudié.

Table 4. Effets de l'activation des récepteurs de l'adénosine sur la ventilation.

Drogue	Voie	\dot{V}_E	V_T	f_R	Etat	Espèce	Références
Agoniste A ₁ (L-PIA)	icv	↓	↓	↓	Anesthésié	Rat adulte	(Wessberg <i>et al.</i> , 1984)
Agoniste A ₁ (R-PIA)	ip	↓	=	↓	Éveillé	Lapin n- nés	(Runold <i>et al.</i> , 1986).
Agoniste A ₁ /A _{2A} (NECA)	im	=	↓	↑	Éveillé	Singe	(Howell <i>et al.</i> , 1990)
Agoniste A ₁ (PIA)	ip	↓	=	↓	Éveillé	Rat adulte	(Burr & Sinclair, 1988)
Adénosine	iv	↑	-	-	Eveillé	Humain adulte	(Jonzon <i>et al.</i> , 1989)
Inhibiteur de l'adénosine déaminase (EHNA)	ic	↑	↑	↑	Eveillé	Rat adulte	(Monteiro & Ribeiro, 1989)
Inhibiteur de l'adénosine déaminase (EHNA)	ic + nerf du sinus coupé	=	=	=	Éveillé	Rat adulte	(Monteiro & Ribeiro, 1989)
Agoniste A ₁ (R-PIA)	RVLM	-	-	↓	In-vitro	Encéphale isolé du rat n-né	(Herlenius <i>et al.</i> , 1997)
Antagoniste A ₁ (DPCPX) + agoniste A ₁ (R-PIA)	RVLM	-	-	=	In-vitro	Encéphale isolé du rat n-né	(Herlenius <i>et al.</i> , 1997)
Agoniste A ₁ /A _{2A} (NECA)	NTS	=	↑	↓	Anesthésié	Rat adulte	(Barraco & Janusz, 1989).

icv, intra-cérébro-ventriculaire; ip, intra-péritonéale, im, intra-musculaire; iv, intra-veineux; ic, intra-carotidien; L-PIA, forme L du N⁶-phénylisopropyladénosine; R-PIA, forme R du N⁶-phénylisopropyladénosine; NECA, 5'-N-éthylcarboxamide adénosine; EHNA, érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine; DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; RVLM, partie rostrale de la médulla ventrolatérale.

2.2.2. La réponse ventilatoire à l'hypercapnie

L'activité respiratoire dépend fortement de la capacité du système de contrôle de la respiration à détecter des changements en oxygène, dioxyde de carbone et pH dans le sang. Durant une asphyxie, par exemple, le système détecte une élévation en CO₂ artériel et une diminution d'oxygène artériel et induit une réponse ventilatoire pour éliminer le CO₂ excédentaire, et également augmenter le contenu en oxygène. La réponse ventilatoire à l'hypercapnie met en jeu des chémorécepteurs pour le CO₂. Cependant, bien que l'on trouve des chémorécepteurs au CO₂ en périphérie au niveau des corps carotidiens, la

plupart sont situés dans le tronc cérébral et le cerveau (Ballantyne & Scheid, 2001). De nombreuses études se sont intéressées aux chémorécepteurs centraux et à la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

Mécanismes de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Il y a plus quarante ans, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie était étudiée par R. Mitchell et ses collaborateurs. Dans une première étude, ces chercheurs ont observé une augmentation de la ventilation en réponse à une augmentation de CO_2 inspiré ou une augmentation de la pCO_2 au niveau de la partie ventrale du tronc cérébral chez le chat (Mitchell *et al.*, 1963). Par la suite, d'autres chercheurs ont étudié le même phénomène chez la chèvre (Fencl *et al.*, 1966) et chez le rat (Coates *et al.*, 1993). Cet effet a été largement répliqué par la suite et les mécanismes centraux, ainsi que la localisation des chémorécepteurs (Figure 8, en rouge), ont été identifiés chez le rat (Nattie, 1999; Nattie & Li, 1996). En effet, une augmentation de la P_aCO_2 active les structures chémosensibles du tronc cérébral (Coates *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1996; Berquin *et al.*, 2000). Dans la partie ventrale du tronc cérébral, les cellules chémosensibles au CO_2 ont été localisées dans le noyau rétrotrapézoïde, RTN, (Li & Nattie, 2002; Guyenet *et al.*, 2005; Mulkey *et al.*, 2004), dans les complexes préBötzinger et Bötzing et dans les noyaux du raphé médullaire (Nattie & Li, 2001). Au niveau du raphé médullaire, les neurones chémosensibles sont sérotoninergiques et projettent vers le NTS, le préBötzc, le complexe Bötzing, les noyaux moteurs de l'hypoglosse et du nerf phrénique et le nucleus ambiguus (Richerson, 2004). Les neurones chémosensibles du raphé médullaire sont répartis proche de la surface du tronc cérébral, le long des principaux vaisseaux sanguins parcourant la surface ventrale du tronc (Bradley *et al.*, 2002) permettant une détection rapide des changements de CO_2/H^+ sanguins. Dans la partie dorsale du tronc cérébral, les neurones chémosensibles sont localisés dans le NTS (Nattie & Li, 2002), le locus coeruleus, LC, et l'area postrema, AP (Oyamada *et al.*, 1998). Ils sont également localisés au niveau des motoneurones du noyau de l'hypoglosse responsable de l'activité du muscle génioglosse (voies aériennes supérieures) (Talley *et al.*, 2000), et dans l'hypothalamus (Berquin *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2007).

Le chémorécepteur au CO_2 . Au niveau de la cellule chémoréceptrice centrale, le CO_2 n'est pas directement détecté. En effet, la cellule détecte les changements de pH

provenant de la conversion du CO_2 en bicarbonate et ions H^+ : $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \Leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Plusieurs mécanismes permettent à la cellule de détecter une diminution de pH. Le mécanisme le plus simple est le suivant. Le CO_2 diffuse dans la cellule, il produit des ions H^+ baissant ainsi le pH intracellulaire. Cette diminution de pH inhibe les canaux potassiques activés par le calcium, dépolarise la membrane, active les canaux calciques voltage-dépendant, et par conséquent augmente le Ca^{2+} cytosolique (Lahiri & Forster, 2003). L'augmentation du niveau cytosolique de Ca^{2+} provoque le relâchement des neurotransmetteurs. Ainsi, l'activation des récepteurs A_1 ou A_{2A} au niveau pré-synaptique, ayant pour conséquence d'inhiber le relâchement des neurotransmetteurs, peut potentiellement s'opposer ou exacerber l'effet du pH au niveau de la cellule chémosensible et ainsi changer le chémosensibilité de cette dernière. Cependant, cette hypothèse reste à tester.

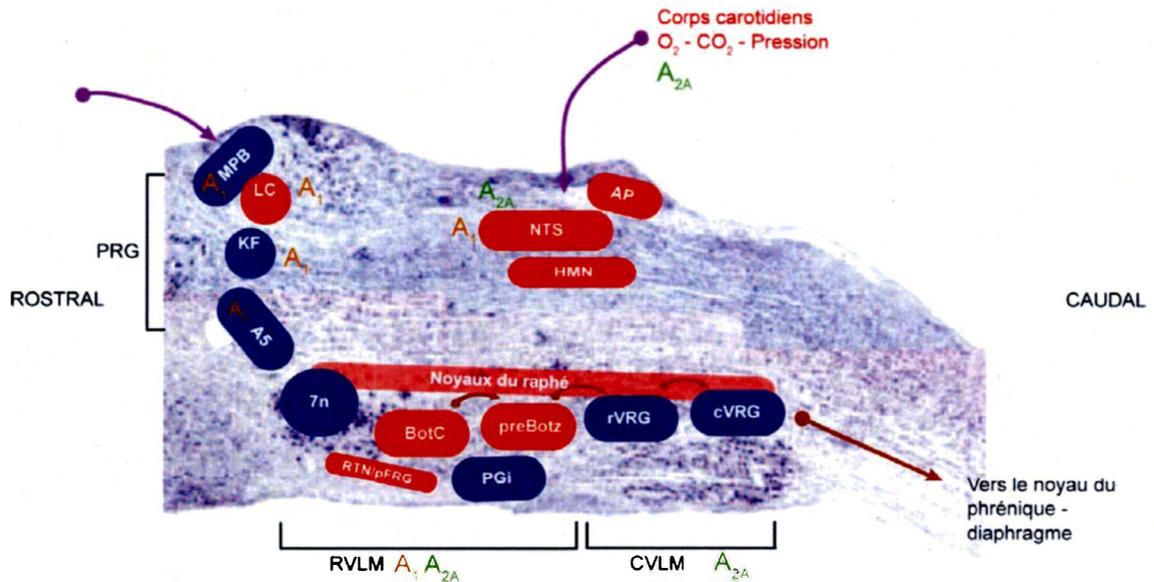


Figure 8. Distribution des chémorécepteurs au CO₂ au niveau d'une coupe sagittale du tronc cérébral du rat adulte. Les structures chémosensibles sont indiquées en rouge tandis que les autres noyaux respiratoires sont indiqués en bleu. Coupe sagittale histologique adaptée de (Guyenet, 2006). Les récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine sont indiqués respectivement en orange et en vert. Cette illustration schématique ne représente que grossièrement la distribution des noyaux respiratoires afin de mieux comprendre le rôle de ces noyaux et des récepteurs de l'adénosine. Tous les noyaux sont projetés sur le même plan pour faciliter la compréhension. NTS, nucleus tractus solitarius; LC, locus coeruleus; A5, aire A5; MPB/KF, noyau parabrachial médian et Kolliker Fuse; PGI, noyau paragigantocellulaire latéral; préBötC, complexe préBötzinger, rVRG, partie rostrale du groupe ventral respiratoire; cVGR, partie caudale du groupe respiratoire ventral; BötC, complexe Bötzinger; pFRG/RTN, noyaux parafacial et rétro-trapézoïde; 7n, noyau du nerf facial; AP, area postrema.

Le rôle des récepteurs de l'adénosine dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.
 Quelques études se sont intéressées au rôle de l'adénosine dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et sont résumées dans la Table 5. Ces études présentent des résultats

relativement différents dépendant de l'espèce, de l'état de conscience (anesthésié *versus* éveillé) et de la drogue utilisée. Par exemple, la caféine augmente la réponse ventilatoire chez l'humain, tandis que la théophylline ne la modifie pas. Ainsi, le type de drogue administrée doit être choisi avec précaution si l'on désire comprendre le rôle de ces récepteurs. Par exemple, l'injection i.p. d'un agoniste spécifique pour le récepteur A₁ de l'adénosine accentue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Burr & Sinclair, 1988). Ces résultats sont en opposition avec l'effet de la caféine sur la réponse à l'hypercapnie chez l'humain. Ces différences peuvent prendre leurs origines dans les différents profils d'expression des récepteurs de l'adénosine rencontrés chez l'humain et le rat. Également, l'utilisation d'antagoniste pour les récepteurs de l'adénosine bloque l'effet endogène de l'adénosine tandis qu'un agoniste exogène produit un effet plus prononcé dû à sa grande affinité pour les récepteurs de l'adénosine. Quoiqu'il en soit, ces études démontrent que les récepteurs de l'adénosine jouent un rôle important dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Parce que l'administration systémique des antagonistes ou agonistes rend l'interprétation des résultats difficile, le rôle de l'adénosine a été étudié au niveau des structures chémosensibles du tronc cérébral dans des études s'intéressant au contrôle de la fonction cardiovasculaire. L'injection d'un agoniste du récepteur A₁ (CPA) au niveau du NTS chez le rat anesthésié diminue le baroréflexe du rat (Scislo & O'Leary, 2005). À l'opposé, l'injection d'un agoniste des récepteurs A_{2A} (CGS 21680) au niveau du NTS facilite la transmission du baroréflexe. Une étude similaire montre que l'activation des récepteurs A₁ et A_{2A} augmente et diminue la pression artérielle, respectivement (Scislo & O'Leary, 2002).

Bien que ces études n'étudient pas les chémorécepteurs centraux spécifiquement, elle démontre que le rôle modulateur du NTS, une structure chémosensible au CO₂, peut être modifié par l'adénosine et/ou l'activation des récepteurs de l'adénosine. Au niveau du locus coeruleus (LC), une autre structure chémosensible, l'administration d'adénosine inhibe les potentiels d'action des neurones (Regenold & Illes, 1990), suggérant un rôle pour les récepteurs de l'adénosine dans cette structure. Cependant, les rôles spécifiques des récepteurs A₁ et A_{2A} n'ont pas été déterminés au niveau du LC.

En conclusion, l'influence spécifique des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine sur les structures nerveuses chémosensibles au CO_2 n'a été que partiellement étudiée. Ainsi, les connaissances actuelles sur les mécanismes adénosinergiques modulant la réponse ventilatoire à l'hypercapnie ne sont pas complètes. L'utilisation de ligands spécifiques aux deux types de récepteurs de l'adénosine administrés lors de la mesure de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie permettrait de mieux comprendre les rôles de ces récepteurs.

Table 5. Effets de l'activation ou l'inactivation des récepteurs de l'adénosine sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

Drogue	Voie	Réponse de \dot{V}_E au CO_2	Etat	Espèce	Références
Antagoniste A_1/A_{2A} Théophylline	o	=	Éveillé	Humain	(Griffiths <i>et al.</i> , 1997)
Antagoniste A_1/A_{2A} Caféine	o	↑	Éveillé	Humain	(D'Urzo <i>et al.</i> , 1990)
Agoniste A_1 (PIA)	ip	↑	Éveillé	Rat adulte intact ou chémodénervation du nerf du sinus	(Burr & Sinclair, 1988)
Agoniste A_1 (L-PIA)	icv	=	Anesthésié	Rat adulte	(Wessberg <i>et al.</i> , 1984)

o, administration orale; PIA, N^6 -phénylisopropyladénosine; ip, intra-péritonéal; icv, intra-cérébro-ventriculaire.

2.2.3. La réponse ventilatoire à l'hypoxie

La réponse ventilatoire à l'hypoxie. Lors d'une hypoxie, le système de contrôle de la respiration augmente la ventilation pulmonaire afin de répondre aux besoins en oxygène de l'organisme (Figure 9). Cette réponse à l'hypoxie est formé de plusieurs phases ventilatoires (Powell *et al.*, 1998). La phase initiale de la réponse (les premières minutes) met en jeu des chémorécepteurs à l'oxygène situés dans les corps carotidiens (CB) et est caractérisée par une augmentation relativement rapide de la ventilation. Les phases subséquentes de la réponse à l'hypoxie sont contrôlées par les corps carotidiens et par différentes structures centrales du tronc cérébral telles que le NTS ou le partie ventrale du tronc cérébral. Durant ces différentes phases, la ventilation augmente progressivement et atteint un plateau. Par la suite, la ventilation diminue progressivement. On appelle cette dernière phase la dépression ventilatoire. Cette dépression ventilatoire est très prononcée chez les nouveau-nés pour lesquels le système de contrôle de la respiration est encore immature (Bissonnette, 2000). Des cellules chémosensibles ont également été identifiées au niveau des poumons sous la forme de corps neuro-épithéliaux (Cutz & Jackson, 1999;

Youngson *et al.*, 1993). Ces cellules chémosensibles servent de senseurs rapides à l'air inspiré, de modulateurs du tonus bronchomoteur, de régulateur de la croissance des cellules épithéliales des poumons, et permettent de réguler la croissance des poumons durant la gestation. Finalement, des cellules chémosensibles sont également présentes au niveau de l'arc aortique, mais ne seront pas abordées ici car leur rôle dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie est moins important que celui des corps carotidiens (Lahiri *et al.*, 1981).

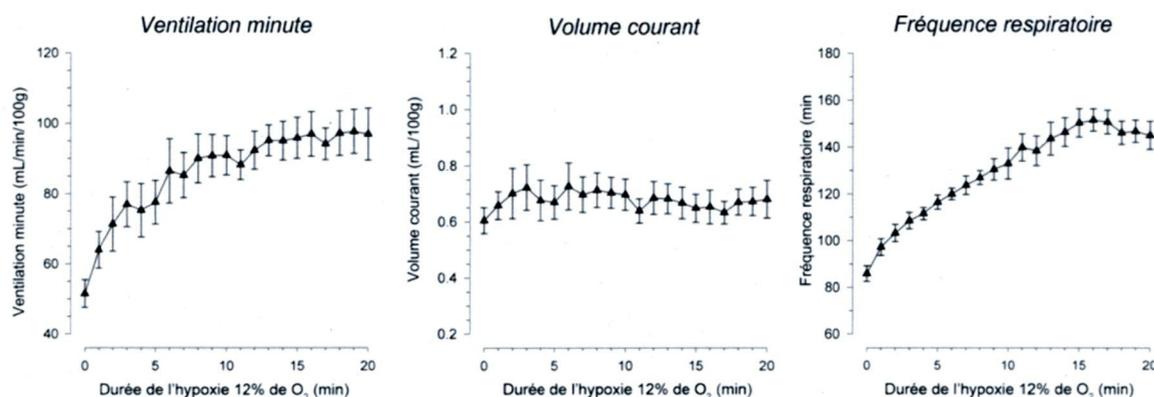


Figure 9. Réponse ventilatoire à l'hypoxie du rat mâle adulte. Mesures de la ventilation par pléthysmographie à corps entier et exposition à un mélange hypoxique de 12% d'oxygène pendant 20 minutes. Moyennes et erreur-types provenant d'un groupe de 12 rats mâles et adultes.

Les corps carotidiens (CB). Dans les sections suivantes, nous nous intéressons aux principales structures périphériques chémosensibles que sont les corps carotidiens car elles participent à la plus grande partie de la réponse ventilatoire à l'hypoxie. En effet chez les patients souffrant des cancers de la gorge ou du larynx, l'ablation de tumeurs peut entraîner une chémodénervation du nerf reliant les corps carotidiens au tronc cérébral résultant en une élimination presque totale de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Moorthy *et al.*, 1993). Chez le rat adulte, une chémodénervation chirurgicale réduit fortement la ventilation et la

réponse à l'hypoxie (Martin-Body *et al.*, 1986; Martin-Body *et al.*, 1985). Bien que d'autres structures du système nerveux sont sensibles à l'oxygène (voir paragraphe précédent), ces études montrent que les corps carotidiens sont les principaux acteurs de la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Les CB sont deux structures chémosensibles situées bilatéralement aux embranchements des carotides communes internes et externes (Figure 10). Les CB sont constitués d'une multitude de vaisseaux sanguins traversant des cellules chémosensibles (les cellules glomiques ou cellules de type I) permettant une détection précise et rapide des variations d'oxygène sanguine. Les CB sont également constitués de cellules de soutien. Les cellules glomiques sont groupées en amas de 5 à 12 cellules innervées par une ou plusieurs fibres nerveuses provenant des ganglions pétreux et projetant vers le NTS au niveau du tronc cérébral en formant le nerf du sinus carotidien et le nerf glosso-pharyngien.

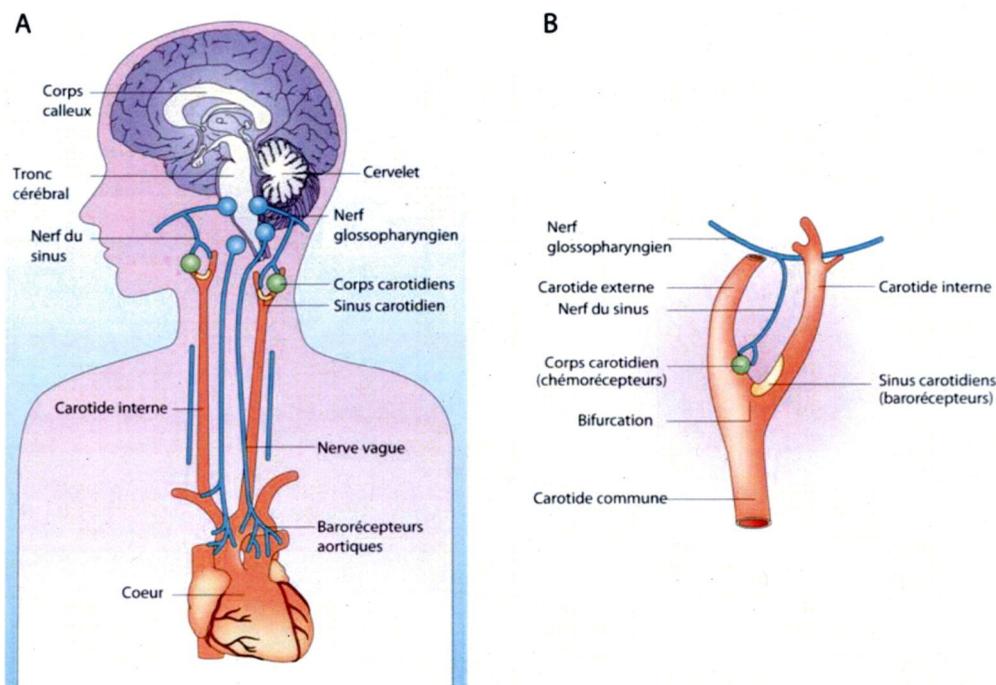


Figure 10. Schéma illustrant la disposition des corps carotidiens et les circuits responsables du chémoréflexe respiratoire à l'hypoxie chez l'homme. Le

panneau A représente les corps carotidiens situés à la bifurcation des carotides communes, le nerf du sinus carotidiens et le nerf glossopharyngien projetant au niveau du NTS (dans la partie dorsale du tronc cérébral). Le panneau B illustre la disposition des corps carotidiens au niveau de la bifurcation des carotides communes interne et externe. Illustration modifiée à partir de Sharp et Bernaudin (2004).

Fonctionnement des chémorécepteurs. Les mécanismes de chémoréception au niveau des cellules glomiques ne sont pas encore parfaitement compris malgré une littérature abondante sur le sujet. Une première théorie, appelée théorie de la membrane, propose un effet direct de l'hypoxie sur l'activité membranaire des cellules glomiques (Gonzalez *et al.*, 1994). L'hypoxie dépolarise directement la cellule glomique causant un influx de Ca^{2+} au travers des canaux calciques, permettant un relâchement de neurotransmetteurs et déclenchant un influx nerveux à travers le nerf du sinus. Des études suggèrent que la dépolarisation de la membrane par l'hypoxie est due à l'inhibition de certaines classes de courants potassiques dans les cellules glomiques (Lopez-Barneo *et al.*, 2001). Bien que l'hypothèse membranaire explique la rapidité de la réponse à l'hypoxie au niveau du corps carotidiens, elle n'explique pas la précision et la capacité du système à répondre à plusieurs niveaux d'oxygène. Ainsi, une théorie plus récente propose l'existence d'hypothétique chémosomes, structures formées de protéines hèmes et de canaux ioniques sensibles aux variations d'oxygène (Prabhakar, 2006) et permettrait de réconcilier les deux hypothèses précédentes. Les protéines hèmes confèreraient aux chémosomes une sensibilité à une large étendue de niveau d'oxygène et les canaux ioniques sensibles à l'oxygène leur permettent une réponse rapide aux variations d'oxygène.

Plusieurs neurotransmetteurs sont impliqués dans la transmission de l'information entre les cellules glomiques et les neurones du nerf du sinus. Les neurotransmetteurs conventionnels sont l'acétylcholine, la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine, les neuropeptiques comme les enképhalines, la substance P, l'ATP et les acides aminés comme le GABA. Les neurotransmetteurs non-conventionnelles (qui ne sont pas stockés dans des vésicules) sont le NO, le CO, ou encore l'adénosine. Cependant, le mécanisme par lequel

les cellules glomiques activent les neurones du nerf du sinus n'est pas encore bien compris. En effet, lors d'une hypoxie, les cellules glomiques relâchent aussi bien des neurotransmetteurs inhibiteurs (dopamine) qu'excitateurs (acétylcholine, substance P, adénosine) (Fitzgerald *et al.*, 1999; Fitzgerald *et al.*, 2006b). Plus précisément, des récepteurs muscariniques et nicotiques sont présents dans les terminaux du nerf du sinus carotidiens et dans les cellules glomiques et sont activés par l'acétylcholine lors de l'hypoxie (Shirahata *et al.*, 2007). Également, l'ATP est un agent exciteur chémosensible des corps carotidiens (Zapata, 2007). Il est important de préciser que l'adénosine est un produit de la dégradation de l'ATP libéré dans la cellule lors de l'hypoxie.

Il est important de noter que les corps carotidiens sont également sensibles aux variations de CO_2/H^+ artériel. L'augmentation du CO_2 artériel accentue la réponse ventilatoire à l'hypoxie en diminuant le pH des cellules glomiques, en augmentant le calcium intracellulaire, ou en inhibant les canaux potassiques (Lahiri & Forster, 2003). Ainsi, afin d'évaluer uniquement la réponse ventilatoire à l'hypoxie, il est nécessaire de maintenir l'animal dans des conditions isocapniques.

En résumé, lors d'une hypoxie, la cellule glomique détecte la baisse en oxygène et relâche plusieurs neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces derniers se fixent aux récepteurs post-synaptiques des neurones du nerf du sinus et un influx nerveux se propage le long des fibres projetant au niveau du NTS dans le tronc cérébral. La stimulation du NTS a pour conséquence d'accélérer le rythme respiratoire généré par les structures ventrales du bulbe rachidien qui, à leurs tours, accentuent et accélèrent l'activité du nerf phrénique commandant le diaphragme.

Rôle de l'adénosine au niveau du corps carotidiens. L'adénosine est un neuromodulateur impliqué dans le fonctionnement des corps carotidiens. Bien que les récepteurs A_{2A} de l'adénosine ait été identifiés dans les corps carotidiens du rat adulte par immunohistochimie (Gonzalez *et al.*, 1994; Conde *et al.*, 2006), Northern blot (Bairam & Carroll, 2005; Bairam *et al.*, 2006b), et RT-PCR (Kobayashi *et al.*, 2000; Bairam *et al.*, 2006b), les récepteurs A_1 de l'adénosine ont été détectés par RT-PCR uniquement (Bairam

& Carroll, 2005; Bairam *et al.*, 2006b). Ce récepteur n'est donc pas fortement exprimé dans les corps carotidiens et n'a probablement pas de rôle fonctionnel au niveau de ces structures. Le récepteur A_{2B} a également été détecté dans les corps carotidiens (Conde *et al.*, 2006), mais sa basse affinité pour l'adénosine suggère que ce type de récepteur ne joue pas de rôle important dans la neurotransmission des corps carotidiens en conditions physiologiques (Sebastiao & Ribeiro, 1996). Ainsi, le récepteur A_{2A} de l'adénosine est le principal type de récepteur de l'adénosine impliqué dans le corps carotidiens. Des études *in vitro* montrent que l'hypoxie augmente le relâchement d'adénosine endogène au niveau des corps carotidiens (Gonzalez *et al.*, 1994; Conde & Monteiro, 2004). Également, l'activation des récepteurs A_{2A} stimule le relâchement des catécholamines dans le corps carotidiens du rat *in vitro* (Conde *et al.*, 2006), augmente l'activité du nerf du sinus du chat adulte *in vitro* (Runold *et al.*, 1990), et finalement augmente la ventilation du rat anesthésié (Monteiro & Ribeiro, 1987). Ces résultats indiquent que l'adénosine possède un rôle stimulateur dans les corps carotidiens, qui contribue probablement à l'augmentation de l'activité respiratoire lors de l'hypoxie. Cette hypothèse est appuyée par le fait que, chez l'humain, l'injection systémique d'adénosine accentue la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Maxwell *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1994).

Les mécanismes responsables du relâchement des catécholamines lors de l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine ont été en partie élucidés au niveau de la cellule glomique du rat. La liaison de l'adénosine au récepteur A_{2A} au niveau pré-synaptique augmente l'AMPc et la protéine kinase A (PKA), bloque les canaux potassiques, dépolarise la membrane, ouvre les canaux calciques voltage-dépendant, augmente le Ca²⁺ intracellulaire, et provoque le relâchement des neurotransmetteurs (Gonzalez *et al.*, 1994). L'administration d'un agoniste spécifique au récepteur A_{2A} (CGS21680) augmente le calcium intracellulaire des cellules glomiques, tandis que l'antagoniste (ZM241385) inhibe cette augmentation (Xu *et al.*, 2006). Une augmentation similaire de calcium est observée lors de l'administration de forskoline (qui augmente le niveau d'AMPc stimulant ainsi l'adénylate cyclase), montrant que l'AMPc fait partie de la cascade moléculaire responsable du relâchement des neurotransmetteurs suite à l'activation du récepteur A_{2A}. En appui au rôle de la PKA, son inhibition diminue le niveau de Ca²⁺ (Xu *et al.*, 2006). L'ensemble de ces études montrent que l'adénosine en se liant aux récepteurs

A_{2A} au niveau pré-synaptique induit le relâchement des neurotransmetteurs en activant plusieurs seconds messagers tels que l'AMPC et la PKA.

Rôle de l'adénosine au niveau central. Les corps carotidiens sont les plus importantes structures chémosensibles à l'oxygène et ils projettent au niveau du NTS, une structure du tronc cérébral exprimant les récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine. Or, l'activité neuronale du NTS peut être modulée par l'adénosine et peut donc potentiellement modifier le rôle des afférences sensorielles provenant des corps carotidiens. Il a été démontré que, durant une hypoxie, une augmentation de la concentration en adénosine a lieu au niveau du NTS (Gourine *et al.*, 2002). Cependant, l'impact de cette augmentation sur la réponse ventilatoire n'est pas clair. En effet, l'injection au niveau du NTS de l'antagoniste DPCPX bloquant le récepteur A₁ n'affecte pas le chémoréflexe artériel au KCN (de Paula & Machado, 2001). Bien que le rôle des récepteurs A₁ sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie n'ait pas été spécifiquement établi, ces études suggèrent que ce type de récepteur au niveau du NTS n'est pas fortement impliqué dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Cette hypothèse reste cependant à être testée. Également, le rôle du récepteur A_{2A} au niveau du NTS dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie n'est pas élucidé. Ainsi, l'état actuel de la recherche ne donne pas de réponse claire quant aux rôles des récepteurs de l'adénosine du NTS dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie.

Rôle de l'adénosine dans la dépression ventilatoire lors de l'hypoxie. Plusieurs minutes après le début de l'hypoxie, la ventilation diminue progressivement. Cette dépression ventilatoire est d'autant plus forte chez le nouveau-né (Bissonnette, 2000). Il a été suggéré que l'adénosine joue un rôle dans cette dépression. En effet, une étude chez l'agneau a démontré que l'administration systémique d'un agoniste au récepteur A_{2A} de l'adénosine (ZM241385) élimine la dépression ventilatoire observée durant l'hypoxie (Koos *et al.*, 2005), tandis que le DPCPX, un antagoniste du récepteur A₁, n'a pas d'effet. Dans cette étude, le blocage des récepteurs de l'adénosine ne semble pas influencer la phase initiale de la réponse à l'hypoxie, un effet également observé lors de la mesure de l'activité du nerf du sinus carotidien chez le chat (Bairam *et al.*, 1997).

2.2.4. Effets à long terme de la caféine sur le contrôle nerveux de la respiration

L'ensemble des études présentées dans les sections précédentes suggère que le système adénoenergique joue un rôle important dans le contrôle de la respiration. Ainsi, une altération du système adénoenergique peut potentiellement modifier le fonctionnement du système de contrôle respiratoire. Des composés exogènes agissant sur les récepteurs de l'adénosine, tels que les agonistes ou antagonistes de l'adénosine, ont potentiellement la capacité de modifier l'expression, l'affinité, la distribution, et finalement le rôle fonctionnel des récepteurs de l'adénosine.

Effets d'une exposition chronique à la caféine durant la gestation. Plusieurs études s'intéressent aux effets de la consommation de caféine par la mère durant la gestation sur le développement du contrôle respiratoire du fœtus et du nouveau-né. L'administration de caféine durant la gestation du rat a pour conséquences d'augmenter la fréquence respiratoire mesurée à l'aide d'une préparation *in vitro* d'encéphale isolé du raton et d'accentuer la réponse de la fréquence respiratoire à l'hypoxie (Herlenius *et al.*, 2002; Bodineau *et al.*, 2003). Selon des études mesurant l'activité des neurones du tronc cérébral par immunohistochimie de la protéine Fos (indicateur de l'activité neuronale), cette modification de la fréquence respiratoire serait due à une augmentation de l'activité neuronale au niveau du DRG, plus particulièrement au niveau du noyau parabrachial médian (Saadani-Makki *et al.*, 2004). Toutefois, peu d'études s'intéressent aux conséquences à long terme de la caféine *in utero* sur le développement du système de contrôle de la respiration chez le rat. Une seule étude montre cependant que la caféine *in utero* augmente la production d'apnée chez le rat adulte (Tye *et al.*, 1993).

Bien que les études traitant des conséquences de la caféine *in utero* soient pertinentes du point de vue clinique, elles sont limitées par le modèle expérimental utilisé. En effet, la mesure de la réponse ventilatoire à l'hypoxie à l'aide d'une préparation *in vitro* dans laquelle les chémorécepteurs périphériques sont absents n'est pas représentative du comportement respiratoire de l'animal intact. Ainsi, on peut s'interroger sur les conséquences provoquées par la caféine en période néonatale sur le développement du contrôle respiratoire du rat intact.

2.3. Système cardio-vasculaire

2.3.1. Régulation de la fonction cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est en grande partie régulé par le système nerveux autonome grâce à deux systèmes complémentaires, les systèmes sympathique et parasympathique. Le contrôle nerveux du système cardiovasculaire opère principalement par des neurones du système parasympathique qui innervent le cœur, ainsi que par trois classes d'efférents sympathiques (barosensibles, thermosensibles, et glucosensibles) qui innervent les vaisseaux sanguins, le cœur, les reins et la médulla surrénale (Guyenet, 2006). Ces trois groupes d'efférents jouent des rôles dominants dans la régulation à long et à court terme de la pression artérielle. L'activité de base du système cardiovasculaire est régulée par différentes structures nerveuses (Figure 11) : la moelle épinière, la CVLM, la RVLM, contenant le noyau rétrofacial (Dampney, 1994), le NTS, le MPB et l'hypothalamus (Horiuchi *et al.*, 2006).

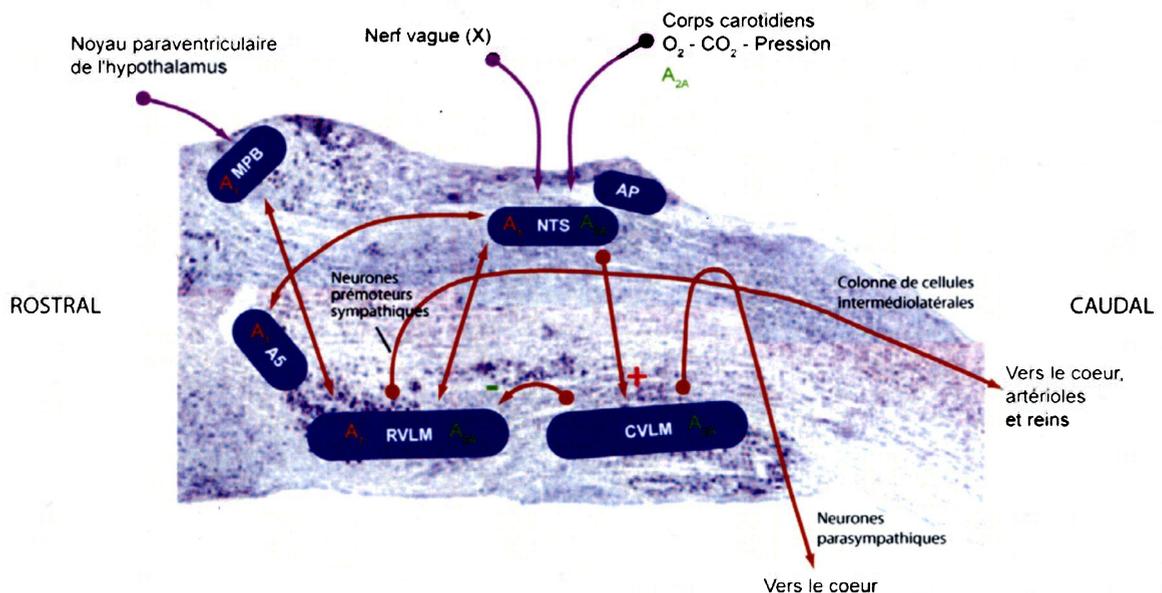


Figure 11. Représentation schématisée du système de contrôle cardio-vasculaire chez le rat. Les récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine sont indiqués

respectivement en orange et en vert. Cette illustration schématique ne représente que grossièrement la distribution des noyaux impliqués dans la régulation de la fonction cardiovasculaire afin de mieux comprendre le rôle de ces noyaux et des récepteurs de l'adénosine. Tous les noyaux sont projetés sur le même plan pour faciliter la compréhension. MPB, noyau médian parabrachial; NTS, nucleus tractus solitarius; AP, area postrema; A5, aire A5; RVLM, partie rostrale de la médulla ventrolatérale; CVLM, partie caudale de la médulla ventrolatérale. Coupe sagittale histologique adaptée de Guyenet (2006).

Régulation de la pression artérielle. La pression artérielle dépend de la résistance vasculaire et du débit cardiaque, deux variables contrôlées par le système nerveux autonome et l'interaction des structures citées précédemment. La résistance vasculaire dépend de l'activité du système sympathique qui induit au niveau des artérioles une vasoconstriction. La RVLM contrôle ce tonus vasculaire et contient la majorité des neurones pré-sympathiques qui activent les neurones sympathico-excitateurs situés dans la moelle épinière (Dampney *et al.*, 2003). Le débit cardiaque dépend de la contraction du myocarde et du rythme cardiaque; deux variables contrôlées par les systèmes sympathiques (origine au niveau de la RVLM) et parasympathiques (origine au niveau de la CVLM). Le système nerveux autonome ajuste ces différentes variables en fonction des besoins de l'organisme, du comportement, de l'environnement et des émotions (stress). Le système sympathique barosensible permet d'ajuster la pression artérielle en réponse à une augmentation de pression. Les afférences provenant des neurones sensibles à l'extension (dans les poumons) ou sensibles à une augmentation ou à une baisse de pression artérielle (récepteurs carotidiens et aortiques) inhibent l'activité du nerf sympathique par l'intermédiaire d'une structure relais le nucleus tractus solitarius.

Le NTS est le principal site intégrateur du contrôle cardiovasculaire. Il reçoit des entrées directes provenant des afférents cardio-pulmonaires (barorécepteurs artériels et chémorécepteurs périphériques) et somatiques (Guyenet, 2006). Le NTS projette vers plusieurs structures nerveuses telles que le groupe A5, les noyaux caudaux du raphé, la

RVLM et l'hypothalamus. La plupart de ces connexions sont réciproques. Le rôle du NTS est d'intégrer l'ensemble des informations provenant des barorécepteurs et des chémorécepteurs et de moduler la médulla ventrolatérale. Les structures pontiques (MPB, KF et LC) jouent également un rôle dans l'activité sympathique (Guo *et al.*, 2002). Elles reçoivent des afférences provenant de différentes structures nerveuses supérieures telles que le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus qui projette au niveau de la RVLM et qui est impliqué dans la réponse au stress (Sved *et al.*, 2002).

2.3.2. Rôle des récepteurs de l'adénosine dans la fonction cardiovasculaire

Les récepteurs de l'adénosine sont présents dans la majorité des structures impliquée dans la régulation de la fonction cardiovasculaire, y compris dans le cœur (Lasley & Smart, 2001) et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Tawfik *et al.*, 2005). La figure 11 présente la répartition générale des récepteurs de l'adénosine dans le NTS, la RVLM et la CVLM. Grâce à la distribution ubiquiste des récepteurs de l'adénosine, l'adénosine module la fonction cardiovasculaire. Cependant, l'impact de l'adénosine endogène sur la fonction cardiovasculaire n'est pas clair et dépend de plusieurs paramètres tels que l'état de conscience de l'organisme, de l'espèce animal, et du type d'expériences. Ainsi, la Table 6 permet de mieux comprendre les études s'étant intéressées au rôle de l'adénosine dans la fonction cardiovasculaire.

La pression artérielle. Chez l'animal éveillé, le récepteur A_1 agit en périphérie et diminue la pression artérielle, tandis que le récepteur A_{2A} agit au niveau central en diminuant également la pression. Pour comprendre les mécanismes par lesquels les récepteurs de l'adénosine régulent la pression artérielle, des études ont injecté de l'adénosine dans les structures impliquées dans le contrôle de la pression artérielle. Au niveau de la RVLM, par exemple, l'injection d'adénosine augmente la pression artérielle (Thomas & Spyer, 1996). Cet effet est bloqué par l'administration du 8-SPT, un antagoniste non-spécifique des récepteurs de l'adénosine. Bien que cette augmentation de la pression n'ait pas encore été élucidée, on peut supposer que c'est en se liant aux récepteurs excitateurs A_{2A} que l'adénosine stimule la RVLM et augmente la pression artérielle.

Table 6. Effets de l'activation des récepteurs de l'adénosine sur l'activité cardiovasculaire.

Drogue	Voie	Pression artérielle	Rythme cardiaque	Etat	Espèce	Références
Adénosine	iv	↑	↑	Éveillé	Humain adulte	(Biaggioni <i>et al.</i> , 1987; Biaggioni <i>et al.</i> , 1991a)
Agoniste A ₁ (CPA)	ip	↓	↓	Éveillé	Rat adulte	(Schindler <i>et al.</i> , 2005)
Agoniste A _{2A} (CGS21680)	ip	↑	↓	Éveillé	Rat adulte	(Schindler <i>et al.</i> , 2005; Dhalla <i>et al.</i> , 2006)
Agoniste A ₁ (CPA) + blocage périphérique non-spécifique	ip	-	-	Éveillé	Rat adulte	(Schindler <i>et al.</i> , 2005)
Agoniste A _{2A} (CGS21680) + blocage périphérique non-spécifique	ip	↑	↓	Éveillé	Rat adulte	(Schindler <i>et al.</i> , 2005; Dhalla <i>et al.</i> , 2006)

Au niveau du NTS, la micro-injection du CPA, un agoniste des récepteurs A₁, augmente la pression artérielle (Scislo & O'Leary, 2002). Il a été proposé que l'activation du récepteur A₁ inhibe le relâchement du glutamate au niveau des neurones du NTS provenant des barorécepteurs cardiopulmonaires et artériels (Scislo & O'Leary, 2002; Barraco *et al.*, 1991). Cette inhibition élimine alors le frein que le baroréflexe exerce sur la pression artérielle dans des conditions normales. En appui à cette hypothèse, le blocage de la neurotransmission glutamatergique par le kynurénate au niveau du NTS élimine l'augmentation de la pression artérielle provoquée par le CPA (agoniste A₁). L'effet opposé est observé lors de l'injection du CGS21680, un agoniste A_{2A}, au niveau du NTS, avec une diminution de la pression artérielle (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1996).

Le rythme cardiaque. Le contrôle du rythme cardiaque met en jeu des structures similaires mais le rythme cardiaque réagit différent à l'adénosine que la pression artérielle (Table 6). En effet, l'administration systémique d'agoniste A₁ ou A_{2A} diminue chacun le

rythme cardiaque. Au niveau du NTS, la micro-injection du CPA, un agoniste des récepteurs A_1 , diminue le rythme cardiaque (Scislo & O'Leary, 2002; Barraco *et al.*, 1991), tandis que l'injection du CGS21680, un agoniste A_{2A} au niveau du NTS, le diminue (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1996).

D'un point de vue physiologique, les rôles du NTS dans le baroréflexe et dans le chémoréflexe à hypoxie sont différents. En effet, en réponse à une augmentation de la pression artérielle (activation des barorécepteurs), le NTS doit diminuer l'activité sympathique. En réponse à une diminution en oxygène (activation des chémorécepteurs), le NTS augmente la ventilation et le rythme cardiaque. Ainsi, il n'est pas étonnant que les rôles des récepteurs de l'adénosine soient différents lorsqu'il s'agit du baroréflexe et du chémoréflexe. Ceci suggère l'existence au niveau du NTS d'au moins deux réseaux différents modulant chacun une fonction distincte. La partie rostrale du NTS est impliquée principalement dans le contrôle cardiovasculaire, tandis que la partie caudale dans le contrôle respiratoire et du rythme cardiaque (Housley *et al.*, 1987; Housley & Sinclair, 1988).

2.3.3. Effets à long terme de la caféine sur le système cardiovasculaire

Quelques études se sont intéressées aux effets d'une administration chronique de caféine sur la pression artérielle de sujets adultes. L'administration de caféine durant 24h a pour effet d'augmenter de quelques millimètres de mercure la pression artérielle chez l'humain adulte (Jee *et al.*, 1999; Noordzij *et al.*, 2005). Chez le rat, d'autres études montrent que l'administration chronique du DPSPX, un antagoniste non-spécifique des récepteurs de l'adénosine, pour une durée de 7 jours induit une hypertension pouvant persister jusqu'à plusieurs mois après le traitement (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Guimaraes & Albino-Teixeira, 1996). L'administration chronique de caféine au rat pendant 2 semaines augmente également la pression artérielle et le rythme cardiaque (White & Nguyen, 2002). Ces effets sont probablement dû à l'augmentation de l'expression des récepteurs de l'adénosine observée suite à l'administration chronique de caféine (Boulenger *et al.*, 1983). Cependant, l'utilisation de souris transgéniques dont le gène codant pour le récepteur A_1 de

l'adénosine a été supprimé montre des effets surprenants. En effet, les souris n'exprimant pas le récepteur A_1 de l'adénosine présentent également une hypertension sévère à l'âge adulte (Brown *et al.*, 2006). Ainsi, l'absence ou la surexpression du récepteur de l'adénosine semble provoquer des effets comparables. Les mécanismes mis en jeu dans cet effet chronique ne sont donc pas claires, mais ont peut-être une origine autre que le changement d'expression du récepteur de l'adénosine dans la cellule nerveuse. En effet, il est possible que la caféine altère la structure des vaisseaux sanguins, changeant ainsi la vasomotricité de ces derniers, plutôt que de modifier la commande sympathique (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Guimaraes *et al.*, 2003).

2.4. Métabolisme

Rôle des récepteurs de l'adénosine dans le métabolisme. L'adénosine est un régulateur de l'homéostasie de la cellule et résulte de la dégradation de l'ATP. Plusieurs études se sont intéressées au rôle de l'adénosine dans la régulation du métabolisme de la cellule et de l'organisme. Le rôle de l'adénosine comme régulateur de l'énergie a été évalué en mesurant la consommation de glucose dans le cerveau du rat. L'injection aigue de caféine augmente la consommation de glucose du cerveau de 15% (Nehlig *et al.*, 1984; Nehlig *et al.*, 1986). Ces résultats suggèrent que la caféine en bloquant les récepteurs de l'adénosine annule l'effet régulateur inhibiteur de cette substance dans la cellule et augmente la consommation d'énergie. Un autre indice permet d'évaluer le métabolisme chez le rat. En effet, la consommation d'énergie produit de la chaleur se traduisant par une augmentation de la température corporelle. L'activation systémique des récepteurs de l'adénosine (agoniste non-spécifique R-PIA) chez le rat diminue la température corporelle (Burr & Sinclair, 1988). A l'opposé, chez les souris dont le gène codant pour le récepteur A_1 de l'adénosine a été supprimé, la température corporelle est plus élevée que chez les souris de type sauvage (Yang *et al.*, 2007). La diminution de température lors de l'activation des récepteurs de l'adénosine chez le rat et l'élévation de température chez les souris *knockout* démontrent indirectement le rôle de l'adénosine dans la régulation de la température corporelle. Bien que la température corporelle ne soit qu'un indicateur indirect de la consommation d'énergie, ces études démontrent que l'adénosine module la production

de chaleur et donc indirectement la consommation d'énergie. Un résultat surprenant de l'étude utilisant les souris *knockout* est que cette élévation de température n'est observée que chez les femelles. Cette spécificité requiert des études complémentaires afin de comprendre les rôles des récepteurs A_1 de l'adénosine chez les femelles et les mâles. En conclusion, ces études mettent en évidence le rôle régulateur du récepteur A_1 dans plusieurs facteurs régulant le métabolisme de la cellule. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux rôles des récepteurs de l'adénosine dans la relation ventilation-métabolisme. Cette aspect se doit d'être adressé afin de comprendre le rôle de chaque récepteur dans la régulation du métabolisme du rat.

Impact d'un blocage chronique des récepteurs de l'adénosine par la caféine sur le métabolisme. L'administration chronique de caféine pendant deux semaines chez le rat adulte augmente la consommation de glucose dans le LC et les noyaux dorsaux du raphé, mais cette augmentation est moins étendue que lors d'une administration aiguë de caféine (Nehlig *et al.*, 1986). Le traitement chronique n'a pas d'impact sur la pO_2 , mais diminue légèrement la pCO_2 . L'administration de caféine pendant une longue période a des effets similaires mais moins prononcés (6 structures affectées sur un total de 62) que lors d'une administration aiguë de caféine (20 structures sur 62). Ces résultats montrent un effet de tolérance lors de la consommation chronique et répétée de caféine.

2.5. Régulation des stades d'éveil-sommeil

Le sommeil est un état physiologique, réversible, durant lequel l'activité motrice est réduite et la réactivité aux stimuli externes est diminuée. Durant le sommeil, le métabolisme et l'activité cérébrale subissent des changements importants. Par exemple, l'activité respiratoire est grandement atténuée durant le sommeil à ondes lentes. En particulier, l'activité diaphragmatique est plus régulière durant le sommeil à ondes lentes que durant l'éveil et l'activité musculaire des voies aériennes supérieures est fortement réduite. Chez l'humain, la ventilation et la réponse ventilatoire au CO_2 sont plus basses lors du sommeil à ondes lentes que lors de l'éveil (Gothe *et al.*, 1981). Chez le rat, des changements similaires sont observés, car la respiration, le rythme cardiaque et la pression

artérielle diminuent et sont plus stables durant le sommeil à ondes lentes qu'aux autres stades d'éveil-sommeil (Stephenson *et al.*, 2001; Nattie, 2001). Chez le rat toujours, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie diminue lors du sommeil (Peever & Stephenson, 1997). Durant le sommeil paradoxal, la respiration est plus prononcée et plus instable que durant le sommeil à ondes lentes et le rythme cardiaque et la pression artérielle augmentent également. Dans certaines conditions, la modulation de l'activité respiratoire durant le sommeil mène à des désordres respiratoires, tels que les apnées obstructives et centrales du sommeil (White, 2005). En effet, la diminution de l'activité inspiratoire des muscles des voies aériennes observées durant le sommeil participe à l'obstruction observées chez les patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil. D'une façon similaire, la respiration périodique ou respiration de Cheyne-Stokes est le plus souvent observée durant le sommeil (Cherniack *et al.*, 2005). Par conséquent, étant donné le rôle modulateur du sommeil dans le contrôle respiratoire, l'étude de la régulation du sommeil et de la respiration durant les stades d'éveil-sommeil est nécessaire pour déterminer précisément le phénotype respiratoire du rat; en particulier dans le contexte de l'utilisation d'une drogue agissant sur un système fortement impliqué dans la régulation du sommeil tel que le système adénoenergique.

2.5.1. Stades d'éveil-sommeil

Trois types de stades d'éveil-sommeil sont définis chez le rat (Figure 12): l'éveil, le sommeil à ondes lentes (ou sommeil calme, sommeil non-REM) et le sommeil paradoxal (ou sommeil agité, sommeil REM pour *Rapid-Eye Movement*). Durant le sommeil non-REM, l'électroencéphalogramme (EEG) mesuré à la surface du crâne est caractérisé par des ondes lentes de grandes amplitudes. À ce stade, le corps est au repos avec une absence d'activité motrice. Le sommeil REM est caractérisé par une atonie musculaire, l'activation de plusieurs régions du cerveau se traduisant par une activité EEG intense à basse amplitude, par des sursauts musculaires et des mouvements oculaires. Durant le sommeil REM, on observe des variations de rythmes respiratoire, cardiaque et de pression artérielle.

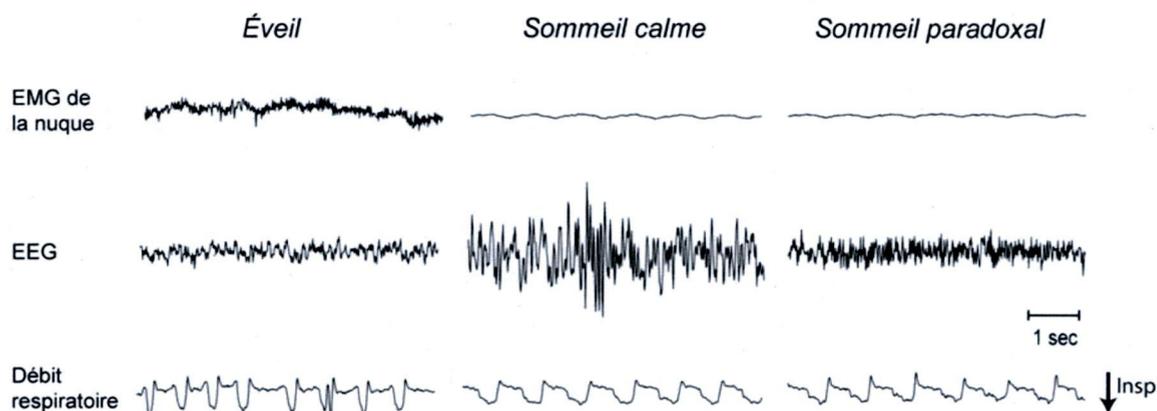


Figure 12. Électroencéphalogramme (EEG) et électromyogramme des muscles de la nuque (EMG) du rat adulte aux différents stades d'éveil-sommeil. L'éveil est caractérisé par une activité EEG avec des fréquences relativement élevées et une basse amplitude, ainsi que par une activité EMG. Le sommeil à ondes lentes présente une activité EEG avec de basses fréquences et des hautes amplitudes, et pas d'activité EMG. Le sommeil paradoxal exhibe une activité EEG de haute fréquence et basse amplitude et sans activité musculaire tonique. Les signaux proviennent d'un rat contrôle et sont mesurés par télémétrie et pléthysmographie dans notre laboratoire.

2.5.2. Structures impliquées dans la régulation des stades d'éveil-sommeil.

Moruzzi et ses collègues en 1949 furent les premiers à décrire les structures régulant le sommeil et à avoir proposé l'existence de la formation réticulaire ascendante maintenant le télencéphale, le thalamus, l'hypothalamus et le cortex éveillés (Neylan, 1995). Les études succédant à ces travaux ont défini plusieurs structures régulant les stades d'éveil-sommeil : le tronc cérébral, le télencéphale basal (BF pour *basal forebrain*), l'hypothalamus et le thalamus (Figure 13).

Tronc cérébral. La formation réticulaire du tronc cérébral ascendante permet de maintenir éveillé les structures rostrales au pont. Les structures du tronc cérébral impliquées dans la régulation du sommeil sont le locus coeruleus (LC) composé de

neurones noradrénergiques et les noyaux du raphé dorsal composés de neurones sérotoninergiques, projettent vers le télencéphale basal, le thalamus, l'hypothalamus, le néocortex, et le cervelet, et reçoivent des afférences des structures pontiques avoisinantes (Kalia, 2006). Le LC est impliqué dans la régulation des entrées sensorielles et de l'activité corticale, et également dans l'atonie musculaire observée durant le sommeil paradoxal. Parce que ces deux structures pontiques sont inactives durant le sommeil paradoxal, les neurones de cette structure sont dits neurones *REM-off* (McCarley, 2007). En effet, Jouvét et ses collègues ont démontré que lorsque le cerveau est sectionné juste au dessus du pont, l'activité observée lors du sommeil paradoxal est toujours présente au niveau du tronc cérébral mais n'est plus observée au niveau du cortex (Jouvét, 1994). À la limite rostrale du tronc cérébral, le noyau tégmental latérodorsal (LDT) et le noyau pédonculopontique (PPT) sont deux structures cholinergiques du tronc cérébral recevant des afférences sensorielles et projetant vers le thalamus, l'hypothalamus, le télencéphale basal, le LC et les noyaux dorsaux du raphé (ces projections ne sont pas indiquées dans la Figure 13). Ces deux structures sont actives durant le sommeil paradoxal et leur inhibition réduit l'incidence du sommeil paradoxal; elles contiennent donc des neurones dits *REM-on*.

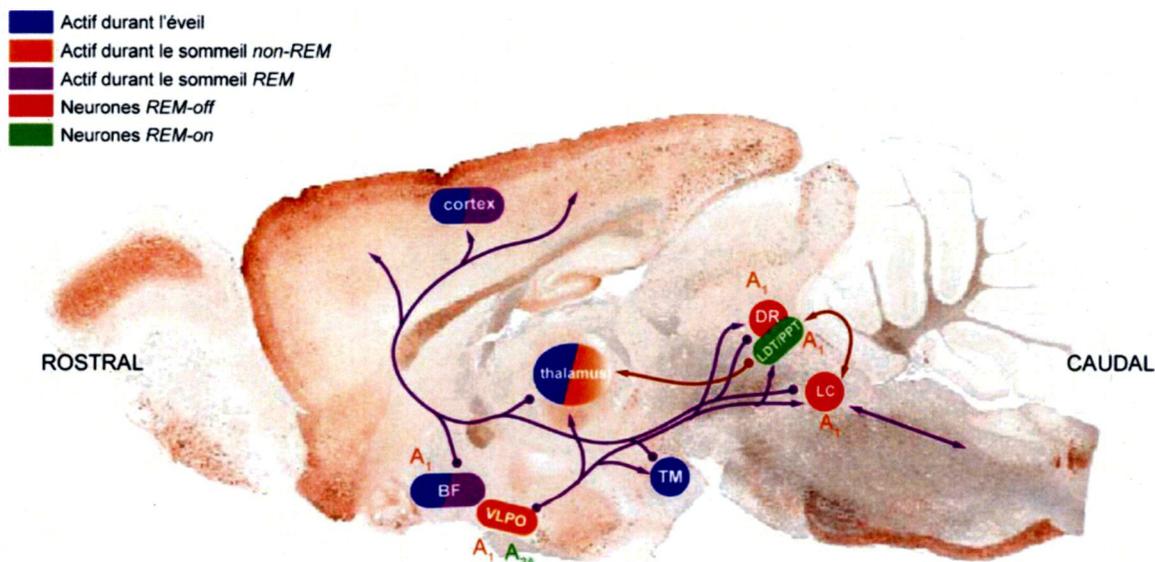


Figure 13. Schéma illustrant les principales structures impliquées dans la régulation des stades d'éveil-sommeil chez le rat. BF, télencéphale basal; LC, locus coeruleus; LDT/PPT, noyaux tégmental-latérodorsaux et pédonculopontins; TM, noyau tubéromamillaire; VLPO, aire préoptique ventro-latérale; DR, noyau dorsal du raphé.

Le télencéphale basal (BF). Cette structure composée principalement de neurones cholinergiques (mais également glutamatergiques et GABAergiques) reçoit des afférences des structures du tronc cérébral et envoie des projections vers le cortex. Comme les structures du pont, les neurones du BF sont inactifs durant le sommeil à ondes lentes, mais sont actifs lors de l'éveil et du sommeil paradoxal (Lee *et al.*, 2005). Cette structure est impliquée dans la promotion du sommeil à ondes lentes. En effet, l'accumulation d'adénosine durant la journée joue le rôle de facteur hypnogène au niveau de cette structure (voir paragraphes suivants).

L'hypothalamus. Le noyau tubéromamillaire (TM) de l'hypothalamus est l'unique structure du cerveau à contenir des neurones histaminergiques (Panula *et al.*, 1984). Cette structure reçoit des projections cholinergiques du BF et du VLPO. Le noyau TM présente une activité rythmique durant l'éveil, diminue son activité durant le sommeil et est

totallement inactif durant le sommeil paradoxal. Le VLPO est une autre structure de l'hypothalamus jouant un rôle clé dans la régulation du sommeil. Lors du sommeil à ondes lentes, cette structure est active et responsable de l'inhibition des structures de la formation réticulaire grâce à un circuit inhibiteur principalement GABA-ergique (Saper *et al.*, 2005).

Le thalamus. Le thalamus est l'entrée des afférences sensorielles pour le cortex et joue donc un rôle primordial dans la vigilance. L'excitabilité de cette structure est modulée par des afférences provenant du LDT/PPT, du LC et du raphé. Les neurones des projections thalamocorticales sont principalement glutamatergiques. Durant le sommeil à ondes lentes, les neurones sensoriels du thalamus sont inhibés par des afférences GABA-ergiques provenant du complexe réticulaire nucléaire afin d'empêcher les informations sensorielles d'atteindre le cortex. Les ondes lentes du sommeil calme proviennent principalement du thalamus.

2.5.3. Rôle de la neuromodulation adénoenergique dans la régulation sommeil

Rôle de l'adénosine. L'effet hypnogène de l'adénosine fût décrit pour la première fois en 1954 chez le chat (Feldberg & Sherwood, 1954). Par la suite, plusieurs études ont confirmé que l'administration systémique d'adénosine (Radulovacki, 1985) ou d'agonistes de l'adénosine (Radulovacki *et al.*, 1984) augmente le temps consacré au sommeil à ondes lentes chez le rat. A l'opposé, l'administration systémique de la caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, bloque les effets de l'adénosine et diminue le sommeil (Fredholm *et al.*, 1999b). La théorie fonctionnelle la plus simple quant au rôle de l'adénosine dans la régulation du sommeil est la suivante. L'adénosine est le produit de l'utilisation de l'ATP et joue le rôle de régulateur homéostatique de l'énergie au niveau du cerveau. Ainsi, une des fonctions du sommeil serait de restaurer l'énergie en diminuant l'activité des neurones du cerveau (Benington & Heller, 1995). Le rôle de l'adénosine comme régulateur du métabolisme de l'ATP est confirmé par l'observation d'une augmentation du niveau extracellulaire d'adénosine avec l'augmentation du métabolisme et de l'activité neuronale (Van Wylen *et al.*, 1986). Ainsi, l'adénosine serait un indicateur du besoin de la cellule de diminuer son activité. Les structures impliquées dans les effets de

l'adénosine sont le BF et les noyaux LDT/PPT. En effet, l'injection d'adénosine dans ces deux structures chez le chat augmente les sommeils à ondes lentes et paradoxal (Portas *et al.*, 1997). Chez le rat, l'utilisation simultanée de la microdialyse d'adénosine et de mesures électrophysiologiques montrent que l'adénosine diminue l'activité du télencéphale basal (Alam *et al.*, 1999), contribuant ainsi à l'induction du sommeil. Il est donc clair que l'adénosine est un facteur favorisant la promotion du sommeil à ondes lentes au niveau du BF et des LDT/PPT (Basheer *et al.*, 2004). Cependant, l'étude des rôles respectifs des récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine permet de mieux comprendre comment l'adénosine induit le sommeil dans ces structures.

Rôle du récepteur A₁ de l'adénosine. Chez le rat, la manipulation du récepteur A₁ de l'adénosine, de façon locale ou systémique, montre que le récepteur A₁ de l'adénosine joue un rôle spécifique dans le sommeil. L'administration systémique du CPA, un agoniste du récepteur A₁, produit une activité EEG similaire à celle observée durant le sommeil à ondes lentes du rat (Benington *et al.*, 1995). Au niveau du BF du rat adulte, la micro-injection d'adénosine inhibe l'activité neuronale et induit le sommeil, tandis que l'effet opposé est observé lorsqu'un antagoniste du récepteur A₁ (CPT) y est injecté (Strecker *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 1999). Il a été proposé que le BF induit le sommeil lorsque suffisamment d'adénosine y est accumulée durant l'éveil, activant ainsi le récepteur A₁ et inhibant l'activité de cette structure (Alam *et al.*, 1999). Au niveau du VLPO du rat adulte, l'injection du CPA, un agoniste des récepteurs A₁, inhibe les neurones actifs du sommeil et donc éveille l'animal (Methippara *et al.*, 2005), mettant en évidence un rôle opposé pour le récepteur A₁ de l'adénosine que celui observé dans le BF. Ces études montrent que l'activation des récepteurs A₁ de l'adénosine produit des effets opposés sur le sommeil. Le rôle de ces récepteurs dépend donc des structures dans lesquelles ils sont exprimés. Ces effets opposés sont illustrés par l'absence d'effet observé chez les souris knockout pour le récepteur A₁ de l'adénosine. L'absence de récepteurs A₁ dans l'ensemble de l'organisme ne modifie pas la régulation du sommeil car la privation de sommeil et l'administration d'un antagoniste pour le récepteur A₁ (8-CPT) induisent des effets similaires chez les souris KO et les souris sauvages (Stenberg *et al.*, 2003).

En conclusion, ces données suggèrent que l'activation des récepteurs A_1 de l'adénosine au niveau du BF inhibe cette structure et induit le sommeil, tandis qu'au niveau dans le VLPO (une structure active durant le sommeil), l'adénosine inhibe l'activité mais produit l'effet contraire en diminuant le sommeil. Bien que ces études montrent que l'adénosine induit généralement le sommeil au niveau de certaines structures comme le VLPO, elle peut au contraire provoquer l'éveil dans d'autres structures. Les effets opposés observés dans ces études expliquent également pourquoi les souris knockout pour le récepteur A_1 ne présentent pas de modifications dans la régulation des stades d'éveil-sommeil.

Rôle du récepteur A_{2A} de l'adénosine. Le rôle du récepteur A_{2A} de l'adénosine a également été étudié chez la souris *knockout* pour le gène codant pour ce récepteur (Urade *et al.*, 2003). L'injection d'un agoniste A_{2A} (CGS21680) dans le 4^{ème} ventricule induit le sommeil chez les souris sauvages, tandis qu'aucun effet n'est observé chez les souris KO. De façon similaire, l'injection de caféine provoque une diminution de sommeil chez les souris sauvages et les souris KO pour le récepteur A_1 , mais n'a pas d'effet chez les souris KO pour le récepteur A_{2A} (Huang *et al.*, 2005). Pour comprendre les mécanismes par lesquels le récepteur A_{2A} régule le sommeil, la micro-injection d'agonistes dans différentes structures a été réalisée chez le rat. Au niveau de l'espace subarachnoïde situé sous le télencéphale basal, l'activation du récepteur A_{2A} de l'adénosine induit le sommeil (Satoh *et al.*, 1996). En activant le récepteur A_{2A} de l'adénosine, ces derniers activent un circuit contenant des récepteurs PGD_2 de la prostaglandine qui, à leur tour, induisent le sommeil (Matsumura *et al.*, 1994). Au niveau du VLPO du rat, le CGS21680, un agoniste du récepteur A_{2A} , augmente l'activité (mesurée par Fos) de cette structure active durant le sommeil et provoque donc le sommeil (Scammell *et al.*, 2001). En utilisant des coupes d'hypothalamus de rat, cette observation est confirmée car l'activation du récepteur A_{2A} (CGS21680) excite le VLPO (Gallopín *et al.*, 2005). En conclusion, ces études montrent que l'activation des récepteurs A_{2A} de l'adénosine a un effet excitateur au niveau du VLPO ayant pour conséquence d'induire le sommeil.

2.5.4. Effets à long terme de la caféine sur la régulation éveil-sommeil

Chez le chat adulte, l'administration de caféine durant 21 jours diminue le temps consacré au sommeil (Sinton & Petitjean, 1989). Trente jours après le traitement, l'effet opposé est observé, le chat passe plus de temps à dormir. L'exposition à la caféine durant la gestation de la souris a également pour effet d'augmenter le temps consacré à dormir lorsque le souriceau a atteint l'âge adulte (Sinton *et al.*, 1981). L'augmentation des récepteurs de l'adénosine suite au traitement chronique dans des structures actives durant l'éveil pourrait expliquer cette augmentation du sommeil. Cette hypothèse reste cependant à tester. Ainsi, peu d'études s'intéressent à l'impact à long terme d'une altération de la neuromodulation adénoenergique sur la régulation des stades d'éveil-sommeil. Pourtant, sachant que la caféine, lorsqu'elle est administrée à des périodes sensibles du développement, modifie l'expression des récepteurs de l'adénosine dans plusieurs structures importantes dans la régulation du sommeil du rat adulte (Etzel & Guillet, 1994), on peut s'interroger sur l'impact à long terme de ce traitement sur le sommeil.

3. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

3.1. *Problématique de la thèse*

Le développement du système nerveux débute dès les premiers jours de gestation et continue longtemps après la naissance du nouveau-né. Durant cette maturation, le système nerveux interagit avec divers facteurs qui lui permettent peu à peu d'atteindre un état fonctionnel et mature. La plupart de ces facteurs sont positifs (facteurs trophiques) comme les hormones durant la gestation ou les stimulations sensorielles durant les premiers mois de vie. Ainsi, lors du développement normal du fœtus ou du nouveau-né, le système nerveux acquiert progressivement sa pleine maturité et ses fonctions nerveuses bénéficient du temps nécessaire et des conditions optimales pour être fonctionnelles. Par exemple, le contrôle nerveux de la respiration traverse plusieurs phases essentielles durant la gestation. En effet, le fœtus génère une respiration dite fœtale ne servant pas aux échanges gazeux pulmonaires mais plutôt à faciliter le développement pulmonaire et à mettre en place les circuits nerveux nécessaires à la respiration dès la naissance (Greer & Funk, 2005). Cependant, lors d'une naissance prématurée, le nouveau-né est forcé d'utiliser son système respiratoire même s'il n'est pas encore complètement fonctionnel. Cette immaturité du système de contrôle de la respiration résulte en la présence de désordres respiratoires, tel que les apnées du prématuré. Un des traitements utilisés pour réduire l'incidence de ces apnées est la caféine administrée à des doses relativement élevées et pendant de longues périodes. Paradoxalement, bien que ce traitement soit efficace et réduit l'apparition d'apnées délétères pour le système nerveux, il a été démontré, en utilisant un modèle de rat nouveau-né, que ce traitement altère le développement du système nerveux (Guillet & Kellogg, 1991a). En effet, l'administration de caféine du 2^{ème} au 6^{ème} jour suivant la naissance du rat nouveau-né, une période qui correspond chez l'humain approximativement aux 4 derniers mois de gestation (Clancy *et al.*, 2007), altère l'expression des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau du rat juvénile (Guillet & Kellogg, 1991a; Gaytan *et al.*, 2006)

ou adulte (Etzel & Guillet, 1994; Guillet & Kellogg, 1991a). Parce que les récepteurs de l'adénosine sont ubiquistes dans le système nerveux à partir des premiers jours de gestation chez le rat, le traitement néonatal à la caféine, lorsqu'il a lieu à des périodes critiques du développement, peut potentiellement altérer à long terme le fonctionnement du système nerveux.

Dans les chapitres précédents, nous avons montré les rôles importants des récepteurs de l'adénosine et son ligand endogène dans plusieurs fonctions du système nerveux. La neuromodulation adénoenergique module les fonctions du système nerveux autonome, comme le système de contrôle de la respiration, les réponses ventilatoires à l'hypercapnie et l'hypoxie, et le système cardio-vasculaire. Ces fonctions sont régulées par des structures du tronc cérébral qui interagissent entre elles et avec d'autres structures nerveuses et qui présentent chacune un patron particulier d'expression des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine. Le système adénoenergique joue également un rôle important dans d'autres fonctions du cerveau, en particulier la régulation du sommeil, qui modulent profondément le système nerveux autonome.

3.2. *Hypothèse de la thèse*

Le postulat de base de cette thèse est que le traitement néonatal à la caféine administré au rat nouveau-né modifie la course développementale du système adénoenergique et induit un changement permanent de ce système. **Ainsi, l'hypothèse principale de cette thèse est qu'un traitement néonatal à la caféine modifie à long terme le développement du contrôle cardio-respiratoire des rats juvéniles et/ou adultes.**

3.3. *Objectifs de la thèse*

L'objectif principal de cet ouvrage est d'évaluer l'impact d'un traitement néonatal à la caféine, similaire à celui utilisé en clinique et administré du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la

naissance du rat, sur les systèmes de contrôle de la respiration, de contrôle de la fonction cardiovasculaire, et de régulation des stades d'éveil-sommeil chez les rats juvénile et/ou adulte. Les mécanismes par lesquels le traitement néonatal à la caféine modifie ces systèmes seront également étudiés. L'effet du traitement néonatal à la caféine sera évalué chez les mâles et les femelles afin de déterminer si l'effet de la caféine est lié au sexe de l'animal.

ÉTUDE I : LONG-TERM CONSEQUENCES OF NEONATAL CAFFEINE ON VENTILATION, OCCURRENCE OF APNEAS, AND HYPERCAPNIC CHEMOREFLEX IN MALE AND FEMALE RATS.

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact du traitement néonatal à la caféine sur le contrôle respiratoire et sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie du rat éveillé. Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

- *Quelles conséquences la caféine néonatale a-t-elle sur la respiration au repos des rats juvéniles et adultes?*
- *Quelles conséquences la caféine néonatale a-t-elle sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des rats juvéniles et adultes?*
- *Les conséquences de la caféine néonatale varient-t-elles durant le développement?*
- *La caféine néonatale modifie-t-elle différemment la ventilation chez les femelles ou les mâles juvéniles et adultes?*

ÉTUDE II. DISRUPTION OF ADENOSINERGIC MODULATION OF VENTILATION AT REST AND DURING HYPERCAPNIA BY NEONATAL CAFFEINE IN YOUNG RATS: ROLE OF ADENOSINE A₁ AND A_{2A} RECEPTORS

Des antagonistes spécifiques aux récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine sont utilisés chez les rats juvéniles afin de comprendre les rôles spécifiques de ces récepteurs dans la ventilation, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, et l'apparition des apnées du rat juvénile traités à la caféine. Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

- *Quels sont les rôles des récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine dans la ventilation et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie?*
- *Quel est l'impact de la caféine néonatale sur les rôles des récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine dans la ventilation et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie?*

ÉTUDE III. INCREASED PHRENIC NERVE AND CARDIAC ACTIVITIES IN THE ADULT ANAESTHETIZED RATS TREATED WITH CAFFEINE DURING THE NEONATAL PERIOD

Dans les études précédentes, la respiration et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie sont évaluées chez l'animal éveillé. Or, dans ces conditions, l'activité cardiovasculaire et les gaz artériels sont inconnus. Ainsi, l'activité respiratoire du nerf phrénique est évaluée chez le rat adulte anesthésié à plusieurs niveaux d'hypercapnie dans des conditions où les paramètres cardiovasculaires sont mesurés et contrôlés. Les objectifs de cette étude sont :

- *Quel est l'impact de la caféine néonatale sur l'activité du nerf phrénique au repos et en hypercapnie chez le rat adulte anesthésié?*
- *La caféine néonatale affecte-t-elle l'activité cardiovasculaire chez le rat adulte anesthésié?*

ÉTUDE IV. NEONATAL CAFFEINE INDUCES SEX-SPECIFIC DEVELOPMENTAL PLASTICITY OF THE HYPOXIC RESPIRATORY CHEMOREFLEX IN ADULT RATS

Le rôle de l'adénosine dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie est principalement dû à la présence des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans les corps carotidiens, les plus importantes structures chémosensibles à l'hypoxie. Ainsi, on peut s'interroger sur les conséquences du traitement néonatal à la caféine sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie, un autre aspect important du système de contrôle de la respiration. Pour répondre à cette question, la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le rat conscient et la réponse du nerf phrénique à l'hypoxie chez le rat anesthésié sont évaluées chez le rat adulte traité à la caféine. La mesure de la réponse du nerf phrénique à l'hypoxie est réalisée en isocapnie afin de minimiser la contribution de l'hypercapnie sur la mesure de la réponse à l'hypoxie. De plus, l'expression de l'ARNm codant pour plusieurs récepteurs est déterminée dans les corps carotidiens des rats adultes traités à la caféine. Les objectifs auxquels répondent cette études sont :

- *La caféine néonatale altère-t-elle la réponse ventilatoire et la réponse du nerf phrénique à l'hypoxie chez les rats adultes conscient et anesthésié respectivement?*
- *Par quels mécanismes la caféine modifie-t-elle la réponse à l'hypoxie?*
- *Les conséquences de la caféine néonatale sont-elles spécifiques au sexe?*

ÉTUDE V. NEONATAL CAFFEINE INDUCES LONG-LASTING CHANGES ON SLEEP AND BREATHING IN FREELY-BEHAVING ADULT RATS

On a vu précédemment que la neuromodulation adénoenergique joue un rôle important dans la régulation des stades d'éveil-sommeil. De plus, le sommeil module la respiration et la majorité des troubles de la respiration se manifeste lors du sommeil. Parce que le traitement néonatal à la caféine altère le système adénoenergique dans plusieurs structures impliquées dans la régulation du sommeil, cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact du traitement sur l'architecture du sommeil et sur la respiration pour chaque stade d'éveil-sommeil, en mesurant simultanément l'activité électroencéphalographique, l'activité électromyographie, et l'activité respiratoire du rat adulte conscient. Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- *Quelle est l'influence de la caféine néonatale sur l'architecture du sommeil du rat adulte?*
- *Quel est l'impact de la caféine néonatale sur la ventilation aux différent stades d'aveil-sommeil chez le rat adulte?*

ÉTUDE I

LONG-TERM CONSEQUENCES OF NEONATAL CAFFEINE ON
VENTILATION, OCCURRENCE OF APNEAS, AND HYPERCAPNIC
CHEMOREFLEX IN MALE AND FEMALE RATS

Published in *Pediatric Research* in 2006, 59(4 Pt 1), 519-24.

Montandon Gaspard¹, Aida Bairam¹, Richard Kinkead¹

¹ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hôpital St-François d'Assise, Université
Laval, Québec.

1. RÉSUMÉ

La caféine est un antagoniste des récepteurs de l'adénosine utilisé comme stimulant respiratoire pour le traitement des apnées du prématuré. Le traitement néonatal à la caféine (NCT) induit chez le rat des effets à long terme sur l'expression et la distribution des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau. Cependant, les effets potentiels du NCT sur le développement du contrôle de la respiration sont inconnus. Afin de déterminer les effets du NCT, des rats reçoivent par gavage chaque jour du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance une dose de caféine de 15 mg/kg ou de l'eau (véhicule). Un group contrôle sans aucune manipulation a aussi été étudié. La ventilation au repos, l'apparition des apnée et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie ($F_{I\text{CO}_2}=0.05$) sont évaluées par pléthysmographie au 20^{ème} jour suivant la naissance et à l'âge adulte. À 20 jours, les variables respiratoires au repos ne sont pas affectés par le traitement. Cependant, le NCT augmentent significativement la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des rats mâles juvéniles (22%, $P=0.047$). Comparés aux rats contrôles, les rats véhicules augmentent plus fortement leur fréquence respiratoire en réponse à l'hypercapnie (11%, $P=0.037$). Chez les mâles adultes, le NCT augmente la fréquence respiratoire au repos de 15% ($P=0.004$). En réponse à l'hypercapnie, le volume courant des rats NCT augmente plus fortement que celui des rats véhicules (de 15%, $P=0.002$), tandis que la fréquence respiratoire répond moins fortement à l'hypercapnie chez ces rats (de 20%, $P=0.0006$). Chez les femelles juvéniles et adultes, aucune différence n'est observée entre les deux groupes. Chez les juvéniles des deux sexes, le groupe véhicule présente un index d'apnée de 200% plus élevé que le groupe contrôle. Ces résultats montrent que le traitement à la caféine, ainsi que la procédure de gavage, influencent le contrôle respiratoire en période néonatale et que ces effets persistent jusqu'à l'âge adulte. Les mécanismes responsables de cette plasticité développementale ne sont pas clairs, mais pourraient être dû à un changement de la modulation adénoenergique induite par le traitement néonatal à la caféine.

ABSTRACT

Caffeine is an adenosine receptor antagonist commonly used as a respiratory stimulant to treat neonatal apneas of premature newborn. Neonatal caffeine treatment (NCT) has long-term effects on adenosine receptor expression and distribution; however, the potential effects of NCT on respiratory control development are unknown. To address this issue, rat pups received orally each day from postnatal day 3 to 12, 15mg/kg of caffeine (NCT), water (vehicle), or were undisturbed during early life (control). Measurements of resting ventilation, apnea index, and ventilatory response to moderate hypercapnia ($FI_{CO_2}=0.05$) were made using whole-body plethysmography at postnatal day 20 (juvenile) and adulthood. At day 20, resting respiratory variables were not affected by the treatments. Juvenile NCT male rats showed a 22% higher minute ventilation response to hypercapnia ($P=0.047$) than vehicle rats. However, oral gavage alone increased the frequency component of the response by 11% ($P=0.037$). In adult males, caffeine increased the resting respiratory frequency by 15% ($P=0.004$). In these animals, the tidal volume response to hypercapnia was increased by 15% ($P=0.002$), whereas the frequency response was decreased by 20% ($P=0.0006$). In juvenile and adult females, no differences were observed between treatments. In juvenile rats of both sexes, gavage increased the apnea index by at least 200%. These results show that NCT and gavage influence respiratory control during early life and that these effects persist until adulthood. The underlying mechanisms are unclear, but may be related to persistent changes in adenosinergic neurotransmission because neonatal caffeine administration increases A_1 adenosine receptor density in adult rats.

2. INTRODUCTION

Periodic breathing and apnea are common in neonates, especially in preterm infants (Al-Matary *et al.*, 2004) and caffeine administration is the treatment of choice for apnea of prematurity. The effects of caffeine are mediated by adenosine A₁ and A₂ receptor inactivation to prevent the actions of endogenous adenosine. While caffeine administration in neonates can last several days, little is known about the potential long-term consequences of this treatment. In rats, neonatal caffeine treatment (NCT), administered by gavage at dosages comparable to those used therapeutically, has long-term effects on locomotor activity (Guillet, 1990) and cognitive capacities (Fisher & Guillet, 1997). These effects have been attributed to persistent changes in adenosinergic neurotransmission since chronic caffeine administration during the neonatal period increases adenosine A₁ receptor density in the CNS of adult rats (Etzel & Guillet, 1994; Guillet & Kellogg, 1991a).

In the context of respiratory regulation, many studies have investigated the possible consequences of maternal caffeine consumption during pregnancy on ventilatory control in rats; however, little attention has been directed to the persistent repercussion of caffeine treatment administered after birth in newborn rats. Caffeine administration during gestation can modify respiratory control (Bodineau *et al.*, 2003), increase the incidence of apnea in the adult animal (Tye *et al.*, 1993), or change adenosine receptors expression in several brainstem chemosensitive sites in newborn rats (Herlenius *et al.*, 2002). Nevertheless, these studies did not consider caffeine-mediated changes in dam behaviour that could stress the litter and thus impair CNS development in pups. These factors must be considered since disrupting mother-pup interactions - a stress that occurs during caffeine administration - affects respiratory control development (Kinkead *et al.*, 2005a).

Two main questions arise from this situation. Firstly, does NCT have mid- or long-term consequences on respiratory control development and on apnea occurrence? And secondly, does exposure to a stress, such as gavage and pup handling, alter respiratory control development? These questions were addressed in an animal model which is relevant to clinical situations. To assess the impact of NCT on respiratory control development,

resting ventilation and apnea incidence were measured using whole-body plethysmography in caffeine-treated (NCT group) and non-treated (gavage; vehicle group) female and male rats at different developmental stages: postnatal day 20 (juvenile) and at adulthood. Moderate hypercapnia ($FI_{CO_2}=0.05$) was used to increase arterial CO_2 levels (as it occurs during asphyxia) and to reveal modifications of the hypercapnic chemoreflex. Ventilation was also measured in unhandled (control) animals, to determine whether animal handling and gavage procedure alter respiratory control development.

3. METHODS

3.1. *Animal and housing conditions*

Experiments were performed on 76 juvenile (postnatal day 20) and 62 adult (3-4 month-old) Sprague-Dawley rats. All animals were born in our animal care facility. Dams and males were obtained from Charles Rivers Canada (St-Constant, Québec, Canada). Rats were supplied with food and water *ad libitum* and maintained in standard laboratory conditions (21°C, 12:12h dark-light cycle: lights on at 08:00 and off at 20:00). Laval University Animal Care Committee approved the experimental procedures used in this study, and the protocols were in accordance with the guidelines detailed by the Canadian Council on Animal Care.

3.2. *Mating and neonatal caffeine treatment*

Virgin females were mated and delivered 10-16 pups. No litter reduction was made because mortality (~10%) related to the gavage procedure reduced the number of pups. At the end of treatment, the mean number was 10 ± 2 pups per litter. The NCT protocol was inspired from that of Guillet (Guillet, 1990). Three days after delivery (P3), the NCT began and caffeine 15 mg/kg (using caffeine citrate, Sabex, Boucherville, QC, Canada) or water (vehicle groups) was administered daily by gavage to pups on postnatal days 3 to 12 in a volume of 0.05 mL/10g body weight. A polyethylene tubing (PE10) was gently inserted into the oesophagus up to the stomach and the appropriate volume was injected slowly over a 30 s period. This technique avoided damage that might occur with repeated i.p. injections in the pup. Mortality was due mainly to the accidental insertion of the catheter into the trachea and injection of the solution into the lung. In preliminary experiments, plasma caffeine concentrations were determined in two litters by immunoassay (EMIT Caffeine Assay, Dade Behring, Deerfield, IL, USA) at day 12, one hour after the last gavage to assess the effectiveness of the treatment. Caffeine concentrations were also determined at

postnatal day 20 to ensure that caffeine was eliminated at the time of measurements. Control groups consisted of two litters that were not disturbed during the first 14 days of life.

3.3. *Experimental groups*

Series I tested the mid-term effects of NCT on the ventilatory activity at rest and during acute exposure to moderate hypercapnia ($FI_{CO_2} = 0.05$) at postnatal day 20 (juvenile rats). *Series II* addressed the long-term effects of NCT at adulthood. Each series involved six groups: control males (juvenile, $n = 6$; adult, $n = 6$), vehicle males (juvenile, $n = 13$; adult, $n = 12$), NCT males (juvenile, $n = 17$; adult, $n = 13$), control females (juvenile, $n = 6$; adult, $n = 6$), vehicle females (juvenile, $n = 15$; adult, $n = 13$), and NCT females (juvenile, $n = 19$; adult, $n = 12$).

3.4. *Respiratory and metabolic measurements*

Measurements of breathing frequency (f_R), tidal volume (V_T), inspiratory (T_I) and expiratory (T_E) duration in unrestrained rats were obtained by whole body flow-through plethysmograph (model PLY3223, Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) according to our standard method (Genest *et al.*, 2004; Kinkead *et al.*, 2001). In juvenile rats, rectal temperature was measured before resting measurements and after hypercapnia using a thermocouple for small rodents. In adults, core body temperature was measured continuously by telemetry. Transponders (E-mitter, Mini Mitter, Bend, Oregon, USA) were surgically implanted one week before measurements. Rats were anesthetized with ketamine/xylazine (i.p. 10/50 mg/kg), the transponder was placed inside the peritoneum and was sutured behind the internal wall of the cavity. Post-surgical care consisted of three subcutaneous injections of anti-inflammatory (ketoprofen, 2 mg/kg): immediately after surgery, 24h and 48h post-op. Data obtained from adult animals compared well with results obtained in our laboratory in un-operated animals (Kinkead *et al.*, 2001) thereby indicating that surgical stress did not affect our results. Barometric pressure, flow rate, chamber temperature and humidity were also measured to express V_T in mL per 100 g of body

weight (Mortola & Frappell, 1998; Drorbaugh & Fenn , 1955). Composition of the gas mixtures flowing in and out of the chamber was analysed with an oxygen analyzer (model S-3A, Ametek, Pittsburgh, PA, USA) for subsequent calculation of oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) with an open system (Mortola & Dotta, 1992).

3.5. *Respiratory measurement protocol*

For each measurement session, rats were acclimatized to the plethysmography chamber for ~1h. Resting respiratory and metabolic measurements were made when the animal was quiet but awake and breathing room air using a data acquisition software (IOX, EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA). Acceptation/rejection of individual breaths was performed automatically by the software. Experience has showed us that the software's default values for most parameters are adequate to reject signals related to movement artefacts. However, sniffing related signals were excluded by setting the T_I rejection threshold above 120 ms. The validity of this criteria was confirmed for each animal by comparing accepted/rejected breaths while observing the rat's behaviour; the rejection threshold was adjusted if necessary. With this approach, the acceptance/rejection rate when the animal became calm and produced a steady signal was typically above 75%. A similar acceptance rate or higher was observed during hypercapnia. After 15 min of normoxic measurements, a hypercapnic gas mixture was delivered to the chamber for 20 min. In each series, animals were exposed to only one respiratory stimulus. All measurements were made between 9:00AM and 01:00PM.

3.6. *Data and statistical analysis*

“Resting” measurements of ventilatory variables were obtained using DataAnalyst software (EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA) by averaging 10 min of stable recording, whereas a 6-min average was taken for each variable from the 14th to the 20th min of hypercapnic exposure. The hypercapnic ventilatory response was expressed as a

percentage change of the hypercapnic mean relative to mean baseline values. A value of 0% signifies that there was no change due to hypercapnia, whereas a value of 100% indicates a two-fold increase relative to baseline value.

The apnea index was determined by counting the number of apneas per hour. Based on the criteria of Mendelson and colleagues (1988), an apnea was defined as an absence of flow for at least 2 normal breathing cycles. Thus, interruption of airflow had to exceed 1 sec in juveniles and 2 sec in adults to qualify as an apnea. Two types of apneic pauses were observed: spontaneous and post-sigh apneas. A spontaneous apnea was characterised by an interruption of flow, whereas a post-sigh apnea was preceded by a breath with amplitude twice the resting tidal volume.

Data were analysed using a one-way ANOVA (JMP 5.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for both sexes at each age. Responses were compared using a two-way ANOVA for repeated measures (hypercapnic stimulus \times treatment). These analyses were followed by *post hoc* tests when appropriated. However, three-way ANOVAs were used to assess treatment effects across stage groups (hypercapnic stimulus \times treatment \times age) and sex-specificity (hypercapnic stimulus \times treatment \times sex). Interaction tests were used to show sex- or age-related differences in the treatment effects (Altman & Bland, 2003). Caffeine dosages were compared by a Student t-test. Data were considered statistically different when $P < 0.05$. Data are expressed using means \pm 1 standard deviation according to the guidelines proposed by the American Physiological Society (Curran-Everett & Benos, 2004).

4. RESULTS

4.1. *Plasma caffeine concentrations*

At P12, mean plasmatic caffeine concentration was 13 ± 3 mg/L ($n = 7$) in the NCT group, whereas caffeine was not detected in vehicle group (<5 mg/L; $n = 8$). In the neonatal unit, caffeine levels measured in infants typically range between 8 and 20 mg/L. At P20, eight days after the last caffeine administration, no caffeine was detected in samples from vehicle and NCT rats ($n = 10$ for each group).

4.2. *Series I: resting ventilation in juvenile rats*

Baseline ventilatory measurements of vehicle juvenile animals (Table 7) were comparable to those reported previously for Sprague-Dawley rats of this age group (Doan *et al.*, 2004). In vehicle juvenile rats, no differences were found between males and females in all variables and no changes were observed in resting values between NCT and vehicle groups. Furthermore, NCT did not affect body weight in male and female rats.

Table 7. Effects of NCT on resting ventilatory variables of juvenile male and female rats: *Series I*.

Gender	Male			Female		
	Control (n=6)	Vehicle (n=13)	NCT (n=17)	Control (n=6)	Vehicle (n=15)	NCT (n=19)
T_I , ms	174 ± 23	184 ± 20	190 ± 23	195 ± 30	191 ± 16	187 ± 16
T_E , ms	238 ± 19	246 ± 22	248 ± 24	253 ± 21	251 ± 23	256 ± 22
\dot{V}_E (BTPS), mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹	171 ± 48	178 ± 43	182 ± 48	184 ± 45	167 ± 26	178 ± 42
V_T (BTPS), mL·100 g ⁻¹	1.15 ± 0.28	1.25 ± 0.29	1.28 ± 0.29	1.36 ± 0.39	1.21 ± 0.19	1.29 ± 0.30
f_R , min ⁻¹	149 ± 15	143 ± 14	141 ± 15	137 ± 16	139 ± 12	139 ± 10
\dot{V}_{O_2} (STPD), mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹	4.60 ± 0.68	4.31 ± 0.67	4.31 ± 0.55	4.60 ± 0.76	4.25 ± 0.72	4.44 ± 0.91

Value are expressed as means ± SD. T_I and T_E , inspiratory and expiratory duration; \dot{V}_E , minute ventilation; V_T , tidal volume; f_R , respiratory frequency; \dot{V}_{O_2} , oxygen consumption. Resting values were obtained in quiet but awake rats ≥1h after the animal acclimated to the plethysmographic chamber. STPD, Standard Temperature Pressure, Dry (0°C, 760 mmHg). BTPS, Body Temperature and Pressure, Saturated with water vapor.

4.3. *Series I: hypercapnic ventilatory response in juvenile rats*

For both sexes and conditions, hypercapnia elicited significant changes in all ventilatory variables. No differences in hypercapnic ventilatory responses were found between males and females (sex effect; $P > 0.05$ for all variables). Comparisons of ventilatory measurements between treatments and sexes are presented in Figure 14. In juvenile males, \dot{V}_E response to hypercapnia was 22% greater in NCT than in vehicle (treatment effect: $P = 0.047$), owing in part to a greater V_T response (12%, $P = 0.023$). Moreover, \dot{V}_E response was 36% greater in NCT than in control (undisturbed animals) ($P = 0.020$), owing in part to a 14% greater f_R response ($P = 0.008$). Gavage alone increased the frequency response by 11% in vehicle rats relative to controls ($P = 0.037$). Moreover, the T_E response to hypercapnia was higher in vehicle (8%) and NCT animals (8%) than in controls ($P = 0.025$ and $P = 0.018$ respectively) indicating that the gavage procedure *per se*

modified the hypercapnic ventilatory response. \dot{V}_{O_2} during hypercapnia was unchanged by NCT and gavage procedure in both sexes. In juvenile females, neither NCT nor gavage affected the hypercapnic ventilatory response.

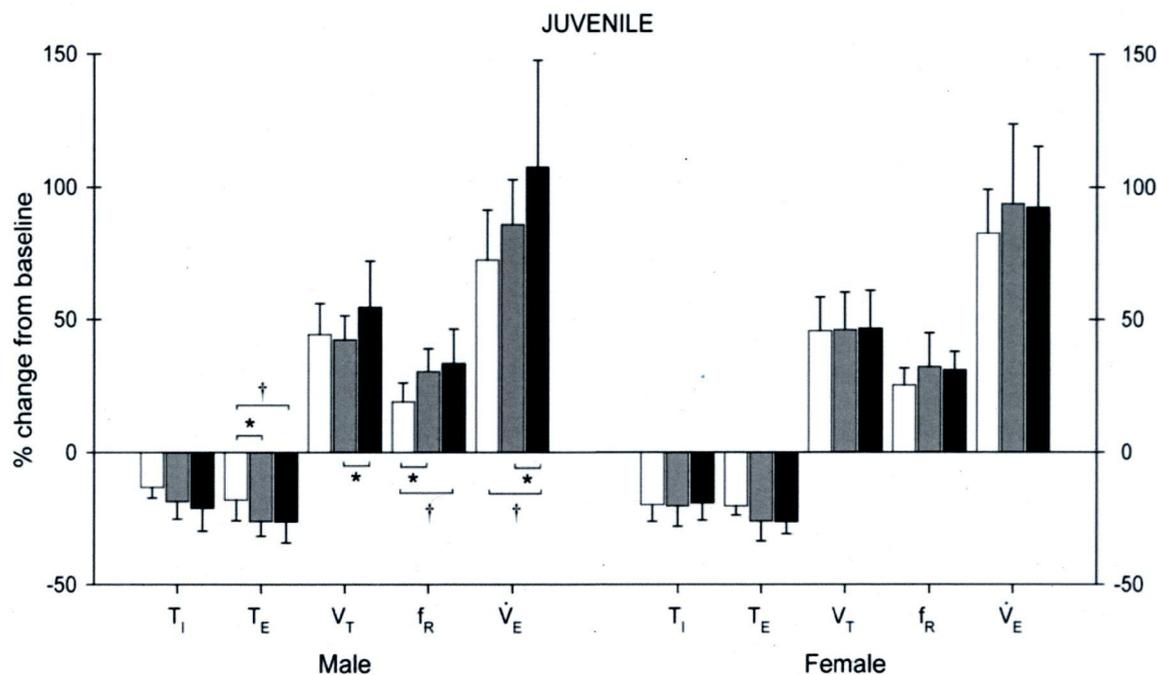


Figure 14. Comparison of the ventilatory responses to moderate hypercapnia (FI_{CO₂}=0.05) between control (white bars), vehicle (grey bars), and NCT treated rats (black bars) expressed in percentage of resting value for male ($n=6$ in control, $n=13$ in vehicle, and $n=17$ in NCT) and female ($n=6$ in control, $n=15$ in vehicle, and $n=19$ in NCT) juvenile rats. Data are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. vehicle. † $P < 0.05$ vs. control.

4.4. Series II: resting ventilation in adult rats

Baseline ventilatory measurements obtained in adult controls (Table 8) were comparable to those reported in other studies using the same rat strain (Genest *et al.*, 2004). In control animals, no differences were observed between females and males. In NCT

animals, however, V_T of females was 56% higher than in males (sex effect: $P=0.002$), whereas f_R was lower by 22% in NCT females ($P=0.0005$).

Table 8. Effects of NCT on resting ventilatory variables of adult male and female rats: *Series II*.

Treatment	Male			Female		
	Control (n=6)	Vehicle (n=12)	NCT (n=13)	Control (n=6)	Vehicle (n=13)	NCT (n=12)
T_I , ms	268 ± 29	292 ± 24	274 ± 35	250 ± 47 *	299 ± 42	300 ± 30 †
T_E , ms	430 ± 51	479 ± 66	407 ± 71 *	524 ± 125	523 ± 81	511 ± 69 ‡
\dot{V}_E (BTPS), mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹	53 ± 6	55 ± 11	55 ± 10	88 ± 27	62 ± 25	71 ± 22
V_T (BTPS), mL·100 g ⁻¹	0.60 ± 0.03	0.69 ± 0.15	0.61 ± 0.13	1.11 ± 0.47 ‡	0.82 ± 0.32	0.96 ± 0.33 ‡
f_R , min ⁻¹	88 ± 7	80 ± 8	92 ± 12 *	83 ± 20	76 ± 10	75 ± 8 ‡
\dot{V}_{O_2} (STPD), mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹	2.90 ± 0.15 *	2.42 ± 0.29	2.22 ± 0.40 †	3.50 ± 1.74	3.73 ± 0.66	3.54 ± 0.68

Value are means ± SD. T_I and T_E , inspiratory and expiratory duration; \dot{V}_E , minute ventilation; V_T , tidal volume; f_R , respiratory frequency; \dot{V}_{O_2} , oxygen consumption. Resting values were obtained in quiet but awake rats ≥1h after the animal acclimated to the plethysmographic chamber. * $P<0.05$ vs. vehicle. † $P<0.05$ vs. control. ‡ $P<0.05$ vs. male. STPD, Standard Temperature Pressure, Dry (0°C, 760 mmHg). BTPS, Body Temperature and Pressure, Saturated with water vapor.

In male rats, NCT reduced T_E by 15% (treatment effect: $P=0.011$) when compared with vehicle animals, and consequently increased f_R by 15% ($P=0.004$). However, NCT had no net effect on resting \dot{V}_E . In female rats, no differences were found between vehicle and NCT animals for these variables. In males, comparisons between control and vehicle rats indicated that the gavage procedure tended to reduce f_R by 9% ($P=0.08$), but increased \dot{V}_{O_2} by 20% ($P=0.006$, Table 8). In females, gavage procedure increased resting T_I by 20% ($P=0.017$). No influence of sex on treatment effects was observed for f_R , V_T , and \dot{V}_E (interaction tests for sex × treatment: $P=0.11$, $P=0.09$, and $P=0.94$, respectively).

4.5. *Series II: hypercapnic ventilatory response in adult rats*

Figure 15 shows that, in adult males, NCT increased V_T response by 15% (treatment effect: $P=0.002$), whereas it decreased breathing frequency response by 20% ($P=0.0006$) and T_I response by 9% ($P=0.008$). Unlike juveniles, however, no differences in the hypercapnic ventilatory response were observed between vehicle and control animals. Only a slight increase in f_R response was observed in male rats (13%, $P=0.055$). Gavage did not affect the hypercapnic ventilatory response of other variables at adulthood. Finally, NCT had no effect on the ventilatory responses of adult females. By testing the interaction between sex, treatment, and hypercapnia, NCT decreased the f_R response by $23 \pm 8\%$ in adult males, whereas a small but not significant increase was observed in females (difference between male and female = 30.36%; interaction test: $P=0.025$). For V_T and \dot{V}_E no sex-specificity was observed.

Comparing responses between juvenile and adult vehicle males revealed a 13% increase in the \dot{V}_E response during development (age effect: $P=0.046$) owing mainly to 21% increase in the f_R response ($P<0.0001$) since the V_T response decreased by 12% ($P=0.002$). In NCT male rats, no change was observed in these variables during maturation. However, age did not affect treatment influences for f_R , V_T , and \dot{V}_E for both sexes.

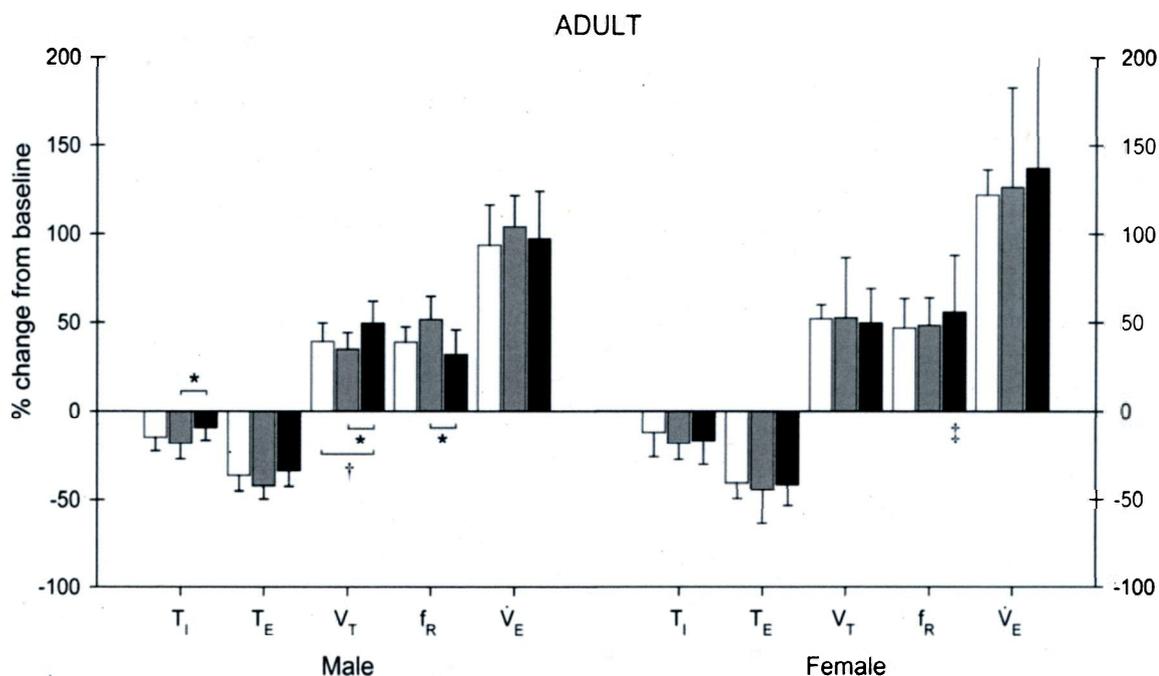


Figure 15. Comparison of the ventilatory responses to moderate hypercapnia ($FI_{CO_2}=0.05$) expressed in percentage of resting value for male ($n=6$ in control, $n=12$ in vehicle, and $n=13$ in NCT) and female ($n=6$ in control, $n=13$ in vehicle, and $n=12$ in NCT) adult rats. White (control), grey (vehicle), and black (NCT) bars shows means \pm SD. * $P<0.05$ vs. vehicle. † $P<0.05$ vs. control. ‡ $P<0.05$ vs. male.

4.6. Apnea index at rest

Spontaneous apneas were observed in all groups of rats except in control adults (Figure 16B). In vehicle and NCT rats of both sexes, the apnea index decreased strongly during maturation (age effect: $P < 0.05$ in all groups). In juvenile males, both treatments (vehicle and NCT) increased apnea index in comparison with controls (treatment effect: $P=0.047$ and $P=0.013$, respectively). In juvenile females, NCT tended to increase the apnea index; however, only the index measured in vehicle rats was statistically higher than

that of controls ($P=0.025$). These results show that gavage increased the occurrence of apneas in juvenile, whereas it had no effect on spontaneous apnea in adults.

Conversely, quantification of post-sigh apneas showed that, in males, neither age nor gavage affect the apnea index (Figure 17B). In females, however, the apnea index of adult vehicle rats was 54% less than that of juvenile rats (age effect: $P=0.0003$). Moreover, comparing vehicle to NCT in juvenile females showed that caffeine diminished the post-sigh apnea index by 38% (treatment effect: $P=0.010$).

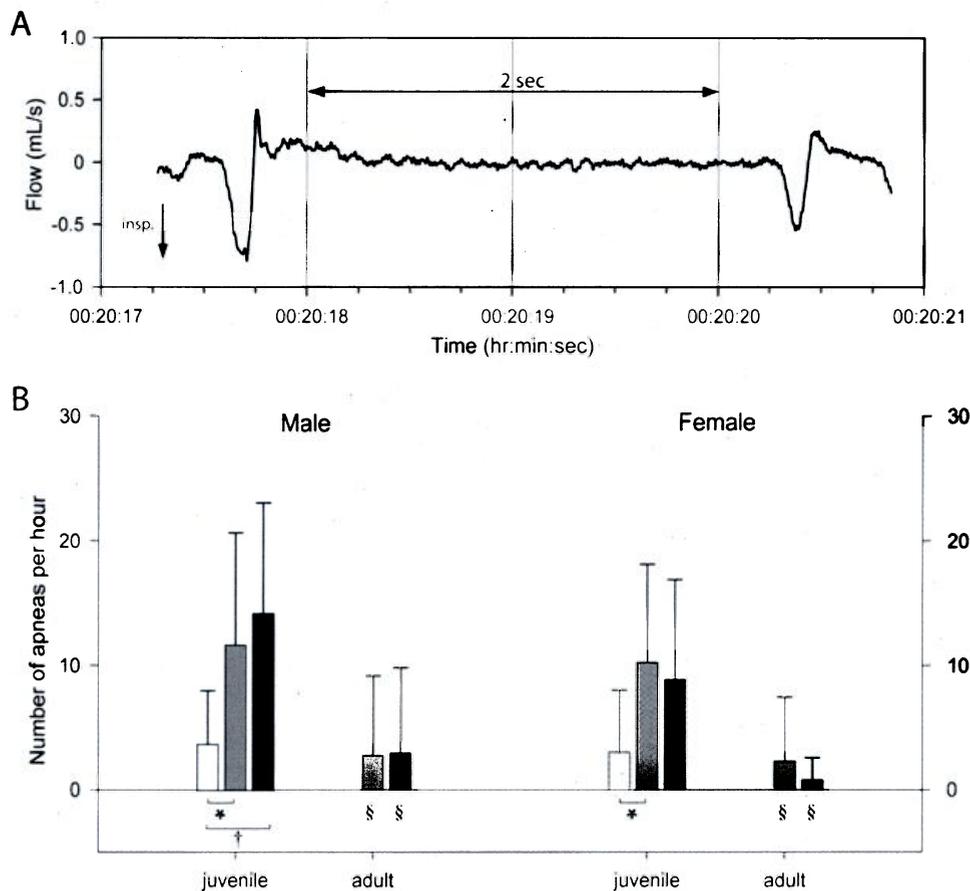


Figure 16. Incidence of spontaneous apneas at rest in juvenile (P20) and adult male and female rats. A. Sample of plethysmographic signal representing a spontaneous apnea of more than 2 sec of adult rat. Downward deflection represents inspiration. B. Mean numbers of apneas per hour of rats at rest. Recordings were made over a 30-min period. White (control), grey (vehicle),

and black (NCT) bars shows means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. vehicle. † $P < 0.05$ vs. control. § $P < 0.05$ vs. juvenile. In juvenile males: $n = 6$ in control, $n = 13$ in vehicle, and $n = 17$ in NCT. In juvenile females: $n = 6$ in control, $n = 15$ in vehicle, and $n = 19$ in NCT. In adult males, $n = 6$ in control, $n = 12$ in vehicle, and $n = 13$ in NCT. In adult females, $n = 6$ in control, $n = 13$ in vehicle, and $n = 12$ in NCT.

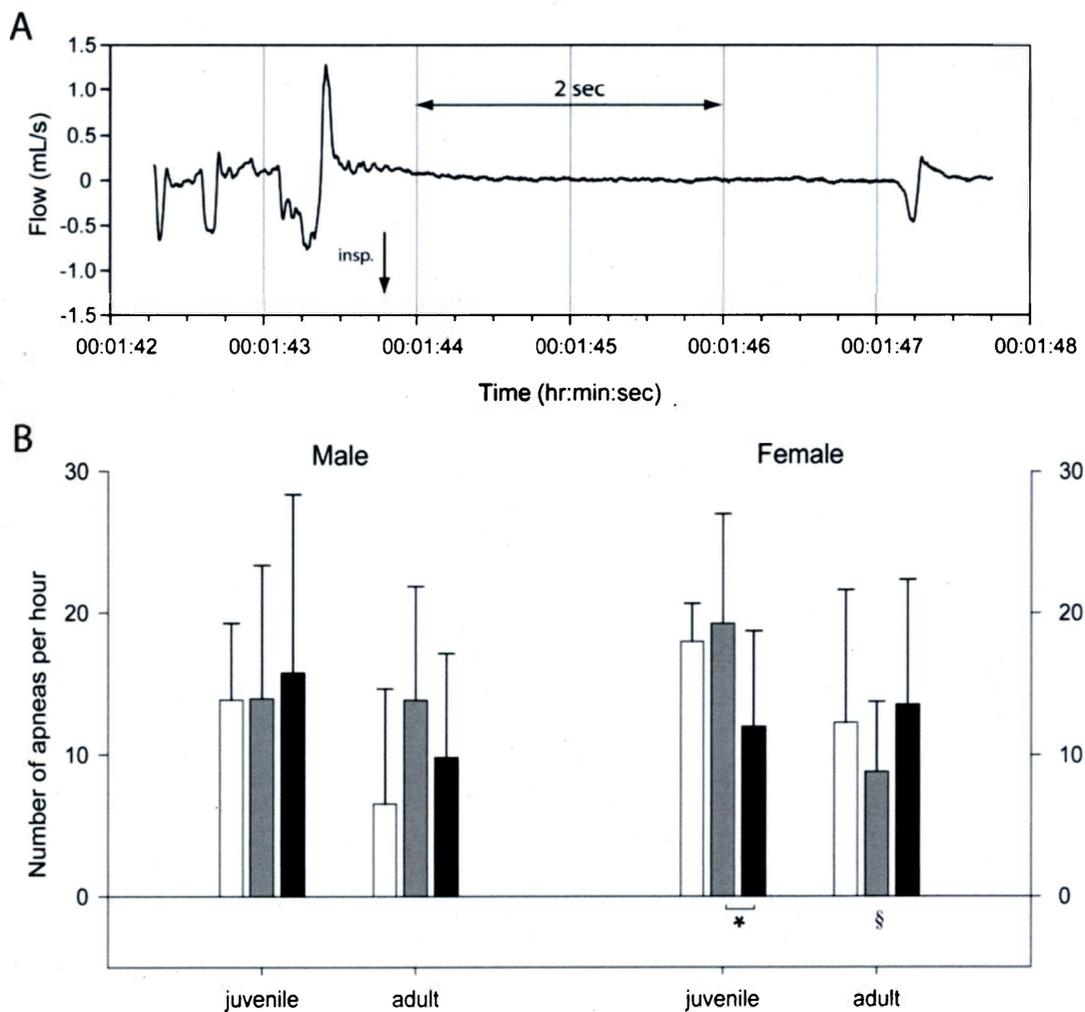


Figure 17. Incidence of post-sigh apneas at rest in juvenile (P20) and adult male and female rats. A. Sample of plethysmographic signal representing a sigh followed by an apnea of more than 2 sec of adult rat. Downward deflection represents inspiration. per hour of rats at rest. Recordings were made over a 30-

min period. B. Mean numbers of apneas per hour of rats at rest. White (control), grey (vehicle), and black (NCT) bars shows means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. vehicle. § $P < 0.05$ vs. juvenile. In juvenile males: $n=6$ in control, $n=13$ in vehicle, and $n=17$ in NCT. In juvenile females: $n=6$ in control, $n=15$ in vehicle, and $n=19$ in NCT. In adult males, $n=6$ in control, $n=12$ in vehicle, and $n=13$ in NCT. In adult females, $n=6$ in control, $n=13$ in vehicle, and $n=12$ in NCT.

5. DISCUSSION

Neonatal caffeine administration is commonly used to treat respiratory disorders in newborn, especially in pre-term infants. The use of pharmacological agents during a critical period of development is always a matter of concern given their potential impact on CNS maturation and subsequent functions. Several studies have addressed the effects of perinatal caffeine administration on CNS performance under various conditions. However, to the best of our knowledge, this study is the first to use an animal model to address the potential consequence of caffeine on CNS development in a context that (besides the accidental 10% mortality rate due to gavage) mimics the clinical situation relatively well, i.e. neonatal administration with a focus on respiratory control development. Our results suggest that NCT exerts specific effects on respiratory control in male juvenile rats which change and subside partially with maturation. Furthermore, our data show that pup manipulation and gavage alone may contribute to these effects on respiratory control, thus emphasizing the importance of performing proper sham and control experiments especially when interventions are performed during early life. While mainly descriptive in nature, this study nonetheless raises important question concerning the impact of disruptions of mother-pup interactions and caffeine administration on respiratory control, especially in juvenile animals.

5.1. *NCT-related changes in juvenile rats*

In male rats, NCT increases the magnitude of the \dot{V}_E response to hypercapnia by 22% without modifying resting ventilation. Because \dot{V}_{O_2} is not altered by caffeine, it is unlikely that these changes are related to metabolism, and suggest that NCT increases CO₂ chemosensitivity. The mechanisms responsible for this increase in chemosensitivity are unknown and our data do not allow us to determine where these effects occur (CNS *versus* carotid body). It is known, however, that *in utero* caffeine exposure increases adenosine A₁ receptor expression in the brainstem of neonatal rats (Herlenius *et al.*, 2002), and that NCT increases adenosine A₁ receptor expression in 28 day-old rats (Etzel & Guillet, 1994). It has been proposed that when caffeine occupies the adenosine receptor's binding site, the number of receptors increases to maintain the efficiency of adenosinergic systems (Boulenger *et al.*, 1983). The fact that adenosine receptor activation by the non-specific agonist phenylisopropyl adenosine enhances the hypercapnic ventilatory response of rats (Burr & Sinclair, 1988) is consistent with the hypothesis that NCT-related increase in adenosine receptor expression contributes (at least in part) to enhancement of the hypercapnic ventilatory response in male rat pups.

5.2. *NCT-related changes in adult rats*

The increase in f_R observed in NCT *versus* vehicle rats was surprising but consistent with studies showing that caffeine administration has long-term consequences on behaviour (Guillet, 1990; Fisher & Guillet, 1997) owing to changes in adenosine receptor distribution and affinity (Guillet & Kellogg, 1991b; Guillet & Kellogg, 1991a). Accordingly, long-term caffeine treatment results in dose-dependent increases in adenosine A₁ receptor agonist binding sites in the CNS of adult rats (Boulenger *et al.*, 1983; Johansson *et al.*, 1997b). However, because of the structure-specific effects of caffeine on adenosine receptors (Aden *et al.*, 2000), only specific brainstem structures may be change by caffeine administration.

The pattern of the hypercapnic ventilatory response is also modified by NCT in adult males. Several studies have examined the consequences of caffeine exposure on

respiratory activity of neonatal rats (Bodineau *et al.*, 2003; Herlenius *et al.*, 2002), and results suggest that CO₂ chemosensitivity is altered at the CNS level. If the same alterations persist throughout life, they may enhance central CO₂ sensitivity similarly in adults. However, an increase in carotid body afferent input should not be excluded since adenosine modulates CO₂ chemosensitivity in these organs (Kumar *et al.*, 2000).

5.3. *Consequences of stress related to the gavage procedure*

Despite its short duration (~ 30 sec), the gavage procedure is a form of stress that is repeatedly imposed upon the animal during a critical period of development. In addition to the physical stress and pain caused by the gavage, this procedure disrupts mother-pup interactions also as pups had to be handled (10-15 min per day) and immobilised to administrate the treatment. This causes a brief interlude in the routine of mother-pup interactions, and alters the behaviour of the mother towards its offspring (Liu *et al.*, 2000), which results in a decreased responsiveness to stress in adult offspring. In contrast, prolonged maternal separation (3 hours/day; P3 to P12) results in sex-specific (male only) increase in the hypoxic ventilatory response (Genest *et al.*, 2004; Genest *et al.*, 2007), whereas it decreased hypercapnic ventilatory response (Genest *et al.*, 2001). However, the gavage procedure, which combines both neonatal handling and short maternal separation (< 1h/day for the entire litter) increases both the hypercapnic ventilatory response and the spontaneous apnea index in juvenile male rats. Taken together, these findings suggest that the effects of the gavage procedure on ventilatory control are opposite to those observed in adult male rats previously subjected to neonatal maternal separation. The effects of neonatal handling alone (i.e. without caffeine administration) on respiratory control development has not been addressed. However, these side effects of gavage subside during the maturation as they are no longer observed in the adult, suggesting that rats can recover (at least partially) from such stress.

5.4. *Apnea index changes*

Spontaneous and post-sigh apneas are thought to originate from two distinct mechanisms: spontaneous apneas are related to a sudden cessation of the respiratory command at the CNS level, whereas post-sigh apneas are thought to be related to pulmonary stretch reflexes occurring after the sigh (Mendelson *et al.*, 1988). In the present study, gavage increased the spontaneous apnea index in juvenile males and females but not in adults. In humans, central apneas can be provoked by several factors, including a decrease in PaCO₂ below apneic threshold (Leevers *et al.*, 1994). In newborns, the eupneic threshold is very close to CO₂ apneic threshold (Khan *et al.*, 2005) and thus, minor changes in \dot{V}_E are more likely to provoke apneas. The fact that apneas were no longer observed in adults indicates that maturational changes occur until adulthood. However, this effect was not observed for post-sigh apnea for which the index remained stable during development.

5.5. *Sex-specificity*

In our results, NCT modified the hypercapnic ventilatory responses of juvenile and adult males. However, a sex-specific effect was observed in adult animals only, where NCT increased the f_R response to hypercapnia of males, but not of females. Other developmental studies suggest that consequences of neonatal maternal separation (Genest *et al.*, 2004) or caffeine treatment (Fisher & Guillet, 1997) on development are sex-specific (male only). In juvenile rats, only males were affected by treatments whereas in adults, the f_R response to hypercapnia of males and females was affected by NCT in an opposite manner. While sex-specific effects are often observed in developmental studies, the underlying neuroendocrine mechanisms are not fully understood but may be related to the effects of sex steroids such as testosterone and oestrogens. Furthermore, in adult females, steroid hormones may have a protective effect against stress and treatment, since NCT does not alter the hypercapnic ventilatory response.

5.6. *Perspectives*

In summary, our results suggest that NCT exerts specific effects on respiratory control in juvenile male rats which seem to change but persist with maturation. Our data show that pup manipulation and gavage contribute to alter respiratory control development thus emphasizing the importance of completing proper sham and control experiments especially when interventions are performed during early life. While it is difficult to accurately translate developmental sequences across species, data suggest that at birth the CNS of a rat is immature and may compare with that of a premature baby (Clancy *et al.*, 2001; Clancy *et al.*, 2007). With that in mind, the demonstration that NCT increases the hypercapnic ventilatory response and the apnea index is intriguing since in humans, enhanced sensitivity to CO₂ may predispose some patients with heart failure to the development of central sleep apnea (Javaheri, 1999). Such enhanced responsiveness to hypercapnic stress might be taken seriously in young infant, especially during sleep, for which an increased sensitivity to hypercapnia could predispose to respiratory disorders.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Supported by Foundation for the Research into Children's Disease, Canada Research Chair in Respiratory Neurobiology, and Canadian Institutes of Health Research.

The authors acknowledge the support of Dr. R. Gulemetova and the excellent work of Evelyne Vachon and Sylvie Viger (animal care specialists) with the gavage procedures and maintenance of our animal colony.

ÉTUDE II

DISRUPTION OF ADENOSINERGIC MODULATION OF VENTILATION
AT REST AND DURING HYPERCAPNIA BY NEONATAL CAFFEINE IN
YOUNG RATS: ROLE OF ADENOSINE A₁ AND A_{2A} RECEPTORS

**Published in *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative, and Comp
Physiology*, 2007, 292(4), R1621-31.**

Montandon Gaspard¹, Richard Kinkead¹, Aida Bairam¹

¹ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hôpital St-François d'Assise, Université
Laval, Québec.

1. RÉSUMÉ

La caféine est utilisée en clinique pour traiter les désordres respiratoires liés à la prématurité. Cependant, le rôle de la neuromodulation adénoenergique et l'effet potentiel à long terme du traitement néonatal à la caféine (NCT) sur le contrôle de la respiration sont encore peu compris. Pour répondre à ces questions, nous avons testé les hypothèses suivantes : 1) l'injection systémique des antagonistes récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine module l'activité respiratoire au repos et en hypercapnie; 2) Le NCT présente des effets à long terme sur la neuromodulation adénoenergique du contrôle respiratoire. Les rats nouveau-nés ont reçu chaque jour du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance de la caféine par gavage (15 mg/kg) ou de l'eau (groupe contrôle). A l'âge de 20 jours, les rats juvéniles reçoivent une injection i.p. d'une solution véhicule, de DPCPX (antagoniste du récepteur A_1 de l'adénosine, 4 mg/kg) ou de ZM241385 (antagoniste du récepteur A_{2A} , 1 mg/kg) avant les mesures ventilatoires par pléthysmographie au repos et en hypercapnie (5% de CO_2). Chez les rats contrôles, nos résultats montrent que l'antagoniste du A_{2A} , mais pas celui du A_1 , diminue de 31% la ventilation au repos ($P=0.003$). L'antagoniste du A_1 augmente cependant la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de 60% ($P<0.001$), tandis que l'antagoniste du A_{2A} l'augmente seulement de 42% ($P=0.033$). Chez les rats NCT, l'antagoniste A_1 augmente la ventilation au repos de 27% ($P=0.02$) et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est diminuée en comparaison des contrôles. L'antagoniste A_1 augmente l'apparition des apnées spontanées chez les rats NCT seulement ($P=0.005$). L'antagoniste A_{2A} injecté chez les rats NCT n'a pas d'effet sur la ventilation. Ces résultats montrent que l'hypercapnie active des circuits adénoenergiques qui atténuent la réponse au CO_2 par l'intermédiaire des récepteurs A_1 de l'adénosine. Ainsi, le traitement à la caféine induit une plasticité développementale de la neuromodulation adénoenergique en modifiant la sensibilité de la ventilation aux antagonistes des récepteurs de l'adénosine.

ABSTRACT

Caffeine is commonly used to treat respiratory instabilities related to prematurity. However, the role of adenosinergic modulation and the potential long term effect of neonatal caffeine treatment (NCT) on respiratory control are poorly understood. To address these shortcomings, we tested the following hypotheses: 1) Adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonists modulate respiratory activity at rest and during hypercapnia; 2) NCT has long term consequences on adenosinergic modulation of respiratory control. Rat pups received by gavage either caffeine (15 mg/kg) or water (control) once a day from postnatal days 3-12. At day 20, rats received ip injection with vehicle, DPCPX (A_1 antagonist, 4 mg/kg), or ZM241385 (A_{2A} antagonist, 1 mg/kg) prior to plethysmographic measurements of resting ventilation, hypercapnic ventilatory response (5% CO_2), and occurrence of apneas in freely-behaving rats. In controls, data show that A_{2A} , but not A_1 , antagonist decreased resting ventilation by 31% ($P=0.003$). A_1 antagonist increased the hypercapnic response by 60% ($P<0.001$), whereas A_{2A} antagonist increased the hypercapnic response by 42% ($P=0.033$). In NCT rats, A_1 antagonist increased resting ventilation by 27% ($P=0.02$), but the increase of the hypercapnic response was blunted in comparison with controls. A_1 antagonist enhanced the occurrence of spontaneous apneas in NCT rats only ($P=0.005$). Finally, A_{2A} antagonist injected in NCT rats had no effect on ventilation. These data show that hypercapnia activates adenosinergic pathways which attenuate responsiveness (and/or sensitivity) to CO_2 via A_1 receptors. NCT elicits developmental plasticity of adenosinergic modulation, since neonatal caffeine persistently decreases ventilatory sensitivity to adenosine blockers.

2. INTRODUCTION

At birth, the respiratory control system of mammals is immature and respiratory instabilities, such as apneas, are frequently observed (Al-Matary *et al.*, 2004; Martin & Abu-Shaweesh, 2005). Caffeine, an adenosine receptor blocker, is commonly used as a respiratory stimulant in infants born prematurely to treat respiratory instabilities. However, the use of caffeine during a critical period of development is always a matter of concern given the potential impact on CNS maturation and respiratory functions (Finer *et al.*, 2006). *In utero* chronic caffeine administration induced changes in respiratory activity (Bodineau *et al.*, 2003; Herlenius *et al.*, 2002) and in Fos expression in brainstem respiratory nuclei of newborn rats (Bodineau *et al.*, 2003). Exposure to caffeine during the early postnatal period enhanced the ventilatory response to hypercapnia in 20 day-old young male rats (Montandon *et al.*, 2006a) and modified the distribution of adenosine A₁ receptors in respiratory nuclei of the newborn rat brainstem (Gaytan *et al.*, 2006). Young rats showed the largest sensitivity to neonatal caffeine treatment (NCT) and from a developmental stand point it has been proposed that this age group is comparable to infants (Clancy *et al.*, 2001) for which respiratory instabilities, such as apneas (Marcus, 2001), can be observed.

Adenosine A₁ and A_{2A} receptors modulate ventilatory control in newborn or fetal sheep (Koos *et al.*, 2001; Koos *et al.*, 2005). Adenosine A₁ receptors modulated breathing during normoxia in fetal sheep (Koos *et al.*, 2001), whereas adenosine A_{2A} receptors regulate ventilation at the level of arterial peripheral carotid body in fetal sheep (Koos & Chau, 1998) and adenosine A_{2A} receptor antagonist reversed the hypoxic ventilatory decline in newborn lambs (Koos *et al.*, 2005). However, the roles of adenosine A₁ and A_{2A} receptors on ventilation at rest and on the ventilatory response to hypercapnia are not fully understood in young rats. With that in mind, we first administered specific adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists to identify the specific roles of these receptors on ventilation at rest, during acute exposure to hypercapnia (as it occurs during asphyxia), and on the occurrence of apneas in freely-behaving male young rats (20 days-old).

Caffeine has different affinities for adenosine A₁ or A_{2A} receptors (Fredholm *et al.*, 1999a) and selective activation of each receptor subtype has different functional effects (Halldner *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Karcz-Kubicha *et al.*, 2003; Koos *et al.*, 2001). Furthermore, adenosine A₁ and A_{2A} receptors are differently distributed; A₁ receptors are widely spread in the nervous system (Rivkees, 1995; Rivkees *et al.*, 1995), whereas A_{2A} receptors are restricted to the striatum, the nucleus accumbens (Rosin *et al.*, 1998), the carotid bodies (Sebastiao & Ribeiro, 1996), and several distinct brainstem nuclei (Rosin *et al.*, 1998; Zaidi *et al.*, 2006). Based upon these observations, the second aim of this study was to test the hypothesis that NCT persistently and distinctly modifies the effect that each adenosine receptor subtype exerts on ventilatory activity at rest and during acute hypercapnic exposure.

Our results show that, in control rats, adenosine A₁ receptor inactivation increased the hypercapnic ventilatory response, indicating a role for adenosine A₁ receptors on CO₂ chemosensitivity. However, adenosine A_{2A} receptors inactivation had a small effect on the hypercapnic response, but decreased resting minute ventilation. Caffeine exposure during early life elicits significant plasticity of adenosinergic modulation of the respiratory control system, because NCT decreased the effect of A₁ antagonist and increased the occurrence of spontaneous apneas when adenosine A₁ receptors are inactivated by a specific antagonist. Finally, NCT blunted the decrease of ventilation due to A_{2A} receptor antagonist observed in control rats.

3. METHODS

3.1. *Animal and housing conditions*

The study was performed on 75 young (postnatal day 20) Sprague-Dawley rats. All rats were born in our animal care facility. Dams and males were obtained from Charles Rivers Canada (St-Constant, QC, Canada). Rats were supplied with food and water *ad libitum* and maintained in standard laboratory conditions (21°C, 12:12h dark-light cycle: lights on at 08:00 and off at 20:00). Laval University Animal Care Committee approved the experimental procedures and all protocols were in accordance with the guidelines detailed by the Canadian Council on Animal Care.

3.2. *Mating and neonatal caffeine treatment (NCT)*

On average, dams delivered 10 ± 2 pups. Although only males were used in this study, the litter size was kept constant (whenever possible) at 12 pups by keeping females. There were 6 ± 2 male pups in each litter. Administration of caffeine was performed according to our protocol described previously (Montandon *et al.*, 2006a). Briefly, caffeine was administered by gavage each day from postnatal days 3 to 12 at $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (given as caffeine citrate, Sabex, Boucherville, QC, Canada) in a volume of $0.05 \text{ ml} \cdot 10\text{g}^{-1}$ of body weight. The control group was subjected to the same treatment but received the same volume of water. This caffeine dose results in a plasmatic caffeine level of $13 \pm 3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Montandon *et al.*, 2006a) which is comparable to the level achieved in the clinic when caffeine is administered therapeutically to newborns (Bairam *et al.*, 1987; Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003).

3.3. *Adenosine receptor antagonists*

The specific adenosine A₁ receptor antagonist, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (4 mg kg⁻¹, DPCPX, Tocris, Ballwin, MO, USA) or adenosine A_{2A} receptor antagonist, 4-(2-[7-amino-2-(Palmer *et al.*, 1995)triazolo-{2,3-a}{1, 3, 5}triazin-5-yl-amino] ethyl)-phenol (1 mg · kg⁻¹, ZM241385, Tocris) were used according to protocols and doses in other studies on rats (El Yacoubi *et al.*, 2000; Prediger & Takahashi, 2005). Each drug was freshly prepared on the day of the experiment: it was first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), then a solution of polyether of castor oil and ethylene oxide (Cremophor EL, Sigma) was added to prevent drug precipitation. Before administration, each drug was diluted with saline to a final concentration of 5% DMSO and 5% Cremophor EL and given intra-peritoneally in a volume of 0.5 ml · 100g⁻¹ of body weight.

3.4. *Experimental groups*

Two groups were used in this study: one received water (control) and the other received caffeine (NCT) from postnatal day 3 to 12. Each group was divided into 3 subgroups: vehicle, A₁ antagonist (DPCPX), and A_{2A} antagonist (ZM241385). Vehicle solution was made of 5% of DMSO and 5% of Cremophor EL in saline. Vehicle subgroups in both control and NCT animals were used to ensure that vehicle and stress due to injections had no effect on respiratory measurements. Ventilatory activity was measured at 20 days of age (young rats) for each subgroup.

3.5. *Respiratory and metabolic measurements*

Respiratory assessments. Measurements of breathing frequency (f_R), tidal volume (V_T), and inspiratory duration (T_I) in unrestrained rats were obtained by whole body, flow-through plethysmography (model PLY3223, Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) as previously described in details (Montandon *et al.*, 2006a; Kinkead *et al.*, 2001). An apnea

was identified according to previous criteria which defines apnea as an absence of flow for a duration of 2 normal breathing cycles (Mendelson *et al.*, 1988) which corresponds to an interruption of at least 1 s in young rats (Montandon *et al.*, 2006a). Two types of apneic pauses were collected: spontaneous and post-sigh apneas. The spontaneous apnea was identified when an interruption of flow suddenly occurred during inspiration, whereas the post-sigh apnea was identified as an interruption of flow preceded by a breath with an amplitude that exceeded 2x resting V_T (Montandon *et al.*, 2006a). Rectal temperature was measured twice during experiments: at the beginning of resting measurements and at the end of hypercapnia. Barometric pressure, chamber temperature, humidity, and body temperature were used to express V_T in mL (Body Temperature Pressure Saturated, BTPS) per 100 g of body weight according to standard equations (Drorbaugh & Fenn, 1955; Mortola & Frappell, 1998). Because no differences of rectal temperature were observed between rest and hypercapnia, we used rectal temperature measured at the end of hypercapnia to correct V_T during hypercapnia. Minute ventilation (\dot{V}_E) was defined as the product of V_T and f_R .

Metabolic assessments. O_2 and CO_2 levels of the gas mixture flowing in and out of the chamber were measured using an oxygen analyzer (model S-3A, Ametek, Pittsburgh, PA, USA) and a carbon dioxide analyzer (model CD-3A, Ametek). These values were used to calculate oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) and carbon dioxide production (\dot{V}_{CO_2}) according to the Fick principle, $([O_2]_{IN} - [O_2]_{OUT}) \times Flow$ and $([CO_2]_{OUT} - [CO_2]_{IN}) \times Flow$, respectively, that is commonly used in an open-system (Mortola & Dotta, 1992).

3.6. *Respiratory protocol*

Each rat was introduced into the plethysmographic chamber about 30 min before recordings for acclimation. Resting ventilatory and metabolic measurements were made when the rat was quiet but awake and breathing room air using a data acquisition software (IOX, EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA). After 5 min of normoxic normocapnic measurements (rest), a hypercapnic gas mixture ($FI_{CO_2}=0.05$; $FI_{O_2}=0.20$) was

delivered to the chamber for 20 min. Hypercapnia at 5% of CO₂ was reached inside the chamber 5 min after starting delivering gas mixture. Each experiment was performed between 9:00AM and 01:00PM, then the rat was sacrificed by CO₂ asphyxia followed by decapitation according to standard procedures. Breaths were detected by the data acquisition software and acceptance/rejection of individual breaths was performed automatically. Software's default values for ventilatory parameters are usually adequate to reject signals related to movement artefacts. However, sniffing related signals were excluded by setting the T_I rejection threshold above 0.12 s (Montandon *et al.*, 2006a).

3.7. *Data and statistical analyses*

Average values of ventilatory variables were obtained on a min by min basis using DataAnalyst software (EMKA). We calculated the mean values of 5 consecutive minutes at rest (Figure 18). Also at rest, individual data are presented to assess homogeneity of breath distribution amongst rats (Figure 19). Group data (n=12, 5 min of resting breathing) of breath duration (0.2-0.7 s) versus V_T (0-3 ml · 100g⁻¹) are presented for approximately 2000 breaths for each group. Individual breaths are converted into a two-dimensional histogram (bin width, 0.02 s and 0.05 ml · 100g⁻¹) and plotted as density maps for each group and each drug. Colours represent the relative number of breath in a given bin as percentages of breaths in the maximum bin. Flattened comparisons of all bins with densities >40% are presented also. This representation, inspired by a previous study (Gray *et al.*, 2001), allows to distinguish individual distribution of breaths for each group, an information not given by the mean.

The ventilatory response to hypercapnia for selected variables was expressed as a percentage change of hypercapnic value relative to resting average. A value of 0% signifies that there was no change due to hypercapnia, whereas a value of 100% indicates a two-fold increase compared to resting value. A 4-min average was taken every 4 min of hypercapnic exposure up to 20 min to express the time course of hypercapnic ventilatory response. Finally, mean apnea indexes of spontaneous and post-sigh apneas were counted visually at

rest according to the criteria described previously and were expressed as number of apnea per 10 min.

To test if antagonists have a significant influence on resting ventilatory values, hypercapnic ventilatory responses, or apnea indexes, we used a one-way ANOVA (fixed factor: antagonist; JMP 5.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for control or NCT animals (P -values of ANOVA are presented in the text). Dunnett's test was used as a post hoc test to compare the mean of each antagonist with the mean of the vehicle group. To determine if caffeine treatment has an effect on resting ventilatory values, hypercapnic ventilatory responses, or apnea indexes for each antagonist, we used one-way ANOVA with caffeine treatment as a fixed factor. Finally, to test if caffeine treatment has an effect on antagonist influence, we used two-way ANOVA (the fixed factors were antagonists and treatments) followed by post hoc analysis with least-significant means differences Student's t -tests (JMP 5.1). This allowed us to determine if there was an interaction between caffeine treatment and the influence of adenosine antagonists. Data were considered statistically different when $P < 0.05$ and were expressed using means \pm S.E.

4. RESULTS

4.1. Ventilation at rest

Inactivation of adenosine A_{2A} , but not A_1 , receptors decreases \dot{V}_E at rest in control rat

The A_1 antagonist did not change \dot{V}_E as compared to vehicle (Table 9), but decreased T_I by 13% ($P=0.03$, Figure 18). However, A_{2A} antagonist decreased resting \dot{V}_E by 31% ($P=0.003$) compared to vehicle rats (Table 9). This decrease was due to a 10% lower f_R ($P=0.0006$, Figure 18) and 24% lower V_T ($P=0.02$, Figure 18). A_1 antagonist had no significant effect on oxygen consumption and carbon dioxide production, even though body temperature was increased by 0.6°C ($P=0.0004$). Injection with A_1 antagonist had no significant effect on \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} and \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} ratios (Table 9). Moreover, no metabolic changes were observed in A_{2A} antagonist compared to vehicle (Table 9). Both convective requirement ratios were decreased by the A_{2A} antagonist compared to vehicle-injected rats (\dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} and \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} , $P=0.004$ and $P=0.009$ respectively, Table 9).

Table 9. Resting ventilatory, metabolic, and body weight data in control and NCT male young rats injected with vehicle, A₁ (DPCPX), and A_{2A} antagonist (ZM241385).

	Control rats			NCT rats		
	vehicle (n=14)	A ₁ antagonist (n=12)	A _{2A} antagonist (n=12)	vehicle (n=13)	A ₁ antagonist (n=12)	A _{2A} antagonist (n=12)
\dot{V}_E (BTPS) ml · min ⁻¹ · 100g ⁻¹	194 ± 14	198 ± 11	133 ± 12 *	160 ± 13	203 ± 9 *	141 ± 9
\dot{V}_{O_2} (STPD) ml · min ⁻¹ · 100g ⁻¹	3.58 ± 0.18	4.06 ± 0.27	3.75 ± 0.18	3.89 ± 0.17	3.95 ± 0.18	3.36 ± 0.23
\dot{V}_{CO_2} (STPD) ml · min ⁻¹ · 100g ⁻¹	3.52 ± 0.19	3.48 ± 0.19	3.43 ± 0.19	3.51 ± 0.19	3.68 ± 0.16	3.60 ± 0.21
\dot{V}_E/\dot{V}_{O_2}	55.6 ± 4.6	51.3 ± 4.4	36.3 ± 3.5 *	41.5 ± 3.4 †	52.7 ± 3.3 *	44.9 ± 5.1
\dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2}	56.8 ± 5.0	59.1 ± 4.9	39.3 ± 3.1 *	46.3 ± 3.7	56.5 ± 3.5	41.7 ± 5.0
T _{rects} , °C	36.5 ± 0.1	37.1 ± 0.1 *	36.8 ± 0.1	36.4 ± 0.1	36.8 ± 2 *	36.9 ± 0.1 *
Body weight, g	56 ± 2	54 ± 1	56 ± 2	53 ± 3	50 ± 1	53 ± 2

\dot{V}_E , minute ventilation; BTPS, body temperature and pressure standard; \dot{V}_{O_2} , oxygen consumption; STPD, standard temperature and pressure, dry; \dot{V}_{CO_2} , carbon dioxide production; \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} , oxygen convection ratio; \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} , carbon dioxide convection ratio; T_{rects}, rectal temperature. * *P* < 0.05 versus vehicle; †, *P* = 0.05 versus control. Values are expressed as means ± S.E.

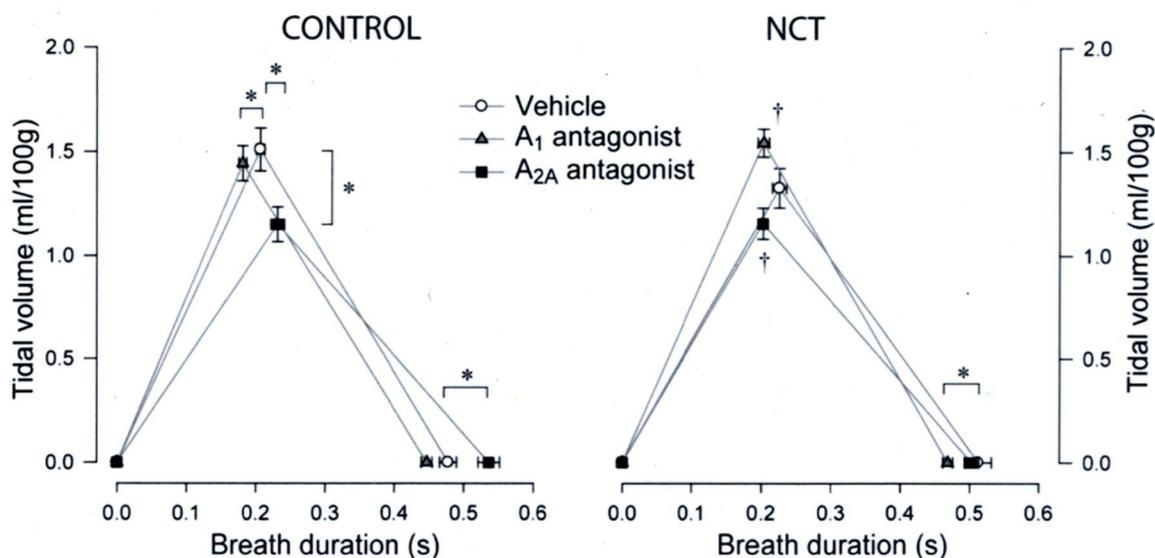


Figure 18. Mean respiratory cycles at rest after injection of either vehicle, A₁ (DPCPX), or A_{2A} antagonist (ZM241385) in control and NCT groups of male young rats. Values are means \pm s.e. of vehicle (white circle), adenosine A₁ (gray triangle) and A_{2A} antagonists (black square). * shows value significantly different from vehicle ($P < 0.05$). † shows values significantly different from respective control duration.

Inactivation of adenosine A₁, but not A_{2A}, receptors increases \dot{V}_E at rest in NCT rats

In NCT rats, A₁ antagonist increased \dot{V}_E by 27% ($P = 0.02$, Table 9), owing to a 9% increase in breathing frequency ($P = 0.04$). Density maps show that NCT rats injected with A₁ antagonist caused a greater V_T for a population of breaths (Figure 19B, right hand panel), an effect not observed when comparing mean values. Unlike controls, the A_{2A} antagonist had no effect on \dot{V}_E measured in NCT rats. Similar results were observed for f_R and V_T (Figure 18, right panel). Moreover, no changes were observed for oxygen consumption and carbon dioxide production following A₁ antagonist injection (Table 9).

However, A_1 antagonist increased \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} ratio by 27% ($P=0.03$) and body temperature by 0.4°C ($P=0.005$). A_{2A} antagonist increased body temperature by 0.5°C ($P=0.008$, Table 9).

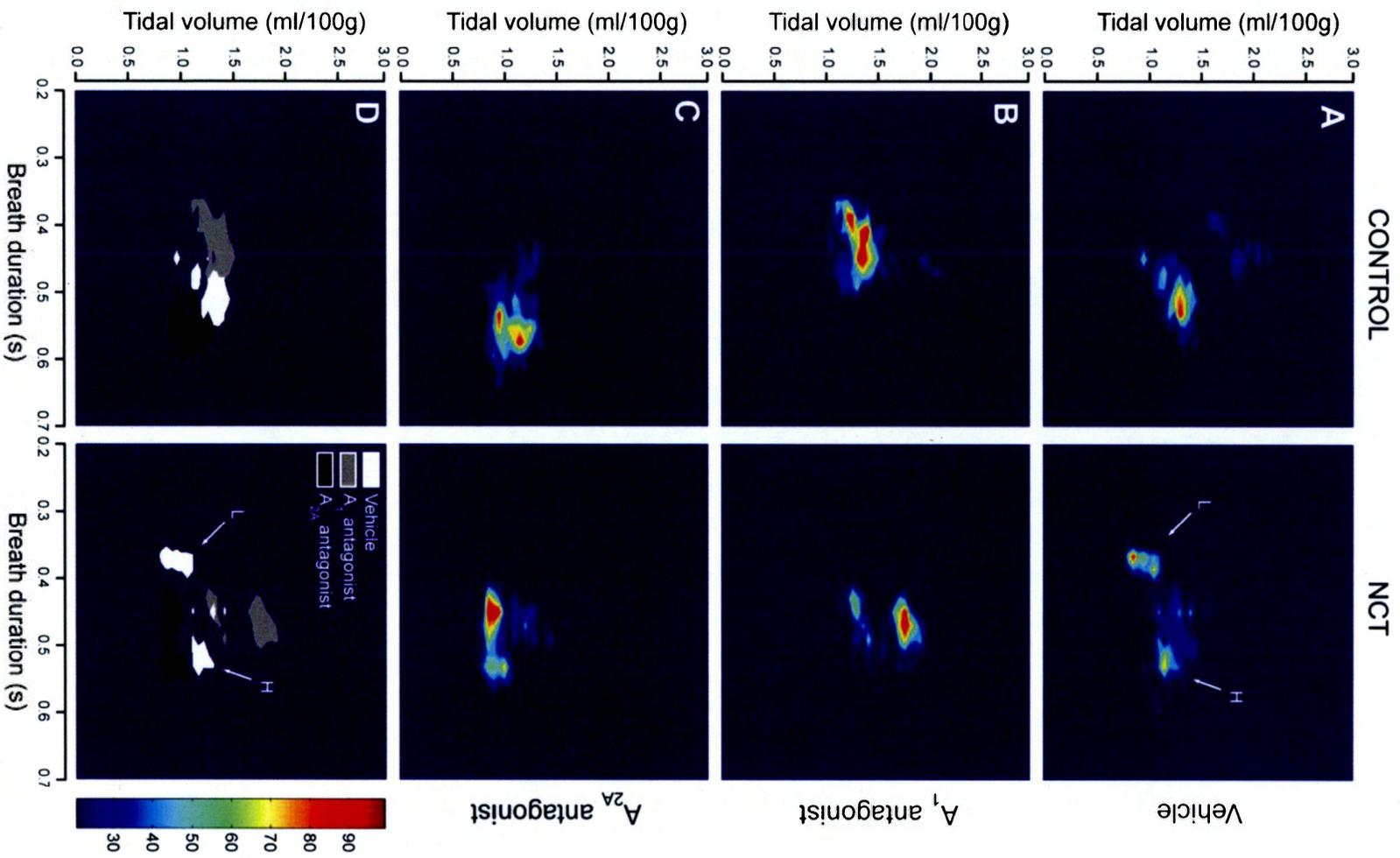
Impact of NCT on the ventilatory effects at rest of adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonists

In vehicle injected rats, no significant differences were observed between control and NCT rats at rest for any of the respiratory variables measured. Similar resting values were observed in our previous study for control and NCT rats of the same age group (Montandon *et al.*, 2006a). However, detailed analysis of the resting breathing pattern with two-dimensional density maps showed the presence of two distinctive spots in the right panel of Figure 19A, indicating that, although control rats had an homogenous breathing activity, NCT altered breathing pattern in a way that results in 2 types of breaths: low and high duration breath (L and H arrows respectively in Figure 19A & 19D). Thus, NCT rats presented high ($\sim 160 \text{ min}^{-1}$) and low respiratory frequencies ($\sim 115 \text{ min}^{-1}$) (respectively low and high breath durations). Finally, metabolic data showed that NCT decreased \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} ratio in vehicle rats by 25% ($P=0.02$, Table 9).

ANOVAs of treatments (control *versus* NCT) \times antagonists (vehicle *versus* A_1 or A_{2A}) allowed us to evaluate the impact of NCT on adenosine receptor modulation of ventilation at rest. These tests show that, despite suggestive trends, NCT had no significant impact on ventilatory (\dot{V}_E) effects of A_1 and A_{2A} antagonist ($P=0.12$ and $P=0.11$ respectively). However, the effect of A_{2A} antagonist on f_R and T_I changed according to the treatment ($P=0.004$ and $P=0.038$ respectively). NCT blunted the decrease of f_R due to A_{2A} antagonist (increase of breath duration in Figure 18) observed in control rats. No changes due to NCT were observed in metabolic data following antagonist injections.

Figure 19. Density map of breaths at rest after injections with either vehicle, A₁ (DPCPX), or A_{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT rats. Each graph represents group data (n=12, 5 min of resting breathing) of total breath duration (0.2-0.7 s) versus tidal volume (0-3 ml · 100g⁻¹) for approximately 2000 breaths. Individual breaths were converted into a two-dimensional histogram (bin width, 0.02 s and 0.05 ml · 100g⁻¹) and plotted as density maps. In panels A (vehicle), B (A₁ antagonist), and C (A_{2A} antagonist), colours represent the relative number of breath in a given bin as percentages of breaths in the maximum bin for control (left panels) and NCT (right panels) rats. Panels D showed flattened comparison between vehicle (white), A₁ antagonist (grey) and A_{2A} antagonist (black) rats of all bins with densities >40%. White arrows show low (L) and high (H) duration breaths.





4.2. *Hypercapnic ventilatory response*

Inactivation of either adenosine A₁ or A_{2A} receptors increases the hypercapnic ventilatory response of control rat

In control rats, ventilatory response expressed as a percentage change from resting value are shown in Figure 20. Adenosine A₁ antagonist increased \dot{V}_E response by at least 60%. This effect was especially noticeable immediately during the first 10 min of the onset of hypercapnia (Figure 21A, left panel), when a strong f_R increase was observed (Figure 21B). V_T response was increased by the A₁ antagonist; however, unlike the f_R response, this effect became more apparent by the late phase of the response (min 12 to 20, Figure 21C). A_{2A} antagonist caused a more modest increase of the \dot{V}_E response to hypercapnia (by 42%, Figure 21A). Again this was mainly due to a strong response of f_R (Figure 21B), but unlike A₁ rats, this effect was significant only during the late phase of the response. Finally, A_{2A} antagonist had no significant effect on the V_T response (Figure 21C).

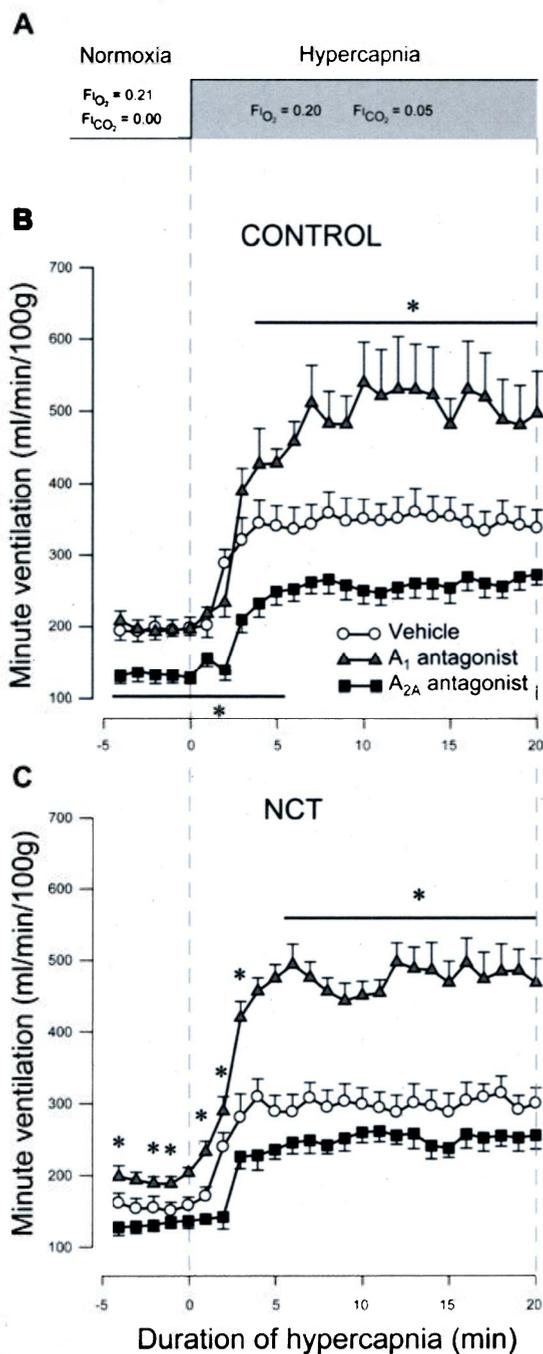


Figure 20. Time courses of minute ventilation during hypercapnia after injection with either vehicle, A_1 (DPCPX), or A_{2A} (ZM241385) receptor antagonists in control and NCT male young rats. Panel A shows the sequence of hypercapnia. Panels B and C show control and NCT rats respectively. Values are expressed as means \pm S.E. of vehicle (white circle), A_1 antagonist (gray triangle), and A_{2A} antagonist (black square). * shows value significantly different ($P < 0.05$) compared to respective vehicle value.

NCT reduces the effects of adenosine A_1 and A_{2A} receptors inactivation on the hypercapnic ventilatory response

In NCT rats, injection of the A_1 antagonist increased \dot{V}_E response to hypercapnia by at least 30% (Figure 21A, right panel). As for controls, this increase was due to a strong

enhancement of the f_R response (Figure 21B). Unlike control rats, however, A_{2A} antagonist had no net effect on any of the responses measured in NCT rats. Comparison between enhancements due by each antagonists showed that \dot{V}_E and f_R responses from A_1 antagonist treated rats were stronger than in those from the A_{2A} antagonist group ($P < 0.024$). Comparison between control and NCT vehicle rats showed that NCT increased the \dot{V}_E response by at least 27% at the end of hypercapnia (min 16 and 20, $P = 0.02$ and $P = 0.048$, Figure 21A) as observed previously (Montandon *et al.*, 2006a). However, A_1 antagonist caused a smaller enhancement of the \dot{V}_E response to CO_2 in NCT than in control rats (min 8 and 12, $P = 0.007$ and $P = 0.03$ respectively, Figure 21A). These differences were mainly due to a decreased V_T response in NCT rats (min 8 and 12, $P = 0.02$ and $P = 0.006$, Figure 21C). By comparing A_{2A} antagonist-related changes and NCT influences, a decrease of the \dot{V}_E response was observed in NCT rats compared to controls (min 4, 16, and 20, $P = 0.049$, $P = 0.02$, and $P = 0.01$, Figure 21A), due in part to a decrease of the f_R response (min 20, $P = 0.02$, Figure 21B) in the NCT rats. ANOVAs of antagonists (A_1 and A_2 antagonist groups) \times treatments (control and NCT) demonstrated that NCT diminished in a stronger manner the V_T response of A_1 antagonist than A_{2A} antagonist rats (min 8 and 12, $P = 0.04$ and $P = 0.02$, Figure 21C).

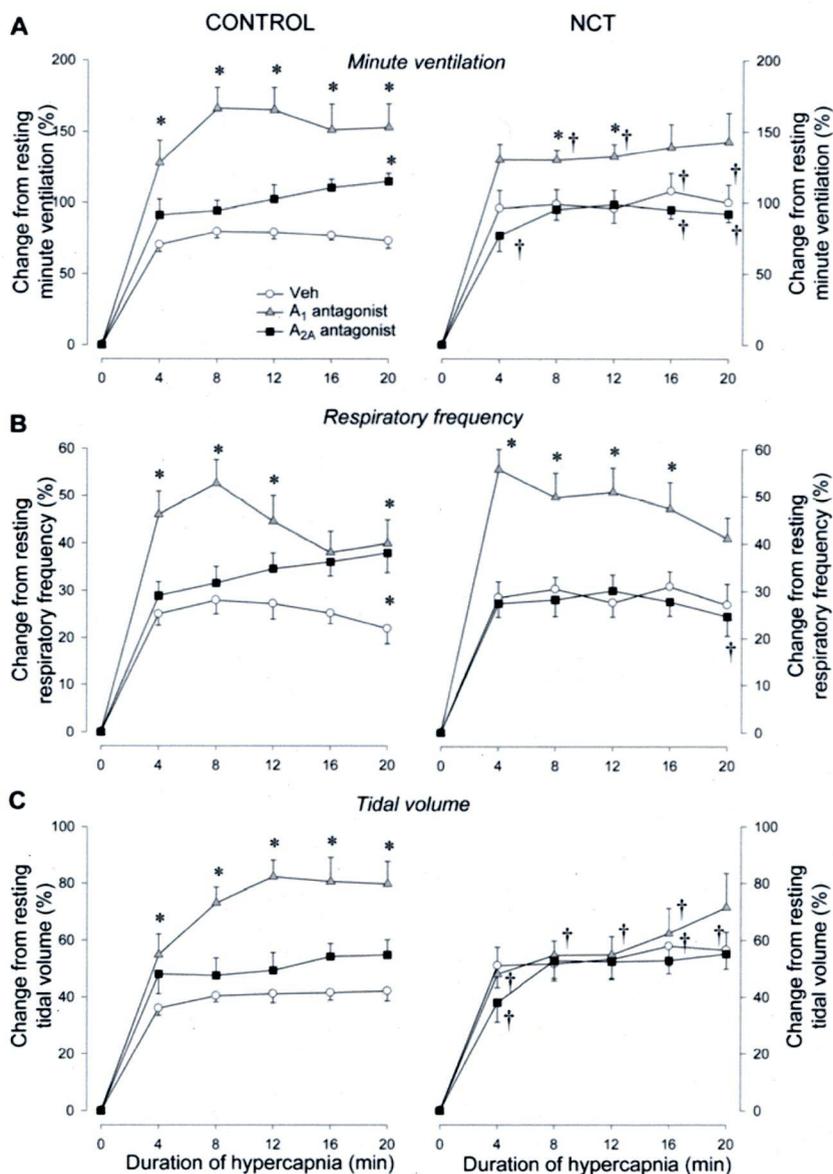


Figure 21. Hypercapnic ventilatory responses after injection with either vehicle, A₁ (DPCPX), or A_{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT male young rats. The hypercapnic responses were expressed as % change from baseline in control (left panels) or NCT (right panels). Values are means \pm S.E. of vehicle (white circle), A₁ antagonist (gray triangle), and A_{2A} antagonist (black square). Minute ventilation response in panel A, respiratory frequency response in panel B, and tidal volume response in panel C. * shows value significantly different ($P < 0.05$) compared to respective vehicle value. † shows value significantly different ($P < 0.05$) compared to respective control rats.

4.3. Occurrence of apneas

Inactivation of adenosine A₁, but not A_{2A}, receptors increases spontaneous apneas only in NCT rat

Figure 22 compares the mean data of apnea occurrence between control and NCT groups at rest. NCT did not change the occurrence of spontaneous apneas in vehicle-injected rats. However, the occurrence of spontaneous apneas was altered by adenosine antagonist in a way that varied according to treatment. In control rats, no differences were observed between vehicle, A₁, and A_{2A} antagonist rats; in NCT rats, however, A₁ antagonist increased spontaneous apneas by 165% ($P=0.029$). ANOVAs demonstrated that A₁ antagonist effect was specific to NCT rats ($P=0.005$).

Inactivation of adenosine A₁, but not A_{2A}, receptors decreases post-sigh apneas only in NCT rat

In vehicle rats, we showed that NCT did not change the occurrence of post-sigh apneas (Figure 22). Injection of neither A₁ nor A_{2A} antagonist affected post-sigh apnea occurrence in control rats. In NCT rats, however, A₁ antagonist decreased post-sigh apnea index by 44% ($P=0.003$). This effect was observed even though A₁ antagonist increased the total number of sighs by 52% ($P=0.02$) at rest in NCT rats. Conversely, A_{2A} antagonist had no effect on the occurrence of post-sigh apneas.

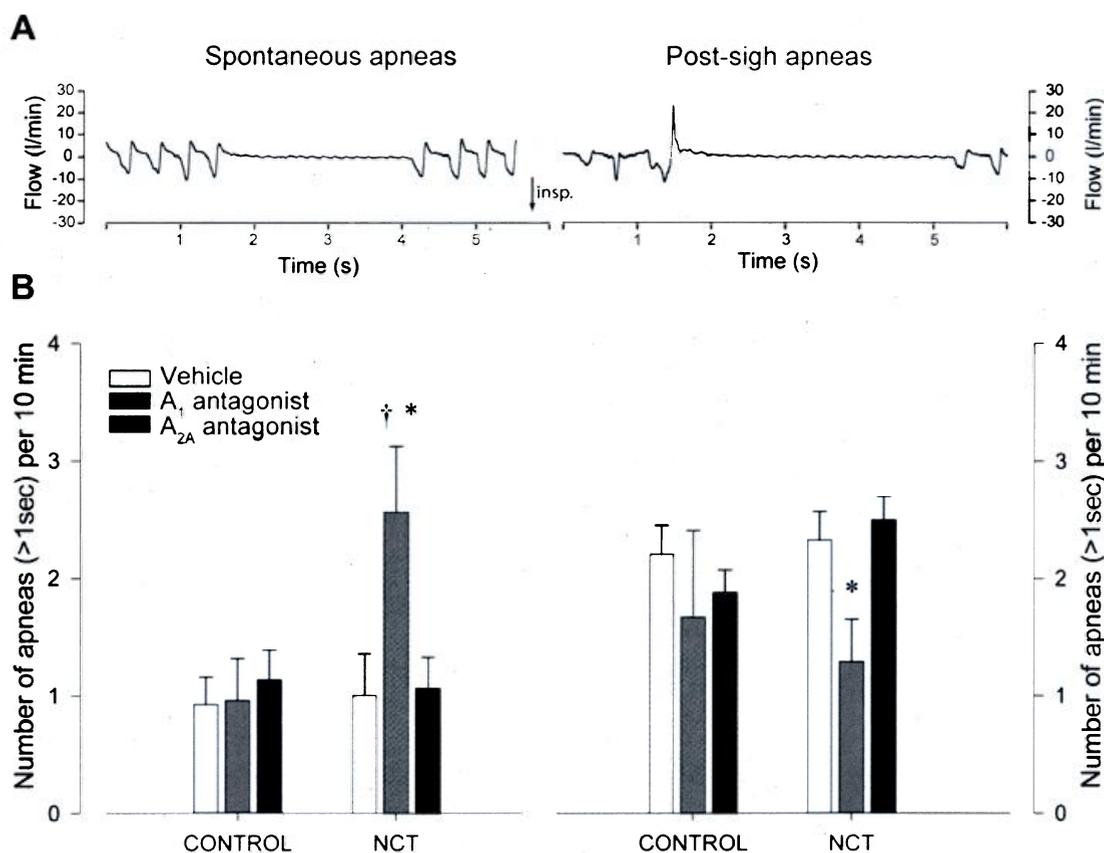


Figure 22. Occurrence of spontaneous and post-sigh apneas after injection of either vehicle, A₁ (DPCPX), or A_{2A} (ZM241385) antagonists in control and NCT male young rats. Panel A shows flow signal of a spontaneous apnea (left) and a post-sigh apnea (right). Panel B shows mean values of number of apneas per 10 min \pm S.E. of vehicle (white bar), A₁ antagonist (gray bar), and A_{2A} antagonist (black bar). * shows value significantly different compared to respective vehicle value. † shows value significantly different compared to respective control rats. Values are significantly different when $P < 0.05$.

5. DISCUSSION

By administering specific adenosine receptors antagonists in control animals, we revealed the role of adenosinergic neurotransmission in respiratory control at rest and during hypercapnic exposure in young (P20), freely-behaving rats (Table 10). In control rats, adenosine A_1 antagonist increased the hypercapnic ventilatory response, but had no effect on ventilation at rest. However, while adenosine A_{2A} antagonist enhanced the hypercapnic ventilatory response only slightly, it caused a strong decrease of ventilation at rest. These results suggest that, in control rats, adenosine exerts tonic excitation of resting ventilation via A_{2A} receptors activation. During hypercapnia, however, adenosinergic modulation helps attenuate the hyperventilatory response. The fact that this effect involves a different receptor subtype (A_1) than under resting conditions (A_{2A}) suggests that adenosine acts on a different component of the respiratory control system under each condition. Moreover, neonatal caffeine treatment (NCT) elicits significant plasticity of adenosinergic modulation of respiratory control since it decreased the facilitating-effect of A_1 antagonist on the hypercapnic ventilatory response and blunted the diminution of resting ventilation due to A_{2A} antagonist. In that regard, NCT also increased the occurrence of spontaneous apneas when adenosine A_1 receptors are inactivated by specific antagonist. Thus, caffeine exposure during early life elicits significant plasticity of adenosinergic modulation of the respiratory control system of young rats since the overall neuromodulatory influences of adenosine (both at rest and during hypercapnic challenge) suggest that caffeine alters the expression and sensitivity of each receptor subtype differently.

Table 10. Summary of effects of adenosine receptor inactivation on resting ventilation, apnea occurrence, hypercapnic ventilatory response, and oxygen consumption in control and NCT rats.

Adenosine receptor antagonist:	Control rats				NCT rats					
	\dot{V}_E	SP apneas	PS apneas	CO ₂ response	\dot{V}_{O_2}	\dot{V}_E	SP apneas	PS apneas	CO ₂ response	\dot{V}_{O_2}
A ₁ (DPCPX)	-	-	-	↑↑	-	↑	↑↑↑	↓	↑	-
A _{2A} (ZM241385)	↓	-	-	↑	-	-	-	-	-	-

\dot{V}_E , minute ventilation at rest; SP, spontaneous apneas; PS, post-sigh apneas, \dot{V}_{O_2} , oxygen consumption; one arrow indicates a significant change >20%; two arrows a significant change >50%; three arrows a significant change >100%; - indicates no changes.

5.1. Critiques of methods

Plethysmography. The accuracy of tidal volume measurements obtained with whole-body plethysmography is the subject of much debate (Enhorning *et al.*, 1998; Jacky, 1980). In the present study, obtaining accurate tidal volume measurement can be enhanced since in small animals, the high airway resistance can lead to pressure changes associated with compression and rarefaction of gas. However, this method remains the best approach to measure ventilatory variables (including tidal volume) in awake, freely-behaving animals. To minimize errors due to the correction of tidal volume, the hypercapnic ventilatory response was expressed in percentage change from baseline value (Jacky, 1980). Also, it cannot be ruled out that the tidal volume decrease observed following A_{2A} antagonist injection was due to a change in airway resistance. Plethysmography does not allow us to distinguish a change in V_T due to airway resistance variation from a change in the neural command of breathing. However, although activation of adenosine A₁ receptors has a bronchoconstrictor effect, A_{2A} receptor activation has no impact on airway resistance (Rorke & Holgate, 2002).

Injection of drugs. Intra-peritoneal injection of antagonist could pose several problems. Little is known about the pharmacodynamics of DPCPX and ZM241385; however, based on previous studies it would appear that DPCPX reached the brain at least 30 min post-injection and the concentration is 5 times lower in the brain than in the serum (Finlayson *et al.*, 1997). Although ZM241385 pharmacodynamics are unknown, the dose of antagonist used in the present study is sufficient to alter cognitive capacities (Prediger & Takahashi, 2005; Prediger *et al.*, 2005a; Prediger *et al.*, 2005b). However, comparison of the effects of each antagonist must be done very carefully, since no comparisons of their pharmacodynamics have been performed.

Other adenosine receptor subtypes. The possibility that caffeine, as well as the A_{2A} antagonist, also blocks adenosine A_{2B} and A_3 receptors can not be ruled out. Indeed, caffeine has a good affinity for A_{2B} receptors, but is poorly selective for A_3 receptors (Fredholm *et al.*, 1999b). ZM241385 is, however, highly selective for A_{2B} receptors (Cacciari *et al.*, 2003). The role of adenosine A_{2B} and A_3 receptors in respiratory control is not clear. Activation of adenosine A_{2B} receptors in the carotid bodies exerted excitatory effects on carotid body chemoreceptors output (Conde *et al.*, 2006), whereas no roles have been demonstrated for A_3 receptors.

5.2. *Role of adenosine receptors in control of breathing in awake young rats*

Ventilation at rest. In our study, injection of A_1 antagonist did not modify ventilation at rest in male young rats (Table 10). These results contrast with those obtained in non-anesthetised fetal sheep (Koos *et al.*, 2001) or *in vitro* preparation from newborn rat brainstem (Wang *et al.*, 2005) in which a specific adenosine A_1 receptor antagonist increases, respectively, f_R or the frequency of inspiratory neurons. Furthermore, adenosine A_1 receptor agonist decreased \dot{V}_E in anesthetised (Lagercrantz *et al.*, 1984) or conscious adult rats (Lagercrantz *et al.*, 1984; Wessberg *et al.*, 1984). These discrepancies may be related to the fact that we used 20 day-old rats (P20) instead of newborns or adults since specific binding of adenosine analogue is age-dependent in rats (Guillet & Kellogg, 1991a).

In the present study, the adenosine A_{2A} receptor antagonist decreased resting \dot{V}_E , owing to lower f_R and V_T . Previous studies using anaesthetised, immature rats (Mayer *et al.*, 2006) or *en bloc* brainstem preparation from newborn rat (Herlenius *et al.*, 1997) yielded opposite results as central activation of adenosine A_{2A} receptors by selective agonists decreased breathing. Vagotomy, the absence of peripheral chemosensory input from the carotid bodies, and removal of the pontine regions are key differences between *in vitro* and *in vivo* experiments. In that regard, activation of A_{2A} receptors at the carotid body level augments breathing in adult rats (McQueen & Ribeiro, 1983; Conde *et al.*, 2006; Monteiro & Ribeiro, 1987); for a review see (Bairam & Carroll, 2005). Blocking adenosine A_{2A} receptors produced a hypoventilation in young rats, an effect not observed in newborn or adult, which is consistent with our and other results showing that adenosinergic modulation of respiratory control changes over the course of development (Mayer *et al.*, 2006; Montandon *et al.*, 2006a). In brainstem-spinal cord preparation, removal of the pontine and other rostral structures, which contains a large quantity of adenosine A_{2A} receptors compared to other structures (Rosin *et al.*, 1998), may reduce the inhibitory effect of adenosine A_{2A} receptors, and consequently, reduce the excitatory effect of adenosine A_{2A} antagonist.

Hypercapnic ventilatory response. Ventilatory response to a moderate increase in CO_2 (5%) was enhanced by adenosine A_1 receptors inactivation. While no previous studies have examined the role of specific adenosine receptor subtypes in the hypercapnic ventilatory response of young rats, studies in adult humans demonstrated that systemic administration of a non-specific adenosine receptor antagonist (caffeine) increased the hypercapnic ventilatory response in adult human (Pianosi *et al.*, 1994; D'Urzo *et al.*, 1990). The site where adenosine antagonist caffeine exerts its acute effect in humans is unknown, and adenosine A_1 receptors are widely distributed in the central nervous system (Rivkees, 1995; Rivkees *et al.*, 1995). More precisely, adenosine A_1 agonist decreased c-Fos expression in the nucleus tractus solitarius, the area postrema, and the raphe obscurus and increased it in the parabrachial nucleus (Saadani-Makki *et al.*, 2004). These structures contain adenosine A_1 receptors (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Gaytan *et al.*, 2006) and are putative central CO_2 chemosensitive sites (Coates *et al.*, 1993; Feldman *et al.*, 2003).

Accordingly, we propose that inactivation of adenosine A_1 receptors prevents the inhibitory action of adenosine in specific CO_2 chemosensitive structures within the brainstem.

In contrast, inactivation of adenosine A_{2A} receptors had a small impact on the hypercapnic response. A_{2A} receptor distribution is restricted to the striatum, the nucleus accumbens, the olfactory tubercle (Rosin *et al.*, 1998). In the brainstem, these receptors were found in high quantity in the nucleus tractus solitarius, in medium quantity in the gigantocellular nucleus, the parapyramidal nuclei, the Bötzing complex, and the locus ceruleus (Rosin *et al.*, 1998; Zaidi *et al.*, 2006). Since the nucleus tractus solitarius and the locus ceruleus are putative CO_2 chemosensitive sites (Coates *et al.*, 1993), inactivation of A_{2A} receptors in these structures may explain the increase of the hypercapnic response observed in the present study. Because adenosine A_{2A} receptors are expressed only in few areas involved in CO_2 chemosensitivity, this receptor subtype might have a less important role in the hypercapnic ventilatory response than A_1 receptors. However, it cannot be ruled out that adenosine A_{2A} antagonist does not reach the brain in the same amount than A_1 antagonist as discussed previously.

5.3. Impact of NCT on adenosinergic modulation of respiratory control

Ventilation at rest. Comparing mean data between control and NCT rats receiving vehicle injection yielded results similar to those we reported previously: NCT had no effect on ventilation at rest (Montandon *et al.*, 2006a). However, the use of breath density maps showed that NCT increased respiratory activity in young rats in an identical way than in adults for a population of breaths (as observed in right panel of Figure 19A), suggesting that, with maturation, young NCT rats will progressively achieve the same high respiratory activity than in NCT adults (Montandon *et al.*, 2006a). The functional consequences of this heterogeneous f_R observed in NCT rats are unknown, especially since this treatment does not affect the number of apneas. In humans, however, adenosine infusion produces periodic breathing during sleep (Gleeson & Zvillich, 1992). Consequently, treatments that interfere with adenosinergic neurotransmission may predispose to respiratory instability during sleep. This hypothesis is currently being investigated in our laboratory.

Unlike controls, ventilation of NCT rats was increased by blocking adenosine A_1 , but not A_{2A} , receptors (Table 10), suggesting that adenosinergic modulation of resting ventilatory activity (*via* A_1 receptors) is enhanced by NCT. Comparing control and NCT rats also showed that caffeine treatment abolished the depressant effect of A_{2A} receptor antagonist on resting ventilation, indicating that NCT influenced A_{2A} receptor expression. This observation is consistent with results showing that chronic caffeine increases A_{2A} receptor density in mouse brain (Traversa *et al.*, 1994). A_{2A} receptors are expressed in the nucleus tractus solitarius (Rosin *et al.*, 1998) and the carotid bodies (Conde *et al.*, 2006) and recent results from our laboratory demonstrate that NCT increased adenosine A_{2A} receptor mRNA in the carotid bodies of adult rats (G. Montandon, unpublished observation). Consequently, since A_{2A} receptors are excitatory in the carotid bodies, an increase of their expression likely augments respiratory drive at rest and enhances \dot{V}_E . This interpretation likely explains why the A_{2A} antagonist dose used was not sufficient to decrease ventilation in NCT rats as observed in controls.

Hypercapnic ventilatory response. An important result of this study is that NCT decreased the impact of A_1 antagonist on the ventilatory response to hypercapnia (Table 10). Because \dot{V}_{O_2} is not altered by caffeine, these changes are unlikely related to metabolism. In control rats, A_1 antagonist reduces the inhibitory effect of endogenous adenosine. In NCT rats, however, the same dose of adenosine A_1 antagonist was not sufficient to augment the hypercapnic response to the level observed in control rats. These results suggest that NCT increases adenosine A_1 receptors expression and/or enhances the capacity for endogenous adenosine release. NCT increased adenosine A_1 receptor expression in the brainstem of neonatal rats (Gaytan *et al.*, 2006) and it has been proposed that when caffeine occupies the adenosine receptor's binding site, the number of receptors increases to maintain efficiency of the adenosinergic system (Boulenger *et al.*, 1983; Johansson *et al.*, 1997b). Such effects may underlie the influence of NCT on A_1 antagonist group reported here. A small increase of adenosine A_{2A} receptor expression in the nucleus tractus solitarius or in the locus ceruleus is likely since a decrease of V_T response to hypercapnia was observed in NCT rats. In fact, adenosine A_{2A} receptors are distributed in

these brainstem structures (Rosin *et al.*, 1998), explaining the small impact of NCT on the response of rats injected with A_{2A} antagonist.

Occurrence of apnea. Adenosine plays an important role in apnea generation, since adenosine agonist decreases spontaneous apneas in adult rats (Monti *et al.*, 1995; Monti *et al.*, 1996). However, this effect may be sleep-wake state-dependant because, as we mentioned previously, adenosine infusion during sleep produces periodic breathing. In the present study, however, adenosine antagonists did not change spontaneous apneas in control young rats. This can be explained by the low dose of antagonist used or by the young age of the rats. Furthermore, sleep-wake state may be a factor also and this variable was not controlled in the present study. In NCT rats, however, A₁ antagonist increased the occurrence of spontaneous apneas. These data seem contradictory with the fact that caffeine is used to treat apneas in premature newborn. However, in this study, young rats are used instead of immature newborn. In fact, because developmental changes in neurotransmission occur around postnatal day 12 in the respiratory brainstem nuclei of rats (Wong-Riley & Liu, 2005), the possibility that age-dependent effects of caffeine on ventilatory activity reflect maturational changes in neurotransmission is yet to be investigated.

The mechanism of action of neonatal caffeine on apneas is unclear. In humans, central apneas can be provoked by a decrease in P_aCO₂ below apneic threshold (Leevers *et al.*, 1994). In human newborns, the eupneic threshold is very close to CO₂ apneic threshold (Khan *et al.*, 2005). High sensitivity to CO₂ after injection of A₁ antagonist, could lead to hyperventilation and, consequently, to high variations of CO₂ levels. This may increase the risk to reach apneic threshold, especially in young animals, and thus enhance the occurrence of apneas. These results suggest that, following this treatment, absorption of a non-specific antagonist such as caffeine may increase apneas in caffeine-treated young rats.

Adenosine A₁ receptors antagonist increased the occurrence of sigh in NCT rats. Despite this increase, adenosine A₁ receptors inactivation decreases the occurrence of post-sigh apnea in NCT rats. This suggests that the mechanism that induces apnea after a sigh, rather than sigh occurrence, is altered by NCT. This mechanism is thought to be related to pulmonary stretch reflexes occurring after the sigh (Mendelson *et al.*, 1988). Our results suggest that A₁, rather than A_{2A}, receptors are involved. Adenosine A₁ receptors are present

in the nucleus tractus solitarius and the parabrachial nucleus (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Gaytan *et al.*, 2006), two structures involved in pulmonary stretch reflexes (Ezure, 2004). NCT increases adenosine A₁ receptor expression in the parabrachial nucleus of newborn rats; an effect not observed in young rats (Gaytan *et al.*, 2006). In this study however, NCT was administered during a shorter period of time (P2 to P6) that may explain the absence of effect of NCT. The cumulative effect of the likely NCT-induced overexpression of adenosine A₁ receptors in this structure and inactivation of adenosine A₁ receptors by a specific antagonist might explain the decrease of post-sigh apneas observed in this study.

5.4. Conclusion

Adenosine is an important neuromodulator of respiratory control. Yet, this study is the first to investigate the specific role of adenosine receptors in freely-behaving young rats and shows that adenosine modulates both resting ventilation and CO₂ chemosensitivity. More specifically, data suggest that hypercapnia activates adenosinergic pathways which attenuate responsiveness (and/or sensitivity) to CO₂ *via* A₁ receptor activation. We suggest that inactivation of A_{2A} receptors in the carotid bodies and/or nucleus tractus solitarius decreases the respiratory drive to ultimately reduce ventilation at rest. Furthermore, our study demonstrated that the adenosine A₁ receptor antagonist increases occurrence of spontaneous apneas in caffeine-treated young rats. Caffeine administration is a common treatment for respiratory instabilities in newborns, especially those born prematurely. Our data showing that NCT elicits developmental plasticity of adenosinergic modulation of respiratory activity raise questions about the potential consequences of subsequent caffeine absorption during childhood (*via* maternal milk) on respiratory activity (Bodineau *et al.*, 2006). Such situation might increase vulnerability to respiratory disease associated with neural control dysfunctions such as sleep apnea or SIDS (Horne *et al.*, 2004; Marcus, 2001).

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Evelyne Vachon and Sylvie Viger (animal care specialists) for their excellent work with gavage procedure. We also thank Mathieu Allard for his participation in plethysmographic measurements.

This work was supported by the Foundation for the Research into Children's Disease, the Canada Research Chair in Respiratory Neurobiology and a CIHR operating grant (A.B.; MOP-81101). G.M. has been awarded PhD studentship from the Jeanne-et-Jean-Louis-Levesque Perinatology Chair.

ÉTUDE III

INCREASED PHRENIC NERVE AND CARDIAC ACTIVITIES IN THE ADULT ANAESTHETIZED RATS TREATED WITH CAFFEINE DURING THE NEONATAL PERIOD

Montandon Gaspard^{1&2}, Richard Kinkead¹, Aida Bairam¹

¹ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hôpital St-François d'Assise, Université Laval, Québec.

² Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Ontario.

1. RÉSUMÉ

Un traitement à la caféine, similaire à celui utilisé en clinique pour traiter les apnées du prématuré, administré au rat nouveau-né induit des effets à long terme sur le contrôle de la respiration du rat adulte. En effet, nous avons récemment démontré qu'un traitement néonatal à la caféine (NCT) administré du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance à des doses de 15 mg/kg altère la respiration au repos et le patron de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des rats adultes mesurés par pléthysmographie chez l'animal éveillé. Cependant, ces études sont limitées par la présence de l'activité cardiovasculaire et du comportement qui interfèrent avec les mesures ventilatoires chez le rat éveillé. Afin de compléter les études utilisant l'animal éveillé, nous évaluons ici les effets à long terme de la caféine sur l'activité du nerf phrénique et la fonction cardiovasculaire en conditions de base et à plusieurs niveaux d'hypercapnie chez le rat adulte anesthésié, vagotomisé et ventilé artificiellement. Les mesures sont effectuées à l'âge adulte plusieurs mois après le traitement en conditions normocapnique et hypercapnique (+5 mmHg et +10 mmHg de CO₂ au dessus des valeurs de normocapnie). Les rats NCT présentent une activité intégrée du nerf phrénique plus élevée pour tous les niveaux de CO₂ ($P < 0.047$). La fréquence respiratoire du nerf phrénique n'est pas affectée par le NCT quel que soit le niveau de CO₂. Bien que l'activité du nerf phrénique soit plus élevée chez les rats NCT, la réponse du nerf phrénique à l'hypercapnie n'est pas modifiée par le traitement. Le rythme et la variabilité cardiaque sont identiques entre les rats contrôles et NCT en normocapnie; toutefois, en hypercapnie ils augmentent fortement chez les rats NCT ($P = 0.028$ pour le rythme cardiaque à +10 mmHg et $P = 0.007$ pour la variabilité cardiaque à +5 mmHg). Cette étude démontre que le NCT augmente l'activité du nerf phrénique indépendamment du niveau de CO₂ et que l'activité cardiaque est affectée lors de l'hypercapnie, suggérant des résultats différents de ceux obtenus dans les études chez le rat adulte éveillé.

ABSTRACT

Caffeine is widely used to treat apneas in premature newborns and this treatment occurs during a sensitive period of newborn development. It has been previously shown that similar neonatal caffeine treatment (15 mg/kg, NCT) administered each day from postnatal day 3 to 12 in the newborn rat induces profound long-lasting effect on ventilation and hypercapnic ventilatory response measured in freely-behaving adults. However, studies in freely-behaving rats do not allow precise control of cardiovascular parameters that might participate to changes observed in ventilation. We addressed this issue by measuring phrenic nerve activity, blood pressure, heart rate, and heart rate variability under baseline and hypercapnic conditions (+5 and +10 mmHg of CO₂ above baseline level) in mechanically-ventilated, vagotomized, and anaesthetized control and NCT adult rats. NCT rats presented higher integrated phrenic nerve activity at baseline and at each CO₂ level ($P < 0.047$). Phrenic nerve frequency was not affected by NCT. Despite these increases, the hypercapnic response of the phrenic nerve activity was not affected in NCT compared to controls. Heart rate and heart rate variability were similar in control and NCT rats under baseline conditions but were higher during hypercapnia in NCT rats ($P = 0.028$ for heart rate at +10 mmHg and $P = 0.007$ for heart rate variability at +5 mmHg). This study shows that NCT induced an overall increased activity of phrenic nerve output and cardiac rhythmic activities. Despite this increase, CO₂ chemosensitivity was not affected by NCT, a result that differs from freely-behaving rat studies, suggesting that, in these rats, ventilation is the result of a complex interplay between respiratory and cardiovascular activities that requires the use of several different, but complementary, approaches to be precisely assessed.

2. INTRODUCTION

Caffeine is a drug widely used in the clinic to treat apneas of prematurity and this treatment occurs during a sensitive period of the premature's development. It has become clear that exposure to caffeine during the neonatal period can lead to modification in the rat respiratory phenotype (Montandon *et al.*, 2006a; Montandon *et al.*, 2007; Montandon *et al.*, 2008). In fact, neonatal caffeine treatment (NCT) from postnatal days 3 to 12 induces long lasting increases of respiratory frequency at rest and changes the pattern in the hypercapnic ventilatory response of freely-behaving adult male rats (Montandon *et al.*, 2006a). These effects are related to changes in the functional aspects of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the respiratory control of freely-behaving young rats (Montandon *et al.*, 2007). NCT affects adenosine A₁ receptor role in the hypercapnic chemoreflex and adenosine A_{2A} receptor role in ventilation at rest (Montandon *et al.*, 2007), probably due to sustained modifications of adenosine receptor expression in specific brainstem structures (Gaytan *et al.*, 2006) or at peripheral carotid body chemoreceptors (Montandon *et al.*, 2008). These studies were limited, in part, by the state of consciousness and by technical difficulties to control blood gas. Moreover, the awake rat is not well suited for more invasive mechanistic studies which require electrophysiological and cardiovascular recordings.

To determine whether neonatal caffeine will lead to sustained long term changes of respiratory activity, we measured inspiratory phrenic nerve activity at rest and at different levels of hypercapnia in anaesthetized, vagotomized, paralyzed, and artificially ventilated adult male rats treated with caffeine during the neonatal period. We also measured arterial blood gas, blood pressure, heart rate, and heart rate variability in these rats to evaluate the impact of NCT on the cardiovascular functions.

3. METHODS

The study was performed on 14 Sprague-Dawley male adult rats born in our animal care facility. Laval University Animal Care Committee approved the experimental procedures and all protocols were in accordance with the guidelines detailed by the Canadian Council on Animal Care. As for previous studies (Montandon *et al.*, 2006a; Montandon *et al.*, 2007), caffeine was administered by gavage each day from postnatal day 3 to 12 at 15 mg/kg (given as caffeine citrate, 30 mg/kg, Sabex, Boucherville, QC, Canada) in a volume of 0.05 mL/10g of body weight (neonatal caffeine treatment, NCT). Another group received water (control group) at the same volume.

Phrenic nerve activity was recorded in control (n=7) and NCT (n=7) adult male rats (4-5 months-old) as detailed previously (Kinkead *et al.*, 2005b; Montandon *et al.*, 2008). Briefly, rats were anaesthetized with isoflurane (3%, in 50% of O₂, balance N₂), body temperature was maintained between 37°C and 38°C, and venous and arterial femoral catheters were inserted. Phrenic nerve activity was recorded with a bipolar silver recording electrode in adult rat ventilated, vagotomized, anaesthetized with urethane (1.6 g/kg, iv in distilled water), and paralyzed with pancuronium bromide (2.5 mg/kg, iv). Nerve activity was amplified (AM-Systems, Everett, WA, USA), band-pass filtered (100 Hz to 10 kHz), and fed to a moving averager (model MA-821, CWE Inc., Ardmore, PA, USA) before being digitized and recorded at 2kHz with a data acquisition system (IOX, EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA). Blood pressure was also continuously digitized at a sample rate of 2kHz for subsequent analysis and blood samples were analysed for arterial CO₂ pressure (P_aCO₂), arterial O₂ pressure (P_aO₂), and pH (model ABL-5, Radiometer Copenhagen, Brønshøj, Denmark).

After a stabilization period of 60 min under hyperoxic conditions (F_IO₂=0.5), CO₂ apneic threshold for inspiratory (phrenic) activity was determined by mechanically hyperventilating the rats until phrenic nerve activity ceased, at which point a first blood sample was taken for blood-gas measurements. Rate of the ventilator was then decreased progressively until phrenic activity returned and P_aCO₂ was set 2–3 mmHg above the apneic threshold. Baseline phrenic activity was recorded for 4 min (Figure 23). Then, inspired

content of CO₂ was slowly increased to reach a P_aCO₂ 5 mmHg (+5 mmHg) and 10 mmHg (+10 mmHg) above baseline initial value. Phrenic nerve and blood pressure were recorded for 4 min for each CO₂ level. At the end of the protocol, CO₂ was increased approximately 30 mmHg above baseline P_aCO to reach phrenic nerve maximal activity (CO₂ max).

Mean “steady-state” values for peak integrated phrenic nerve activity (iPNA), phrenic burst frequency, mean arterial blood pressure (MAP), and heart rate (HR) were obtained by averaging data over a 4 min period for each level (Fig. 23 and 24). Phrenic nerve activity was then normalized according to maximal value. Euthanasia was performed by urethane overdose. Blood pressure signals of 2-min length were analysed and at least 500 RR intervals (duration between each systolic pressure peaks) were collected for each level and each rat. We then evaluate total heart rate variability with Poincaré plots according to Brennan and colleagues (2001) using custom-made script with Matlab software (The Mathworks, Natick, MA, USA). Comparisons of all variables between control and NCT rats were made using a one-way ANOVA (JMP 5.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and *p*-values are indicated in the result section. Interactions between CO₂ levels and treatment were tested using two-way ANOVA for repeated measure (CO₂ levels × treatments) and were followed by post hoc analysis with least-significant means differences Student’s *t*-tests (JMP 6) when appropriated. Data were considered significantly different when $P < 0.05$ and were expressed using means ± S.E.

4. RESULTS

Table 11 shows that there was no change between control and NCT rats during baseline and hypercapnia for all blood-gas variables. Body weight did not differ between control and NCT adult rats. Representative phrenic nerve recordings show clearly that control rat (Figure 23B) presented lower phrenic nerve activity than NCT rat (Figure 23B). Average values confirm these observations, since at baseline, mean phrenic nerve amplitude was higher in NCT rats compared to controls (by 158%, $p=0.030$, Figure 23C). Neonatal caffeine enhanced, but not significantly, phrenic amplitude (by 106%, $p=0.057$, Figure 23C) at +5 mmHg and did not change phrenic amplitude at +10 mmHg. Percentage of max amplitude were higher in NCT than in control rats at baseline and at each CO₂ levels ($p<0.047$, Figure 23F). However, phrenic amplitude and % of max amplitude did not present a higher response to CO₂ in NCT compared to control rats (two-way ANOVA: treatment \times CO₂ levels).

Mean phrenic nerve frequency and percentage of change from maximum frequency did not differ between control and NCT rats at baseline, +5 mmHg, and +10 mmHg (Figures 23D and 23G). Two-way ANOVA for treatment and CO₂ levels was not statistically significant for these two variables, suggesting that NCT did not alter the frequency response to hypercapnia.

Minute activity (the product of phrenic nerve amplitude and frequency) was higher in NCT rats than in control rats at baseline (by 153%, $p=0.044$, Figure 23E). At +5 mmHg and +10 mmHg, minute activity did not differ between groups. At baseline, percentage of max minute activity did not differ between groups (Figure 23H). However, at +5 mmHg and +10 mmHg, percentage of max minute activity were higher in NCT compared to control rats (by 42% and 25%, $p=0.021$ and $p=0.025$, respectively). The minute activity response to CO₂ did not differ between NCT and control groups (two-way ANOVA: treatment \times CO₂ levels), suggesting that NCT did not alter the respiratory CO₂ chemosensitivity.

To determine whether neonatal caffeine modifies cardiovascular regulation, we evaluated blood pressure, heart rate, and heart rate variability in control and NCT rats. Representative blood pressure recordings are presented in Figures 24A and 24B. Mean arterial, systolic, and diastolic blood pressures were similar at baseline, +5 mmHg, and at +10 mmHg in control and NCT rats (Figures 24C, 24D, and 24E). Heart rates were similar in both groups at baseline ($P=0.96$), and +5 mmHg ($P=0.13$), whereas at +10 mmHg it was higher in NCT rats than in controls ($P=0.028$, Figure 24F). To evaluate whether neonatal caffeine alters heart rate variability, Poincaré plots were calculated in control and NCT rats at each CO₂ levels. At baseline, there was no effect of NCT on total heart rate variability (Table 11), whereas at +5 mmHg it was higher in NCT compared to control rats ($P=0.007$). These differences were not present at +10 mmHg. Two-way ANOVAs (treatment \times CO₂ levels) demonstrated that NCT had no effect on the cardiovascular responses to hypercapnia.

Table 11. Arterial blood gases, pH, mean arterial, systolic and diastolic blood pressure during apnea, baseline, +5 mmHg, +10 mmHg, and CO₂ max in control and NCT anaesthetized adult male rats.

	Control rats (n=7)					NCT rats (n=6)				
	Apnea	Baseline	+5 mmHg	+10 mmHg	CO ₂ max	Apnea	Baseline	+5 mmHg	+10 mmHg	CO ₂ max
PaCO ₂ , mmHg	36.1 ± 2.2 †	39.6 ± 1.8	44.6 ± 1.9 †	49.3 ± 2.0 †	72.9 ± 3.8 †	36.8 ± 2.1 †	39.7 ± 2.2	45.5 ± 1.8 †	50.3 ± 1.5 †	71.4 ± 4.7 †
pH	7.38 ± 0.01 †	7.36 ± 0.01	7.32 ± 0.01 †	7.30 ± 0.01 †	7.19 ± 0.02 †	7.39 ± 0.02 †	7.37 ± 0.02	7.33 ± 0.01 †	7.29 ± 0.01 †	7.18 ± 0.02 †
PaO ₂ , mmHg	181 ± 13	173 ± 9	165 ± 9	170 ± 13	167 ± 11	203 ± 15	204 ± 14	193 ± 16	193 ± 14	199 ± 15 *
HRV, ms ²	-	2520 ± 600	1853 ± 294	1949 ± 520	-	-	4784 ± 1129	3896 ± 570 *	3794 ± 2057	-
Body weight, g			620 ± 19					613 ± 20		

PaO₂, arterial oxygen pressure; PaCO₂, arterial carbon dioxide pressure; HVR, heart rate variability. Values are expressed as means ± S.E. † for means significantly different from baseline. * for value significantly different from respective control value. Value are significantly different with p<0.05.

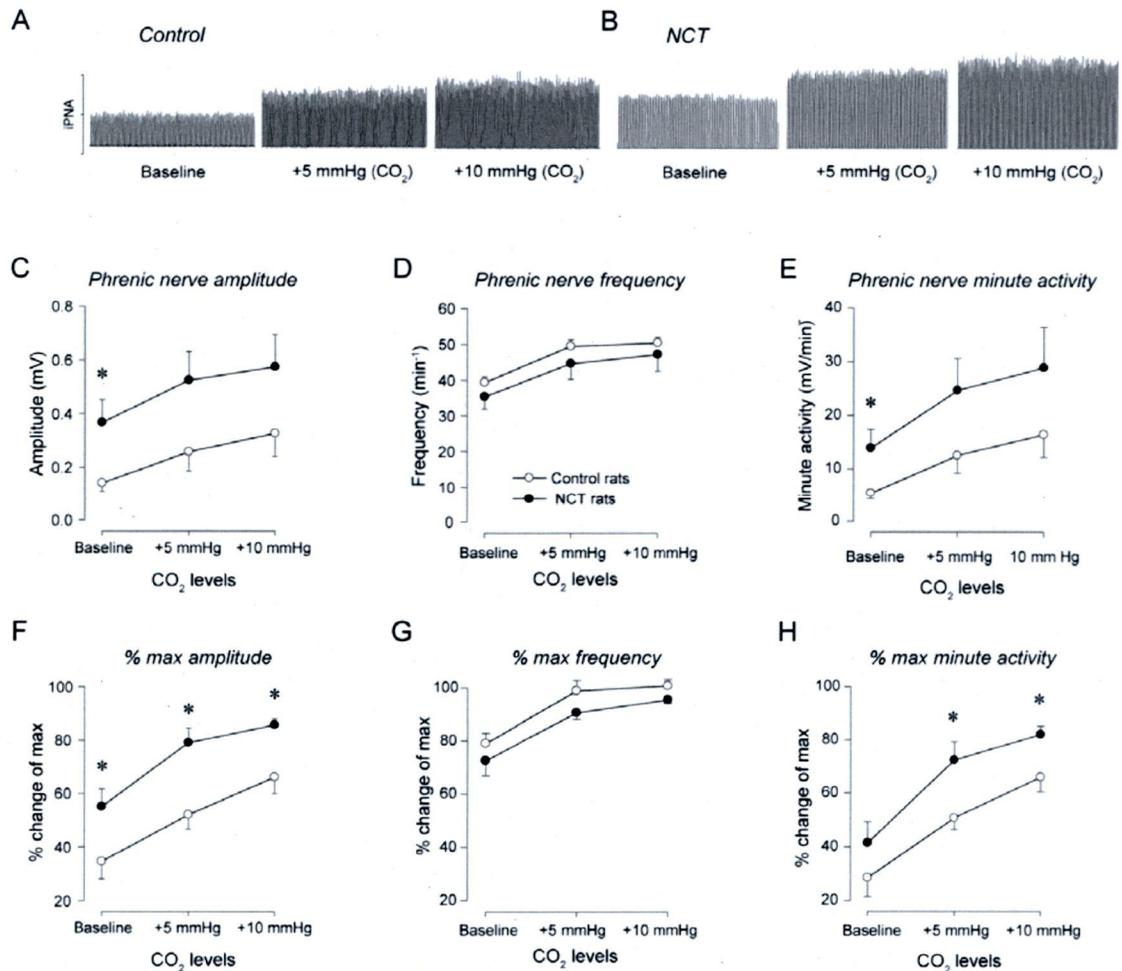


Figure 23. Representative integrated phrenic nerve activity of control (A) and NCT (B) adult male rats at different CO₂ levels (baseline, +5 mmHg, and +10 mmHg). Mean values of integrated phrenic nerve activity (C), phrenic nerve frequency (D), minute activity (E) at baseline, +5 mmHg, +10 mmHg in control (open circle, n=7) and NCT (neonatal caffeine treatment, black circle, n=7) adult male rats. Means of normalized data to value at CO₂ max (not shown in the figure) for phrenic nerve amplitude (F), phrenic nerve frequency (G), and minute activity (H). Values are expressed as means ± S.E. * represents value significantly ($p < 0.05$) different compared to control group. iPNA, integrated phrenic nerve activity.

5. DISCUSSION

This study shows that administration of caffeine during the neonatal period enhances integrated phrenic nerve amplitude at baseline and during hypercapnia, without affecting phrenic nerve frequency in anaesthetized adult rats. As a result, neonatal caffeine augments minute activity during hypercapnia; however, it does not affect CO₂ respiratory chemosensitivity. At baseline, there was no changes of heart rate and heart rate variability, whereas under hypercapnia heart rate and heart rate variability were higher in NCT than in control rats. We previously demonstrated that neonatal caffeine induces long lasting changes of breathing in unanaesthetized male adult rats (Montandon *et al.*, 2006a), here we showed that neonatal caffeine induces developmental plasticity of phrenic nerve activity in a way that differs from data in unanaesthetized rats and that alterations in cardiovascular functions might contribute to changes of ventilation in freely-behaving rats.

Neonatal caffeine increases integrated phrenic nerve amplitude under baseline conditions. This result is in keeping with our previous study showing that neonatal caffeine increased phrenic nerve amplitude at baseline and during hypoxia (Montandon *et al.*, 2008). In a similar way, phrenic nerve amplitude normalized to maximum amplitude was higher in NCT rats at baseline and at each CO₂ level, suggesting that this increase does not depend upon the method used to normalize amplitude in this study. Enhanced phrenic nerve amplitude by NCT might be due to changes of the expression of the adenosine A_{2A} receptors found at the level of phrenic motor nucleus (Zaidi *et al.*, 2006). In fact, increase of excitatory effect of adenosine A_{2A} receptor in this structure might contribute to the increase of phrenic nerve amplitude. It is also possible that a change occurs at the level of the spinal chord. Chronic theophylline (antagonist to adenosine receptors) induces recovery of phrenic nerve activity in rats with spinal chord hemisection (Nantwi *et al.*, 2003b).

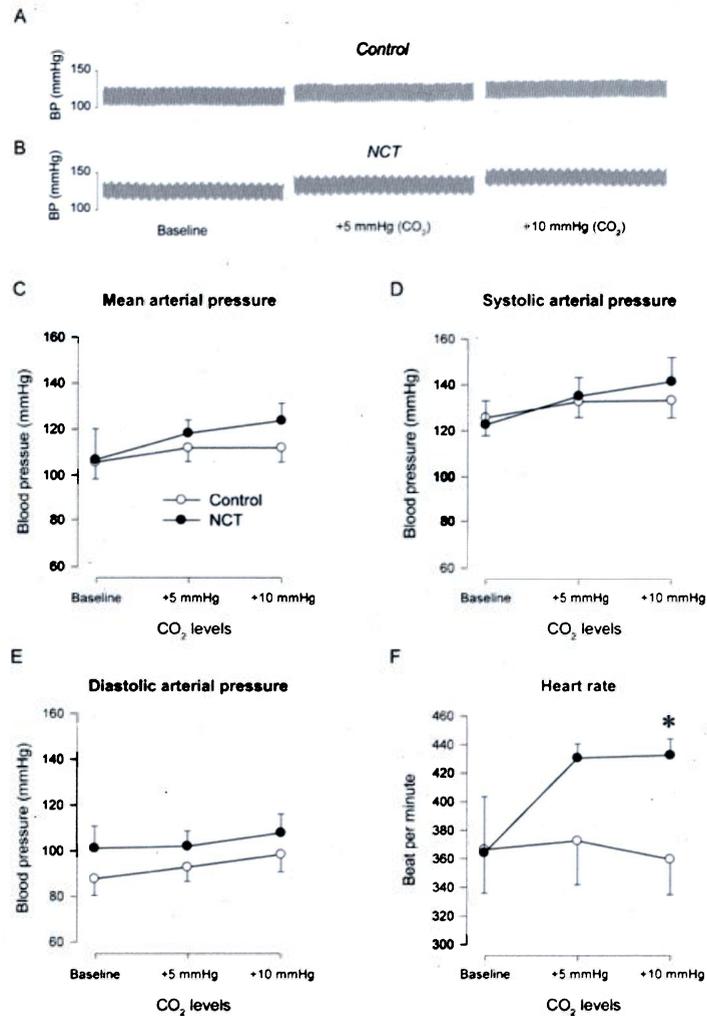


Figure 24. Representative and arterial blood pressure signals of control (A) and NCT (B) adult male rats at different CO₂ levels (baseline, +5 mmHg, +10 mmHg, and CO₂ max). Mean values of mean arterial blood pressure (C), systolic blood pressure (D), diastolic blood pressure (E), and heart rate (F) of control (open circle, n=7) and NCT (neonatal caffeine treatment, black circle, n=6) adult male rats. Values are expressed as means \pm S.E. * represents value significantly ($p < 0.05$) different compared to control group.

NCT enhanced phrenic nerve amplitude in anaesthetized rat, but no similar increases in tidal volume in freely-behaving rats were observed either at rest or during

hypercapnia (Montandon *et al.*, 2006a). These discrepancies between anaesthetized and freely-behaving animals can be explained by the fact that rats were anaesthetized, vagotomized, and mechanically ventilated in the present preparation. In fact, in a previous study, we also observed that an increase of phrenic nerve amplitude in anaesthetized rats was not necessarily accompanied by an elevated tidal volume in unanaesthetized rats (Montandon *et al.*, 2008). Also, in freely-behaving animals, the upper airway modulates lung ventilation by changing their resistance, whereas in anaesthetized rats the upper airway contribution was eliminated since we measured respiratory drive through phrenic nerve only.

In freely-behaving animals, neonatal caffeine increases tidal volume response to hypercapnia (Montandon *et al.*, 2006a). In the present study, phrenic nerve response to hypercapnia was not enhanced in NCT compared to control rats. First, anaesthesia may attenuate the increase of the hypercapnic chemoreflex observed in awake rats. Second, the fact that the vagus nerve was cut prevents sympathetic modulation of breathing by cardiovascular changes. In intact rats, enhanced heart rate during hypercapnia might contribute to changes in tidal volume through vagus nerve; an effect not observed in vagotomized preparation.

Despite the fact that cardiovascular parameters were not influenced by NCT during baseline, hypercapnia stimulated heart rate regulation and reveals long term changes in heart rate and heart rate variability in NCT rats compared to controls. Adenosine receptors are present in chemosensitive structures involved in heart rate regulation such as the RVLM (Bissonnette & Reddington, 1991) or the NTS (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004). Since activation of adenosine A₁ receptors decreases heart rate in the adult rat (Schindler *et al.*, 2005) and activation of adenosine A_{2A} receptors increases it (Schindler *et al.*, 2005), cumulative effects of hypercapnia and changes in adenosine receptor expression might explain this enhanced heart rate. In humans, adenosine increases heart rate and heart rate variability during exercise (Piot *et al.*, 1998), suggesting that adenosine receptor activation might also increase heart rate variability in addition to affect heart rate.

Neonatal caffeine induces long-lasting changes on phrenic nerve activity, but did not demonstrate an enhanced hypercapnic chemoreflex as we demonstrated in freely-

behaving rats (Montandon *et al.*, 2006a). This demonstrates that differences are observable between intact freely-behaving and anaesthetized rats, and that complementary approaches are required to understand the complexity of the respiratory control system. In addition to these respiratory changes, neonatal caffeine alters sympathetic activity, revealed by high heart rate and high heart rate variability, observable only during hypercapnia. In humans, high sympathetic activity during hypercapnia might predispose to long term cardiovascular diseases, such as hypertension (Schultz *et al.*, 2007), especially during sleep when hypercapnia is high. On the other hand, total heart rate variability reflects the ability of the cardiovascular system to adapt to external and internal changes, and an high heart rate variability is mostly observed in normal subject compared to patients suffering cardiovascular diseases (Task Force of the ESC and the NASPE, 1996). In that view, stimulated cardiac activity in NCT rats might be beneficial. Overall, neonatal caffeine appears to demonstrate diverse and multiple long-term influences on autonomous nervous functions that is not limited to respiratory control system activity, but also to cardiovascular activities.

ÉTUDE IV

NEONATAL CAFFEINE INDUCES SEX-SPECIFIC DEVELOPMENTAL PLASTICITY OF THE HYPOXIC RESPIRATORY CHEMOREFLEX IN ADULT RATS

Published in *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative, and Comparative
Physiol.* 2008, 295(3), R922-34.

Montandon Gaspard^{1&2}, Richard Kinkead¹, Aida Bairam¹

¹ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hôpital St-François d'Assise, Université
Laval, Québec.

² Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Ontario.

1. RÉSUMÉ

L'enfant prématuré possède à la naissance un système de contrôle de la respiration immature et présente des apnées du prématuré récurrentes qui sont traitées grâce à de larges doses de caféine. Cependant, les effets de la caféine, un antagoniste des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine, sur le système nerveux encore immature du prématuré sont peu connus. A l'aide d'un modèle animal présentant un développement similaire à celui de l'enfant prématuré, nous avons démontré qu'un traitement néonatal à la caféine (NCT, 15 mg/kg/jour) administré du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance provoque des effets persistants sur plusieurs aspects du contrôle de la respiration tels la ventilation et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de l'animal adulte. Cependant, on peut s'interroger sur l'impact à long terme de la caféine en période néonatale sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie ($FI_{O_2}=0.12$) et sur les mécanismes la contrôlant. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le rat conscient traité à la caféine (NCT) ou non (contrôle). La réponse de la fréquence respiratoire à l'hypoxie des rats NCT est plus élevée durant les premières minutes que celles des rats contrôles. Cet effet est spécifique au sexe puisqu'il est observé chez les mâles uniquement. L'évaluation de la réponse du nerf phrénique à l'hypoxie chez le rat anesthésié, ventilé, et vagotomisé confirme ce résultat puisqu'une augmentation plus prononcée de fréquence du nerf est observée durant l'hypoxie chez les rats mâles NCT. Afin de comprendre les mécanismes responsables de cette hypersensibilité respiratoire à l'hypoxie, l'évaluation par RT-PCR des niveaux d'ARNm codant pour les récepteurs A_1 , A_{2A} , dopamine D_2 , et de la tyrosine hydroxylase (TH) est réalisée dans les corps carotidiens, les principales structures chémoréceptrices à l'hypoxie. Des niveaux élevés sont observés pour l'ARNm des récepteurs A_{2A} , dopamine D_2 et TH dans les corps carotidiens des rats mâles adultes NCT. En conclusion, cette étude démontre que le NCT accentue la sensibilité de la fréquence respiratoire à l'hypoxie probablement en augmentant l'expression des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans les corps carotidiens. Ces données sont appuyées par le fait que la réponse à l'hypoxie des femelles est insensible au NCT et que les niveaux d'ARNm dans les corps carotidiens sont peu affectés par le traitement.

ABSTRACT

Caffeine is widely used to treat apneas of prematurity during the neonatal period. However, the potential impact of neonatal caffeine treatment (NCT) during a sensitive period in the development of the respiratory control system has not been studied extensively. We determined whether NCT administered to newborn rats alters the hypoxic respiratory chemoreflex at adult age. Newborn rats received either caffeine (15 mg kg^{-1}) or water (control) by oral gavage each day from postnatal day 3 to 12. The ventilatory response to hypoxic challenge ($F_{I\text{O}_2}=0.12$) was first evaluated in both NCT and control groups in freely-behaving adult female and male rats using whole body plethysmography. Results showed that NCT increased the initial phase of the breathing frequency response to hypoxia in males, but not in females. This result was confirmed in a second series of experiments which measured the phrenic nerve response to hypoxia in anaesthetized and artificially ventilated adult male rats. A third series of experiments used RT-PCR to assess the mRNA expression levels of adenosine A_1 , A_{2A} , dopamine D_2 receptors, and tyrosine hydroxylase in the carotid bodies of both groups of adult male and female rats. NCT enhanced mRNA expression levels of adenosine A_{2A} and dopamine D_2 receptors, and tyrosine hydroxylase in carotid bodies of males but not females. We conclude that NCT elicits a sex-specific increase in the hypoxic frequency response which is likely related, at least in part, to an increase in adenosine A_{2A} receptors in the carotid body.

2. INTRODUCTION

In the clinic, caffeine administration is acknowledged as an efficient treatment for respiratory instabilities and apneas commonly seen in premature newborn (Martin *et al.*, 2004). Caffeine is an adenosine receptor antagonist which is an effective and relatively safe ventilatory stimulant in this population, even when administered at high doses (Comer *et al.*, 2001; Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003; Marchal *et al.*, 1987). However, the use of such pharmacological agent during a critical period of development is a matter of concern for clinicians given its potential impact on CNS maturation (Finer *et al.*, 2006). Although several studies have addressed the consequences of perinatal caffeine exposure on numerous aspects of brain development (Gaytan *et al.*, 2006; Guillet & Kellogg, 1991a), relatively little is known about the possible consequences of this treatment on the developmental trajectory of the respiratory control system.

Despite the limitations inherent to animal research, the newborn rat remains a valuable model for developmental studies because at birth, the degree of CNS maturation of rats is less advanced than a full term human and corresponds well to that of a premature baby (Clancy *et al.*, 2001; Finlay & Darlington, 1995). Using a protocol which, in newborn rats, reproduced plasma caffeine levels measured in the clinic, we showed that chronic neonatal caffeine treatment (NCT; $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ from postnatal days 3 to 12) has no significant effect on “resting” ventilatory activity, but increases CO_2 chemosensitivity in young (20 days old) male rats (Montandon *et al.*, 2006a). This effect changed with maturation as in adult rats, NCT no longer augments the magnitude of the hypercapnic ventilatory response but modifies its pattern (tidal volume *versus* frequency) in males but not in females (Montandon *et al.*, 2006a). Subsequent results showed that NCT decreases ventilatory responsiveness to selective adenosine receptor antagonists thereby suggesting that changes in adenosinergic neurotransmission are involved (Montandon *et al.*, 2007). However, our understanding of the persistent effects of NCT on respiratory control development remains limited since other functional and mechanistic aspects of this system have not been explored.

The ventilatory response to hypoxia is the result of a complex interplay between peripheral chemosensory afferent signals and their integration at the CNS levels. Adenosine is an important modulator of this chemoreflex as hypoxia elicits adenosine release both at the central and peripheral (carotid body) level (Gourine *et al.*, 2002; Conde & Monteiro, 2004). Although the precise role of adenosine in regulating the hypoxic ventilatory response at the CNS level is still unclear (Gourine *et al.*, 2002; Koos *et al.*, 2005), data consistently show that adenosine stimulates carotid body activity (McQueen & Ribeiro, 1986), and that A_{2A} and A_{2B} receptors contribute to this effect (McQueen & Ribeiro, 1986; Conde *et al.*, 2006). These results, combined with our previous work, brought us to test the hypothesis that NCT alters the hypoxic ventilatory response in adult rats. Since the functional (respiratory) consequences of neonatal interventions on rats pups show important sexual dimorphism (Montandon *et al.*, 2006a; Genest *et al.*, 2004), this hypothesis was tested on adult male and female rats. To this aim, we first used whole body plethysmography to compare the hypoxic ventilatory response of adult, freely-behaving animals between control and NCT rats. Here, we used adult rats because preliminary experiments showed that neonatal caffeine had no effect on the hypoxic ventilatory response of younger rats. To complement this approach, we compared phrenic (inspiratory) responses to hypoxia using an anaesthetized, paralysed, and artificially ventilated rat preparation which allows better control of arterial blood gases and eliminates potential caveats associated with behavioural interference. Based on plethysmography results, these electrophysiological experiments were performed on males only. Finally, the impact of NCT on selected indicators of carotid body regulation such as adenosine receptor, dopamine receptor, and tyrosine hydroxylase mRNA expressions were assessed using RT-PCR analysis on organs harvested from adult male and female rats. Parts of these results were reported in abstract form (Montandon *et al.*, 2006b).

3. METHODS

3.1. *Ethical information*

The experimental protocols were approved by the Animal Care Committee at Laval University in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

3.2. *Mating and neonatal caffeine treatment.*

The study was performed on 66 male and 52 female adult (3-5 months-old) Sprague-Dawley rats. Mating and neonatal caffeine treatment (NCT) were performed according to our protocol (Montandon *et al.*, 2006a). Dam and male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles Rivers Canada (St-Constant, QC, Canada). All rats used in this study were born in our animal care facility. Rats were supplied with food and water *ad libitum* and maintained in standard laboratory conditions (21°C, 12:12h dark-light cycle: lights on at 08:00 and off at 20:00). Briefly, caffeine was administered by gavage, to half the pups of the litter (NCT group), each day from postnatal day 3 to 12 at 15 mg/kg (caffeine citrate, 30 mg/kg, Sabex, Boucherville, QC, Canada) in a volume of 0.05 ml 10g⁻¹ of body weight. The other half of the litter received water (control group) at the same volume. This caffeine dose results in plasmatic caffeine level of 13±3 mg l⁻¹ (Montandon *et al.*, 2006a), which is comparable to the level achieved in the clinic when caffeine is administered to newborns (Bairam *et al.*, 1987). In each study, experimental groups were composed of rats originating from at least two different litters to avoid litter-specific effects.

3.3. *Study 1. Effects of neonatal caffeine on the hypoxic ventilatory response.*

These experiments were conducted on 10 control male, 10 control female, 10 NCT male, and 10 NCT female adult (4-5 months old) rats. Measurements of inspiratory duration (T_I), breathing frequency (f_R), and tidal volume (V_T) in unrestrained rats were obtained by whole body flow-through plethysmography (model PLY3223, Buxco

Electronics, Sharon, CT, USA) as described previously (Montandon *et al.*, 2006a; Kinkead *et al.*, 2001). Body temperature was measured by telemetry with a transponder (E-mitter, Mini Mitter, Bend, Oregon, USA) implanted intraperitoneally one week before experiments (Montandon *et al.*, 2006a). Surgical implantation of transponder was done under anaesthesia with ketamine/xylazine (10/50 mg kg⁻¹) injected ip. Barometric pressure, flow rate, chamber temperature, humidity, and body temperature were used to express V_T in ml (Body Temperature Pressure, Saturated, BTPS) per 100 g of body weight according to standard equations (Mortola & Frappell, 1998; Drorbaugh & Fenn, 1955). Minute ventilation (\dot{V}_E) was calculated as the product of f_R and V_T and normalized according to body weight. Oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) and carbon dioxide production (\dot{V}_{CO_2}) were measured using an oxygen analyzer (model S-3A, Ametek, Pittsburgh, PA, USA) and carbon dioxide analyzer (model CD-3A, Ametek) and calculated according to the Fick principle and formulas $([O_2]_{IN} - [O_2]_{OUT}) \times Flow$ and $([CO_2]_{OUT} - [CO_2]_{IN}) \times Flow$ respectively used for an open-system (Mortola & Dotta, 1992). \dot{V}_{O_2} and \dot{V}_{CO_2} were expressed in ml min⁻¹ 100g⁻¹, Standard Temperature and Pressure, Dry (STPD).

Each rat was acclimated to the plethysmographic chamber for about 30 min before experimental recordings. Resting ventilatory and metabolic measurements were made when the rat was quiet but awake and breathing room air. However, should the animal appear to go to sleep (no active behavior for several minutes), we gently knocked on the chamber to ensure that the animal was awake during measurements. After 10 min of normoxic measurements (rest), a hypoxic gas mixture (FI_{O₂}=0.12; balance N₂) was delivered to the chamber for 20 min. Preliminary tests showed that at the onset of hypoxia, it took 2 minutes for FI_{O₂} to reach 0.12 within chamber. These two minutes were not presented in the figure since no ventilation changes were observed during this time.

3.4. Study 2. Impact of neonatal caffeine on phrenic nerve activity.

To compare the neural correlate of inspiratory motor output between control (n=7) and NCT (n=7) adult male rats (3-4 months-old), phrenic nerve activity was recorded as

previously described (Kinkead *et al.*, 2005b). Anaesthesia was induced using isoflurane (3%, $FI_{O_2}=0.5$, balance N_2). Rat's temperature was maintained between 37°C and 38°C with a thermoregulated blanket (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The trachea was cannulated and bilateral vagotomy was performed at midcervical level. The rat was then artificially ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). A venous femoral catheter was inserted for anaesthetic and fluid administration and an arterial femoral catheter was placed for blood pressure monitoring (Transbridge TBM4M-B, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA) and withdrawal of blood samples for arterial blood-gas analysis (model ABL-5, Radiometer Copenhagen, London, ON, Canada). Rats were slowly converted (~10 min) from isoflurane to urethane anaesthesia (1.6 g kg⁻¹, iv in distilled water), and were then paralyzed with pancuronium bromide (2.5 mg kg⁻¹, iv). Proper anaesthesia was confirmed by monitoring changes in heart rate and blood pressure in response to toe pinch. The end-tidal expiratory carbon dioxide partial pressure ($P_{ET}CO_2$) was measured using an in-line CO₂ analyzer (model 1265, Novamatrix-Respironics, Murrysville, PA, USA). The phrenic nerve was isolated unilaterally, using a left dorsal approach, cut distally, and desheathed. The nerve was submerged in mineral oil and placed on a bipolar silver recording electrode. Nerve activity was amplified (gain = 10,000; model 1700, AM-Systems, Everett, WA, USA), band-pass filtered (100 Hz to 10 kHz), and fed to a moving averager (model MA-821, CWE, Ardmore, PA, USA) before being digitized and recorded with a data acquisition system (IOX, EMKA Technologies).

After surgery, CO₂ apneic threshold for inspiratory (phrenic) activity was then determined by mechanically hyperventilating the rats until phrenic nerve activity ceased. Rate of the ventilator was then decreased progressively until phrenic activity returned and P_aCO_2 was set 2-3 mmHg above the apneic threshold. This procedure served to standardize baseline phrenic activity relative to its threshold rather than an arbitrarily predetermined P_aCO_2 level. Baseline phrenic activity was recorded under hyperoxia ($FI_{O_2} = 0.5$), and rats were exposed to moderate, isocapnic hypoxia ($FI_{O_2} = 0.12$) for 6 min. In these experiments, hypoxic exposure was shorter than in the previous series (plethysmography) because the dead space is smaller in mechanically ventilated rats and the hypoxic mixture reaches the

lungs more rapidly (seconds instead of minutes). The fact that the breathing frequency began to plateau after 2 minutes of hypoxia instead of 10 min illustrates this difference. Average values of phrenic nerve burst frequencies and amplitudes were obtained every 15 seconds and reported both in absolute values and expressed as a percentage change from baseline. Euthanasia was performed at the end of protocol by urethane overdose.

3.5. Study 3. Effect of neonatal caffeine on adenosine A_{2A} , dopamine D_2 , and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the carotid body.

Real-time RT-PCR was used for relative quantification of mRNA expression levels for adenosine A_1 , A_{2A} , dopamine D_2 receptors, and tyrosine hydroxylase (TH) mRNAs from carotid bodies harvested from male and female adult rats. These genes were chosen because caffeine is a non specific adenosine receptor antagonist for both receptor types and because of the functional interaction between adenosine and dopamine receptors at the level of central nervous system and carotid bodies (Fuxe *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2006). Moreover, it has been shown that chronic behavioural stress induced by neonatal maternal separation during neonatal period increased the carotid body expression level of dopamine D_2 receptors, and TH in males and female adult rats (Kinkead *et al.*, 2005c) but did not modify adenosine A_{2A} receptors expression level in either sex (Bairam & Carroll, 2005). Procedures for animal preparation, surgery, organ collection, and mRNA level estimations were similar to those described previously (Bairam *et al.*, 2006a; Kinkead *et al.*, 2005c). Experiments were realized on 32 male and 32 female adult rats of 3-4 months-old (n=16 for control and n=16 for NCT). Two pools each containing 16 carotid bodies from 8 rats were collected for control and NCT groups and for each sex. Briefly, each rat was anaesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (10/50 mg kg⁻¹) injected ip. Rats were rapidly tracheotomized and artificially ventilated with air. The carotid bodies were quickly removed and were then immediately frozen on dry ice and stored at -80 °C. Total RNA extraction as well as RT using random decamer primers for transcripts amplifications were done as previously described (Kinkead *et al.*, 2005c). Aliquots of 2 µl from the resulting single-stranded cDNA products were used along with the appropriate primers for the A_1 ,

A_{2A}, D₂, TH, or for 18S ribosomal RNA amplification (Table 12). Each amplification was run in separate wells with 2× SYBR Green Universal PCR Master Mix containing 100 nM of each of specific forward and reverse gene primers (total 25 µl). Primers were chosen using the Primer Express software program (version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Table 12). PCR amplification was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instruction. The 18S ribosomal RNA amplification was used to normalize the data for the difference in starting material and to test the efficiencies of RNA extraction and RT reactions for each sample. A total of six RTs were prepared from the two different RNA pools. Then, two PCRs were performed from each RT giving a total of 12 PCR reactions for each of amplified gene. The relative expression level of A₁, A_{2A}, D₂, or TH transcript was first normalized to 18S expression level obtained from the same cDNA sample following the standard curve method instructions as given by the manufacturer (User Bulletin, version 2, ABI PRISM 7700 sequence detection system, Applied Biosystem). Hence, an average normalized gene expression and standard error of the mean for each transcript studied for each group was calculated. Differences less than 10% was considered in the range of variability related to RT-PCR amplification and was not considered different even though statistical analysis was less than 5% ($P < 0.05$) (Bairam *et al.*, 2006a).

Table 12. Oligonucleotide primers selected for real-time PCR, expected length of the PCR products.

	Forward primers	Reverse primers	Length (bp)
A₁	5'-GAAGATCGCCAAGTCGC-3' residues (1105-1121) *	5'-GGGCAAAGAGGAAGAGGATGA -3' residues (1128-1148) *	77
A_{2A}	5'- CGTGGTGCCCATGAATTACA -3' residues (780-799) **	5'- GGCGTTAACACGAACGCAAAG -3' residues (816-836) **	57
D₂ common segment	5'- AAGCGCCGAGTTACTGTCATGAT -3' residues (791-813) ***	5'- GACAATGGAGGAGTAGACCACAAAGGC -3' Residues (908-934) ***	144
TH	5'- CTCAGAGCAGGATGCCAAGC -3' residues (421-440) ◊	5'- TGTCGCCGTCGGATGAA -3' residues (467-483) ◊	73
18S	5'- GTGACGGGGAATCAGGGTT -3' residues (407-425) ◊◊	5'- CCTTCCTGGATGTGGTAGCC -3' residues (453-473) ◊◊	67

Genebank ascession number for * (NM_017155); ** (NM_053294) ; *** (NM_012547); ◊ (NM_012740) and ◊◊ (X01117).

3.6. *Data analysis*

For plethysmographic measurements, average values of ventilatory variables were obtained on a min by min basis using DataAnalyst software (EMKA). For phrenic nerve measurements, average values of phrenic nerve frequency were obtained every 15 sec (DataAnalyst, EMKA) and were also expressed as a percentage change (relative change) from baseline to assess phrenic nerve response to hypoxia. Phrenic burst amplitude was analysed the same way. Showing both forms of data (absolute and % change from baseline) ensures that data interpretation is not biased by normalisation artefacts. For mRNA statistical analysis, results from 12 PCR reactions were used. Comparisons of ventilation at rest, metabolism, and baseline phrenic nerve activity between control and NCT rats were made using a one-way ANOVA (JMP 7, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Comparisons of the hypoxic responses between control and NCT rats were done with analysis of variance for repeated measure using a full factorial standard least square model (interaction: hypoxia × treatment, with hypoxia as repeated factor, JMP 7). This allowed us to compare

the slope of the response between control and NCT rats. To determine sex-specific impacts of NCT on the hypoxic response, we applied three-way ANOVAs with a full factorial standard least square model (interaction: hypoxia \times treatment \times sex, hypoxia as repeated factor). These tests were followed by least-significant mean difference Student's *t*-tests (indicated with * in Figures 25, 26, and 27). Differences between mRNA levels of control and NCT rats were tested using Wilcoxon rank-sum test since samples came from only two pools of carotid bodies and measurements were not independent. If not specified, *P* values reported in the text indicate ANOVA results of standard least square models or Wilcoxon rank-sum tests. Data were considered significantly different when $P < 0.05$ and were expressed using means \pm S.E.

4. RESULTS

4.1. *Study 1. Neonatal caffeine enhances hypoxic chemoreflex in freely-behaving adult rats*

To determine whether neonatal caffeine modifies the hypoxic chemoreflex in awake freely-behaving adult male and female rats, we first measured metabolism and breathing at rest and during hypoxia using whole-body plethysmography.

Metabolism. Table 13 summarizes data in control and NCT male and female adult rats at rest. In males, NCT did not change body weight, \dot{V}_{O_2} , \dot{V}_{CO_2} , \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} , \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} , and body temperature at rest (Table 13) as well as during hypoxic exposure (data not shown). In females, NCT did not change body weight and \dot{V}_{O_2} , but increased \dot{V}_{CO_2} by 20% (Table 13), decreased \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} at rest, and did not change \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} . NCT did not change body temperature in females. During hypoxia in females, there were no changes due to NCT in any of the indicators of metabolism (\dot{V}_{O_2} , \dot{V}_{CO_2} , and T_{body}).

Table 13. Resting ventilatory, metabolic, and body weight data in control and NCT adult male and female rats.

	Male rats		Female rats	
	Control (n=10)	NCT (n=10)	Control (n=10)	NCT (n=10)
Body weight, g	522 ± 31	494 ± 15	314 ± 16	320 ± 13
\dot{V}_{O_2} (STPD) ml min ⁻¹ 100g ⁻¹	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
\dot{V}_{CO_2} (STPD) ml min ⁻¹ 100g ⁻¹	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1 *
\dot{V}_E/\dot{V}_{O_2}	44 ± 4	41 ± 3	44 ± 5	32 ± 2 *
\dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2}	65 ± 6	62 ± 5	59 ± 6	46 ± 3
T_{body} , °C	37.0 ± 0.2	37.3 ± 0.4	37.9 ± 0.2	37.7 ± 0.1

\dot{V}_{O_2} , oxygen consumption; STPD, standard temperature and pressure, dry; \dot{V}_{CO_2} , carbon dioxide production, STPD; \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} and \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} , oxygen and carbon dioxide convection ratios respectively, T_{body} , body temperature. * $P < 0.05$ versus control. Values are expressed as means ± S.E.

Breathing. Representative plethysmographic recordings of ventilatory activity at rest and during moderate hypoxia ($FI_{O_2}=0.12$) in a control and a NCT male rat are presented in Figures 25a and 25b, respectively. In males, hypoxia increased respiratory frequency in control and NCT rats ($P < 0.001$, Figure 25c). The respiratory frequency in response to hypoxia was significantly higher in NCT compared to control rats (hypoxia × treatment, $P < 0.001$, Figure 25c) and post-hoc tests demonstrated that this between-group difference was present during the first 9 minutes of hypoxia only (Figure 25c). A similar effect was observed for T_I which was significantly lower in NCT rats in comparison with controls over the first 10 minutes of hypoxia (hypoxia × treatment, $P < 0.001$, Figure 25d).

Finally, \dot{V}_E and V_T were not changed by NCT either at rest or during hypoxia (Fig. 1e and 1f, respectively). In adult females, representative plethysmographic recordings of ventilation at rest and during hypoxia ($F_{I_{O_2}}=0.12$) in a control and a NCT rat are presented in Figures 26a and 26b. Similar to what was obtained in males, hypoxia increased f_R in both control and NCT groups (hypoxia effect: $P<0.0001$, Figure 26c). However, neither f_R , T_I , \dot{V}_E , V_T were modified by NCT (Figures 26c, 26d, 26e, 26f, respectively). The effects of NCT on the f_R and T_I responses to hypoxia were sex-specific (hypoxia \times treatment \times sex, $P=0.001$ and $P=0.004$, respectively).

4.2. *Study 2. Neonatal caffeine increases phrenic nerve activity in anaesthetized rats*

To determine whether neonatal caffeine elicits changes in phrenic nerve activity similar to those reported in unanaesthetized, freely-behaving rats, inspiratory (phrenic) motor output was compared between NCT and control under "baseline" and hypoxic conditions. Since in study 1, NCT had no effect on the hypoxic ventilatory response measured in females, these experiments were performed on anaesthetized (urethane 1.6 g kg^{-1} , iv) and paralysed (pancuronium bromide, 2.5 mg kg^{-1} , iv) male rats only. No additional doses of drugs were necessary.

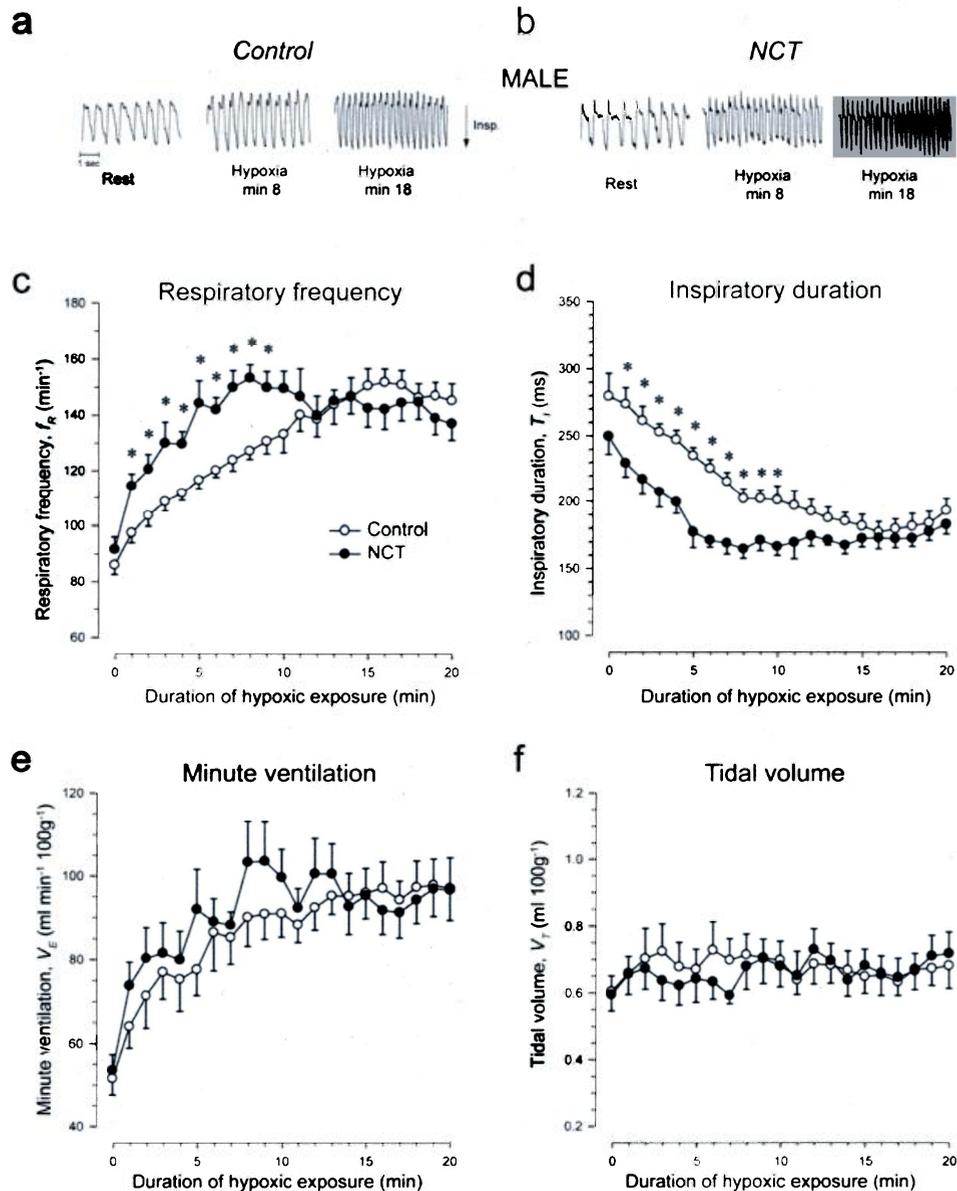


Figure 25. Respiratory activity at rest (normoxia) and during hypoxic exposure ($F_{I\text{O}_2}=0.12$) in control and NCT adult male rats. Representative plethysmographic recordings of respiratory activity at rest and at 8 and 18 min of hypoxia in a control (a) and a NCT male rats (b). Time-course of respiratory frequency f_R (c), inspiratory duration T_I (d), minute ventilation \dot{V}_E (e), and tidal volume V_T (f) at rest and during 20 min of hypoxia in control ($n=10$, open circle) and NCT ($n=10$, black circle). * represents data significantly different from control with $P<0.05$. Values are expressed as mean \pm S.E.

Blood gases. Table 14 presents arterial blood gases, pH, and body weight obtained in this series. CO₂ apneic threshold for phrenic activity did not differ between control and NCT rats (data not shown). Accordingly, baseline P_aCO₂, P_aO₂, and pH values were similar in both groups (Table 14). During hypoxia, P_aO₂ decreased to the same level for both groups (hypoxia effect: $P < 0.0001$); P_aCO₂ and pH remained at baseline levels for both groups, indicating that isocapnia was maintained during hypoxic stimulation. Finally, as observed in the previous series of experiment, NCT did not affect adult body weight (Table 14).

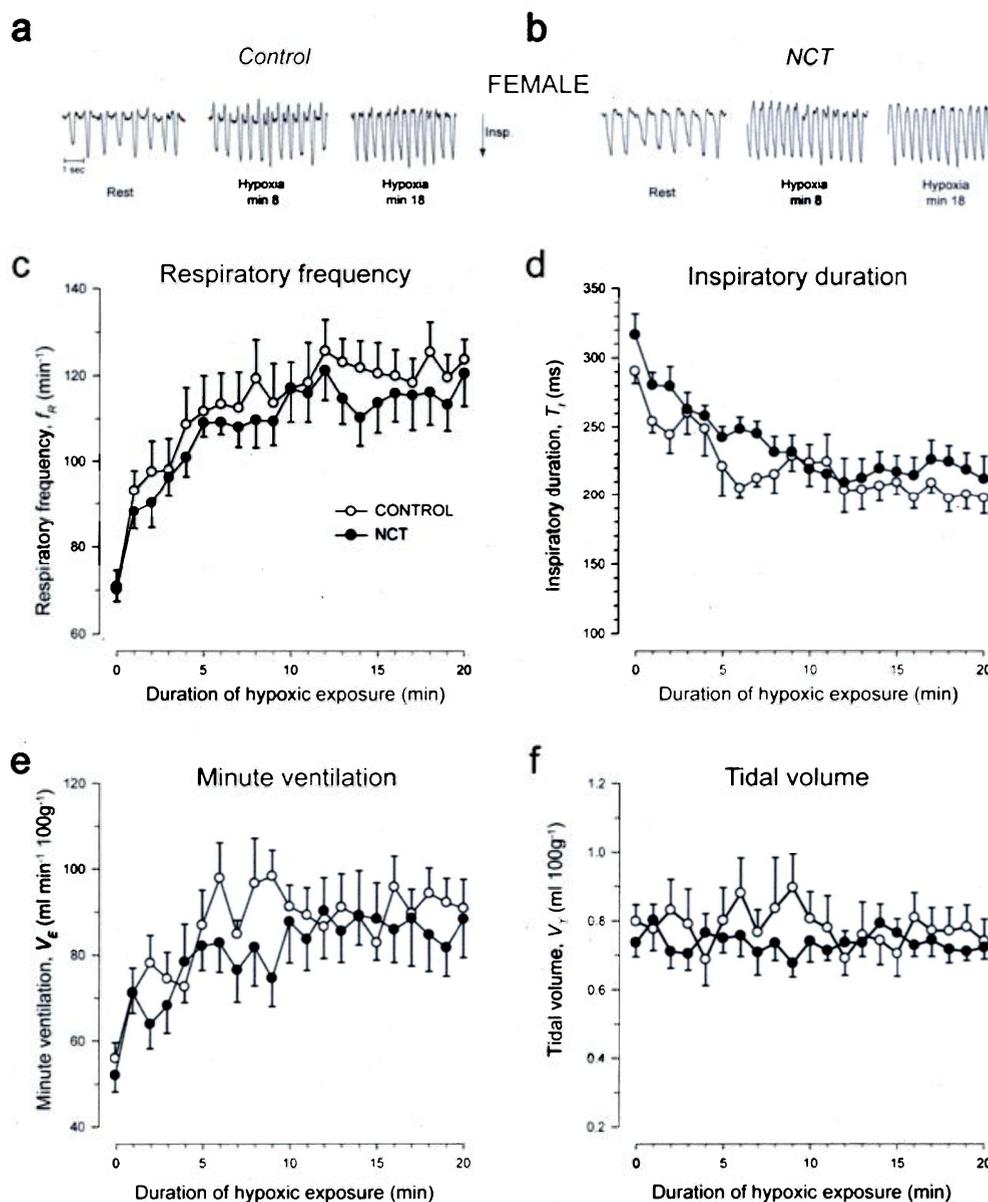


Figure 26. Respiratory activity at rest (normoxia) and during hypoxic exposure ($FI_{O_2}=0.12$) in control and NCT adult female rats. Representative plethysmographic recordings of respiratory activity at rest and at 8 and 18 min of hypoxia in a control (a) and a NCT female rats (b). Time-course of respiratory frequency f_R (c), inspiratory duration T_I (d), minute ventilation \dot{V}_E (e), and tidal volume V_T (f) at rest and during 20 min of hypoxia in control ($n=10$, open circle) and NCT ($n=10$, black circle). Values are expressed as mean \pm S.E.

Table 14. Arterial blood gases and pH during baseline and moderate hypoxia in control and NCT anaesthetized adult male rats.

	Control rats (n=7)		NCT rats (n=7)	
	Baseline	Hypoxia	Baseline	Hypoxia
P _a CO ₂ , mmHg	38.6 ± 2.1	37.1 ± 2.4	40.3 ± 1.1	38.3 ± 1.1
P _a O ₂ , mmHg	152 ± 8	41 ± 4 †	149 ± 8	40 ± 1 †
pH	7.34 ± 0.01	7.26 ± 0.02	7.32 ± 0.01	7.24 ± 0.02
Body weight, g	625 ± 26		656 ± 23	

P_aCO₂, arterial carbon dioxide pressure; P_aO₂, arterial oxygen pressure. * $P < 0.05$ versus controls. † $P < 0.05$ versus baseline. Values are expressed as means ± S.E.

Phrenic nerve activity. Representative recordings of phrenic nerve activity during baseline ($FI_{O_2}=0.5$) and moderate hypoxia ($FI_{O_2}=0.12$) for a control and a NCT anaesthetized adult male rat are shown in Figures 27a and 27b, respectively. During baseline and hypoxia, absolute phrenic burst frequency did not differ between control and NCT groups (Figure 27c). Relative change of phrenic nerve frequency was increased by NCT during the first minute of hypoxia (Figure 27d). The phrenic nerve frequency in response to hypoxia (both absolute and normalised) were higher in NCT than in control rats (treatment × hypoxia, $P=0.049$ and $P=0.026$, Figure 27c and 27d, respectively); these increases were only present during the first minute of hypoxia. During the following phase (min 1 to 6), however, phrenic frequency and relative change did not differ between control and NCT rats, demonstrating that NCT increased the hypoxic response during the onset of hypoxia only. Absolute phrenic burst amplitude recorded from NCT rats was greater than controls from baseline to min 1 of hypoxia (Figure 27e) and from min 3 to 6. However, relative change of phrenic nerve amplitude did not differ during hypoxia (Figure 27f). The hypoxic response of amplitude and relative change of amplitude were not changed by NCT

($P=0.076$ and $P=0.10$). Absolute minute activity (product of frequency and amplitude) was higher in NCT compared to control rats from min 0.5 to 1 (Figure 27g). Relative change of minute activity did not differ between control and NCT rats during baseline and hypoxia (Figure 27h). However, NCT increased the minute activity response to hypoxia (both absolute and normalised, hypoxia \times treatment, $P=0.016$ and $P=0.025$, respectively, Figure 27g and 27h).

Cardiovascular parameters. Representative blood pressure recordings are shown in Figures 28a and 28b for a control and a NCT rat. At rest, mean arterial blood pressure was lower in NCT rats compared to controls ($P=0.040$, Figure 28c), but was identical during hypoxia. Systolic blood pressure was not changed by NCT (Figure 28d) either at baseline than during hypoxia, whereas diastolic blood pressure was lower in NCT than in control rats at rest ($P=0.012$, Figure 28e) and during the last two minutes of hypoxia ($P<0.006$). Heart rate did not differ between control and NCT rats in control or NCT rats (Figure 28f) during baseline and hypoxia.

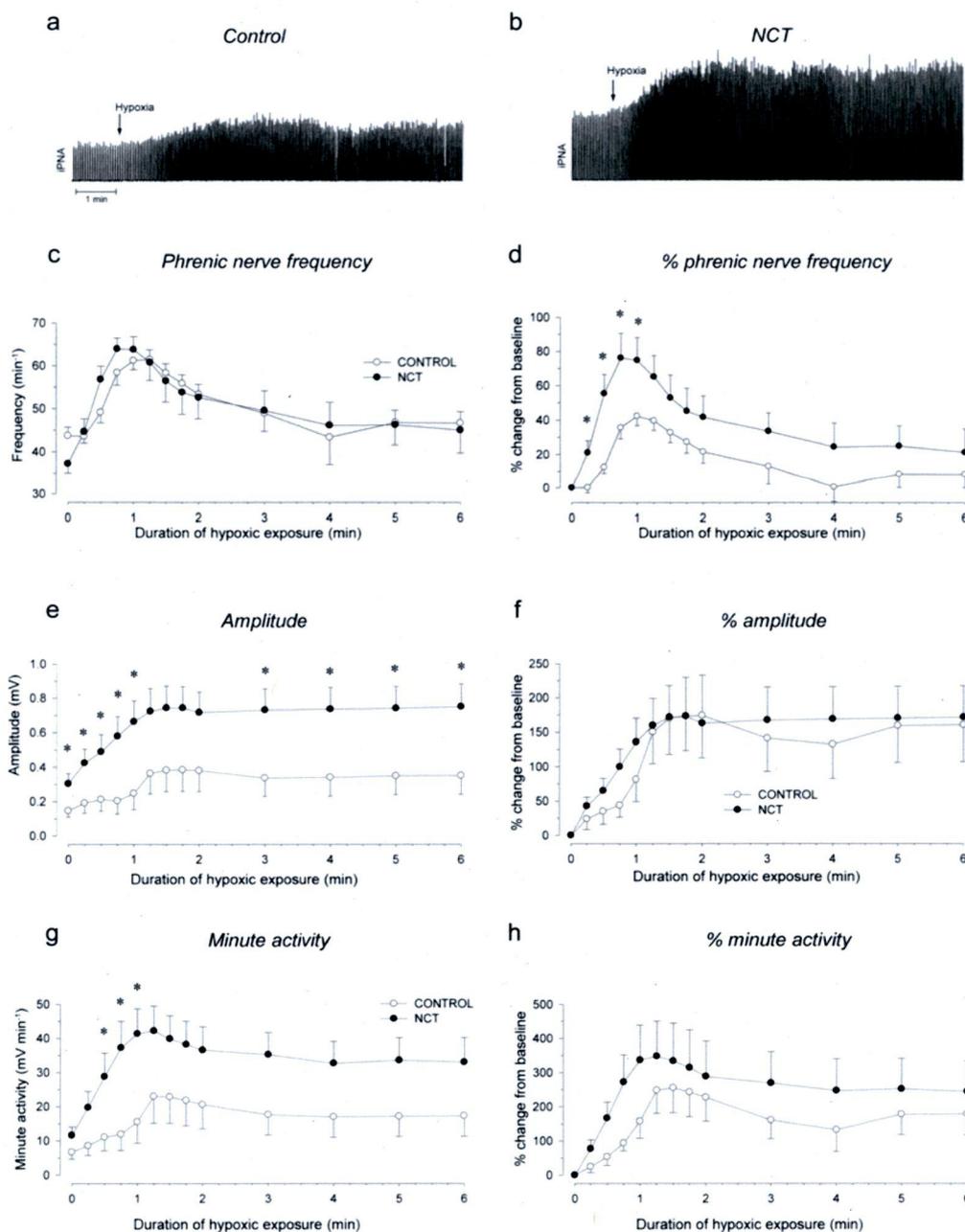


Figure 27. Inspiratory phrenic nerve activity in anaesthetized, paralyzed, vagotomized, and artificially ventilated adult male rat under baseline ($FI_{O_2}=0.5$) and during 6 minute of hypoxia ($FI_{O_2}=0.12$). Integrated phrenic activity in a control (a) and a NCT (b) rats. Phrenic nerve frequency in control ($n=7$, open circle) and NCT ($n=7$, black circle) rats (c). Relative changes of phrenic nerve frequency (compared to value at baseline) in control and NCT rats (d). Integrated phrenic nerve amplitude at baseline and during hypoxia (e).

Relative changes of phrenic nerve amplitude (f). Minute activity at baseline and during hypoxia (g). Relative changes of minute activity (g). * represents value significantly different from control with $P < 0.05$. Values are expressed as means \pm S.E.. iPNA, integrated phrenic nerve activity.

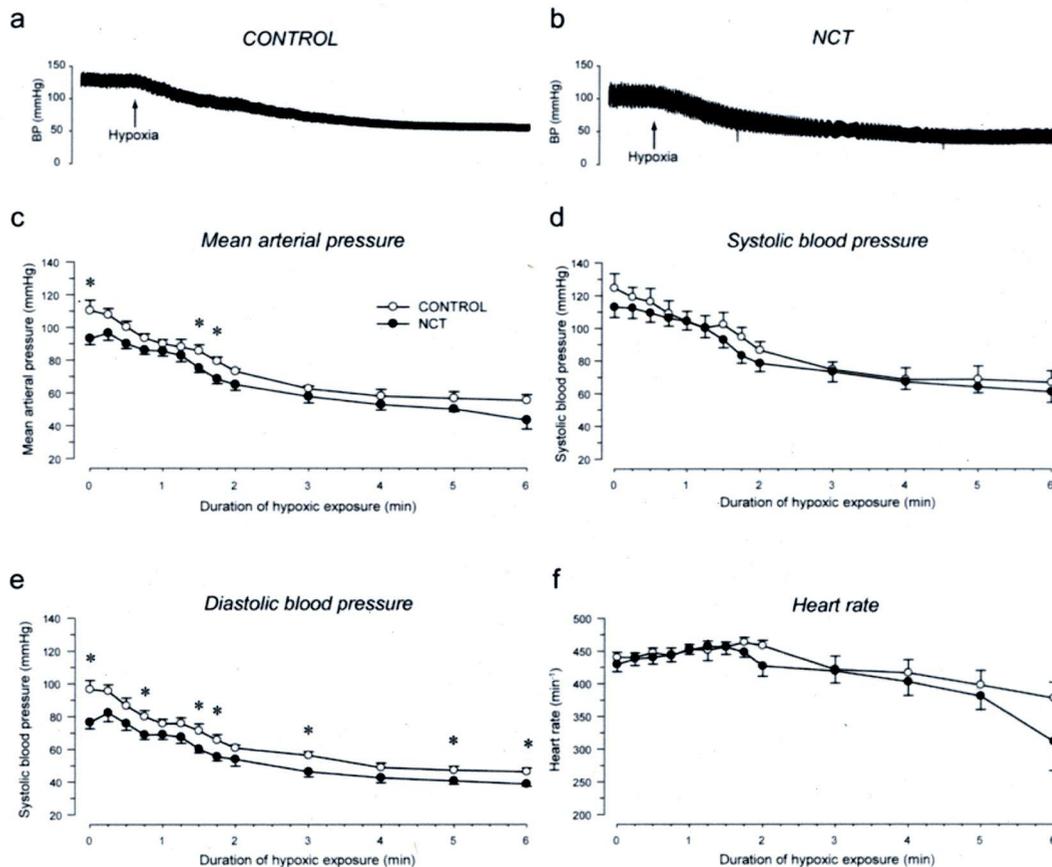


Figure 28. Arterial blood pressure in control and NCT adult male rats. Representative blood pressure recordings in anaesthetized, paralyzed, vagotomized, and artificially ventilated in a control (a) and a NCT (b) adult male rat under baseline ($F_{I_{O_2}}=0.5$) and during 6 minute of hypoxia ($F_{I_{O_2}}=0.12$). Mean arterial blood pressure (c), systolic blood pressure (d), diastolic blood pressure (e), and heart rate (f) in control (open circle, $n=7$) and

NCT (black circle, n=7) rats. * represents value significantly different from control with $P < 0.05$. Values are expressed as means \pm S.E.

4.3. Study 3. Neonatal caffeine augments mRNA levels of adenosine A_{2A} receptor, dopamine D_2 receptor, and tyrosine hydroxylase (TH) in the carotid body.

To determine whether neonatal caffeine affects indicators of adenosinergic and dopaminergic neurotransmission within the carotid bodies of adult rats, we compared expression levels of mRNA transcripts encoding for adenosine A_1 , A_{2A} receptors, dopamine D_2 receptors, and TH between control and NCT male and female rats. In male rats, NCT increased mRNA expression levels for adenosine A_{2A} receptors, dopamine D_2 receptors, and TH by 31%, 43%, and 35%, respectively (Figure 29a), but did not change levels of adenosine A_1 receptor mRNA. In female rats, NCT increased adenosine A_{2A} receptor mRNA level by 14% (Figure 29b), but did not change A_1 , D_2 receptor and TH mRNA expression levels. The increase in mRNA levels for dopamine D_2 receptor and TH in NCT males was sex-specific (two-way ANOVAs, sex \times treatment; $P = 0.0008$ and $P < 0.0001$, respectively). However, the tendency for greater enhancement of adenosine A_{2A} receptor mRNA expression in NCT males was not confirmed statistically (sex \times treatment, $P = 0.067$).

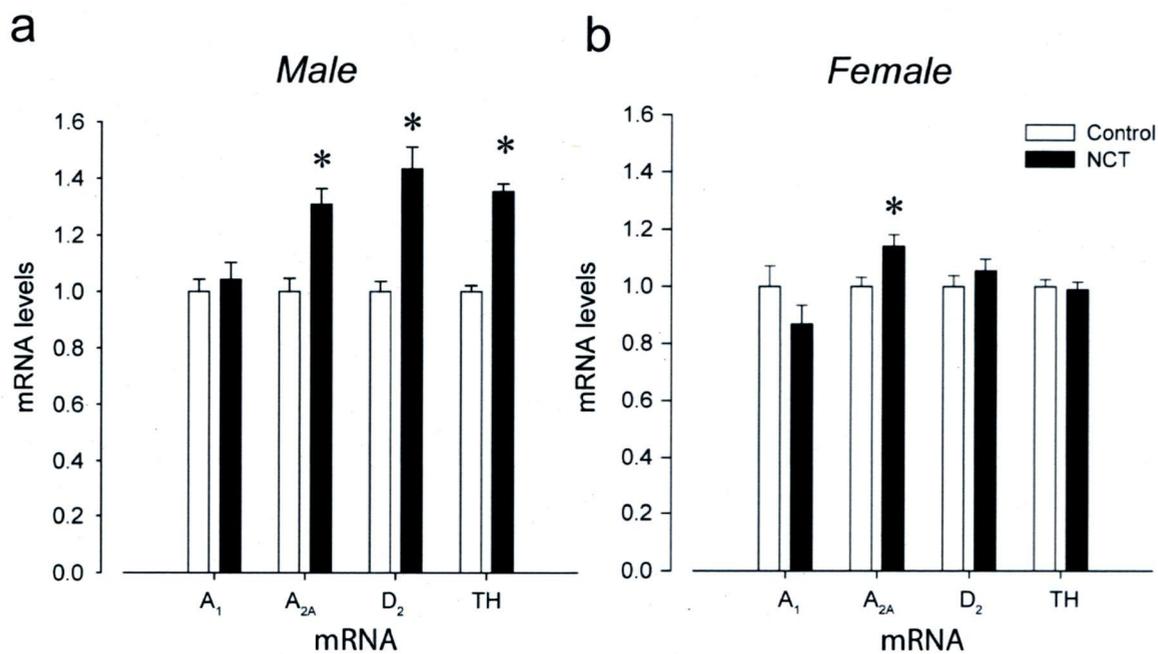


Figure 29. Relative quantification of mRNA expression levels of adenosine A₁ and A_{2A} receptors, dopamine D₂ receptors, and tyrosine hydroxylase (TH) in the carotid body of control (open bar) and NCT (black bar) adult rats. mRNA expression levels in the carotid body of males (a) and females (b). * $P < 0.05$ versus control. Data are expressed as means \pm S.E.

5. DISCUSSION

This study shows that chronic neonatal caffeine treatment (NCT) leads to long lasting, sex-specific (male only) enhancement of the breathing frequency response to moderate hypoxia. Despite important methodological differences, this effect was observed both in freely-behaving and anaesthetized adult rats. Although more experiments are required to identify the component(s) of the respiratory control system affected by NCT, the rapid dynamics of the response indicate that peripheral hypoxic chemosensitivity is likely enhanced by NCT (Powell *et al.*, 1998). This interpretation is supported by RT-PCR data showing that NCT increases adenosine A_{2A} receptor, dopamine D₂ receptor, and TH mRNA expression levels in the carotid bodies in a sex-specific manner also. While the functional implications of these results are still unclear, it suggests that NCT affects respiratory control development in a way which, in adult males, may compromise breathing efficiency and stability.

5.1. Critique of methods

The use of whole body plethysmography to measure ventilatory activity in freely-behaving rats has several limitations that preclude the conclusion that NCT persistently modifies the hypoxic ventilatory response. For instance, sleep-wake states were not determined during the recordings and the ventilatory response to hypoxia could be affected by a change in behaviour (change of sleep-wake states, increase of sniffing, movements, or other behaviour-related artefacts) rather than a change in respiratory output *per se* (Stephenson *et al.*, 2001). Furthermore, arterial blood gases were not controlled in freely-behaving animals and the enhanced hypoxic response observed above could be due to hypocapnia associated with hyperventilation rather than exposure to hypoxia itself (Day & Wilson, 2007). Although whole body plethysmography remains the best (least invasive) method currently available to measure ventilatory activity in awake rodents (Mortola & Frappell, 1998), its validity and accuracy are the subjected of much debate (Enhorning *et*

al., 1998; Szewczak & Powell, 2003; Lundblad *et al.*, 2002). Many of the limitations associated with whole body plethysmography were addressed by measuring phrenic activity in anaesthetized male adult rats for which many of these variables were better controlled. Results obtained with this approach confirmed data obtained in awake rats as we showed that NCT increases phrenic burst frequency response to hypoxia. However, we also observed that the minute activity response to hypoxia was higher in NCT compared to control rats; an enhancement was not observed in freely-behaving rats. These discrepancies between anaesthetized and freely-behaving rats might be due to the fact that isocapnia was maintained and vagotomy was performed in anaesthetized rats. Also the fact that in freely-behaving rats, the upper airway modulates lung ventilation by changing its resistance might explain why we did not find any differences in tidal volume between control and NCT rats. Despite these differences, both approaches suggest that the enhancement of the breathing frequency in response to hypoxia is likely due to an increase of the hypoxic chemoreflex rather than to sleep or behavioural and/or technical artefacts.

5.2. NCT-related enhancement of the acute frequency response to hypoxia in adult male rats: *putative mechanisms*

Peripheral vs central mechanism. The initial phase of ventilatory response to hypoxia involves distinct, but overlapping, peripheral and central mechanisms (Powell *et al.*, 1998). The immediate augmentation of ventilation at the onset of hypoxia (within a few breaths) reflects rapid detection of low P_{aO_2} by carotid body (Powell *et al.*, 1998) and the stronger frequency response seen in NCT rats suggests that carotid body function is affected by NCT. However, central brainstem structures, such as the nucleus tractus solitarius (NTS) that receive afferent information from peripheral chemoreceptors (Housley *et al.*, 1987; Finley & Katz, 1992) also play a significant role in the initiation and maintenance of the cardio-respiratory responses to hypoxia. The NTS is a brainstem region rich in adenosine receptors (Gaytan *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2000b; Rosin *et al.*, 1998; Carrettiero & Fior-Chadi, 2004) where adenosine is naturally released during hypoxia and could facilitate neurotransmitter release (e.g. norepinephrine and glutamate; (Sebastiao & Ribeiro, 1996). Consequently, changes in adenosinergic neurotransmission within the NTS

could also contribute to enhancement of the frequency response seen in NCT rats. However, adenosine release in the NTS occurs at least two minutes after the onset of the hypoxic stimulus (Gourine *et al.*, 2002) suggesting that adenosine is not implicated in the initial phase of the ventilatory response to hypoxia, but rather during the late phase (roll-off) of the hypoxic response (Koos *et al.*, 2005). While these observations do not exclude the possibility that other CNS structures relevant to respiratory control were affected by NCT, they prompted us to focus on the potential role of the carotid bodies.

Adenosine and carotid body. Adenosine is amongst the numerous neurotransmitters involved in the regulation of carotid body function during hypoxia. *In-vitro* studies have shown that hypoxia increases endogenous adenosine release from rat carotid body (Gonzalez *et al.*, 1994; Conde & Monteiro, 2004). Activation of adenosine A_{2A} receptors stimulates catecholamine release from *in-vitro* rat carotid body (Conde *et al.*, 2006), increases carotid sinus nerve activity of adult cats *in-vitro* (Runold *et al.*, 1990), and increases breathing in anaesthetized rats (Monteiro & Ribeiro, 1987). Together, these results indicate that adenosine has a stimulatory role in the carotid body which likely contributes to the increase in activity during a hypoxic challenge. The fact that systemic injection of adenosine accentuates the hypoxic ventilatory response in humans supports this interpretation (Maxwell *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1994). Adenosine A_{2A} receptors have been identified in the rat carotid body using either immunohistochemistry (Gonzalez *et al.*, 1994; Conde *et al.*, 2006), Northern blot (Bairam & Carroll, 2005; Bairam *et al.*, 2006b), or RT-PCR analysis (Kobayashi *et al.*, 2000; Bairam *et al.*, 2006b). Since adenosine A₁ receptors were only detected using RT-PCR (Bairam & Carroll, 2005; Bairam *et al.*, 2006b), this indicates that its expression level is very low in this structure. However, given that NCT had no effect on A₁ receptor mRNA expression level, its potential involvement at the peripheral level will not be addressed in the following discussion. Adenosine A_{2B} receptors have also been detected in the carotid body (Conde *et al.*, 2006), but adenosine has low affinity for this receptor subtype suggesting that its role in the hypoxic chemoreflex is minimal (Sebastiao & Ribeiro, 1996). Thus, adenosine A_{2A} receptors appear as the major excitatory adenosine receptor subtype in the carotid body as its activation increases the chemosensory response to hypoxia (Conde *et al.*, 2006) even though studies using the non-specific antagonist caffeine have shown contradictory effects

on chemosensory activity. Caffeine has no effect on chemosensory activity under basal condition of normoxia (Bairam *et al.*, 1997; Conde *et al.*, 2006), but it increases the chemosensory response to hypoxia of rat carotid body *in-vitro* (Conde *et al.*, 2006) while it has no effect on the *in-vivo* carotid body responses measured in newborn and adult cats (Bairam *et al.*, 1997). Methodological approaches, species differences and the type of caffeine administration may account for these differences.

In the present study, NCT rats showed an increase in mRNA expression levels of adenosine A_{2A} receptors, which may increase the final protein expression. It also suggests that an increase of adenosine A_{2A} receptor expression in the carotid body might contribute to the enhancement of the breathing frequency observed in NCT rats (freely-behaving or anaesthetized). In a previous study, we showed that blocking adenosine A_{2A} receptors with systemic injection of a specific antagonist decreases respiratory frequency at rest in control juvenile rats (Montandon *et al.*, 2007). Blocking of excitatory adenosine A_{2A} receptor at the level of the carotid body might explain, in part, this decrease. In NCT rats, however, the same dose of A_{2A} antagonist fails to reduce respiratory frequency. If adenosine A_{2A} receptor expression was increased by NCT in the juvenile carotid body, it is not surprising that the same dose of antagonist cannot completely block adenosine A_{2A} receptors and was not, therefore, able to decrease respiratory frequency at the same level than in control rats. Although, the functional aspect of A_{2A} receptor was not determined in the present study, the increased expression of these receptors in the carotid body of NCT group could contribute to the increase in breathing frequency response to hypoxia.

Dopamine and carotid body. It is generally admitted that dopamine inhibits the chemosensory activity in *in-vitro* or *in-vivo* studies (Iturriaga & Alcayaga, 2004; Bairam & Carroll, 2005; Gonzalez *et al.*, 1994). Both dopamine D₂ receptors and TH (rate-limiting enzyme for dopamine synthesis) mRNAs are increased in the carotid body of NCT male rats. It is likely that this increase helps reduce or control the stimulatory role of adenosine A_{2A} receptors on carotid body function. Excitatory and inhibitory transmitters in the carotid body may act as a “push-pull mechanism” to regulate carotid body activity as recently proposed (Prabhakar, 2006). Finally, we are not neglecting the fact that adenosine A_{2A} receptor gene was also increased in NCT females. However, this increase was not

associated with any changes in carotid body dopaminergic system indicators and in the ventilatory response to hypoxia. If any effect should be present, it seems minimal in comparison to what was observed in male NCT rats.

5.3. Cardiovascular changes due to NCT

Unlike in the freely-behaving model, anaesthetized rats allowed us to measure blood pressure without imposing further stress on the animal. We observed a significant decrease of mean arterial blood pressure at baseline owing to a reduced diastolic blood pressure. As mentioned previously, adenosine plays a critical role in cardiovascular regulation both at the central and peripheral levels (Scislo & O'Leary, 2005; Schindler *et al.*, 2005). Injections of a specific adenosine A_{2A} receptor agonist within the NTS decreases mean arterial blood pressure as well as sympathetic nerves activity (Schindler *et al.*, 2005; Barraco *et al.*, 1991). Thus, an increase of adenosine A_{2A} receptor expression in the NTS and/or periphery due to NCT could potentiate the depressing effect of adenosine on blood pressure. In the present study, the fact that NCT reduces diastolic pressure suggests that peripheral resistance is reduced in these rats, which is consistent with the effects of adenosine on sympathetic nerve activity described previously (Scislo *et al.*, 2001).

5.4. Sex-specificity

The present study is not the first to report sex-specific changes in ventilatory control following NCT. We previously showed that NCT induces sex-specific (male only) long-term effects on the hypercapnic ventilatory response of young and adult rats (Montandon *et al.*, 2006a). NCT did not change the hypercapnic ventilatory response of young female rats (20 days old) well before apparition of the oestrus cycle, which suggests that this sex-specificity does not depend on the surge of gonadal hormones that takes place during puberty, but rather on the hormonal milieu during the neonatal period. While the mechanisms of this sex-specific plasticity are still unclear and are beyond the scope of this study, a similar sex-specific sensitivity to caffeine exposure has been observed in humans.

For instance, high consumption of caffeine during pregnancy leads to a higher number of small-for-gestational-age boys, but not girls (Vik *et al.*, 2003). At adulthood, the role of sexual hormones on the long-term expression of the respiratory effects of NCT need further investigation..

5.5. *Putative mechanisms of caffeine-induced plasticity*

Chronic exposure to adenosine receptor antagonist caffeine in mice increases adenosine receptor binding in the whole brain (Boulenger *et al.*, 1983; Marangos *et al.*, 1984). More precisely, chronic exposure to caffeine enhances adenosine A₁ receptor binding in the mouse hippocampus and adenosine A_{2A} receptor binding in the mouse striatum (Johansson *et al.*, 1997b). Chronic exposure to theophylline, an other adenosine receptor antagonist, in adult rats increases adenosine A₁ receptor binding in the cortex (Fastbom & Fredholm, 1990; Murray, 1982) and in the cerebellum, the hippocampus, and the thalamus (Lupica *et al.*, 1991). This suggests that chronic inactivation of adenosine receptors enhances functional expression of these receptors. During the neonatal period, chronic caffeine exposure modifies adenosine A₁ receptor expression in adult rat cortex, cerebellum, and hippocampus (Etzel & Guillet, 1994; Guillet & Kellogg, 1991a). It has been proposed that when caffeine occupies the adenosine receptor's binding site, the number of receptors increases to maintain the efficiency of adenosinergic systems (Boulenger *et al.*, 1983). Here, we reported an increase of adenosine A_{2A} receptor mRNA expression in the carotid bodies of NCT male rats. While we are aware that an increase in mRNA expression does not necessarily lead to increase in protein receptor level, the increase in breathing frequency response observed at the onset of hypoxia is consistent with a greater expression in protein level (A_{2A} receptors) in the carotid body. Also, it is possible that NCT might change the cell-type composition of the carotid bodies - more type I cells in NCT rats - instead of modifying adenosine A_{2A} receptor expression. This effect might result in an increase of adenosine A_{2A} receptor mRNA expression in the whole carotid body. However, in mice, chronic caffeine administration enhances mRNA level of adenosine A_{2A} receptors, as well as binding of agonists to adenosine A_{2A} receptors in specific brain areas (Johansson *et al.*, 1997b), suggesting that the functional role of adenosine A_{2A} receptors was affected by chronic caffeine. Despite several experimental

differences with the above mentioned studies, our results suggest that NCT preferentially increases adenosine A_{2A} receptor expression in the carotid body, an effect that persists until adulthood.

5.6. *Clinical relevance*

The respiratory control system is tightly regulated to respond appropriately to arterial blood gas fluctuations. If breathing increases too quickly and vigorously during hypoxia, it could lead to destabilization of ventilation and might, therefore, provoke respiratory instabilities (White, 2006; Kara *et al.*, 2003). Previous studies demonstrate that hypoxia or hypercapnia are initiators and perpetuators of breathing instabilities, such as obstructive (Warner *et al.*, 1987) and central sleep apneas (Javaheri, 1999). We demonstrated that neonatal caffeine increases hypoxic chemosensitivity, and we previously showed that it modifies the pattern of the hypercapnic ventilatory response (Montandon *et al.*, 2006a; Montandon *et al.*, 2007). Cumulative, long-term changes of chemosensitivities due to neonatal caffeine might therefore predispose to respiratory instabilities especially during sleep. However, this hypothesis remains to be addressed.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Foundation for the Research into Children' Disease and the Canadian Institutes of Health Research (operating grant MOP-81101 to A. B.). R.K. holds the Canada Research Chair in Respiratory Neurobiology. G.M. was supported by PhD awards from the Foundation for the Research into Children' Disease and the J.-and-J.-L.-Levesque Perinatology Chair. The authors thank Yves Lajeunesse for his technical assistance with RT-PCR. We also thank Evelyne Vachon and Sylvie Viger responsible for day to day animal care and gavage procedure.

ÉTUDE V

NEONATAL CAFFEINE INDUCES LONG-LASTING CHANGES ON SLEEP AND BREATHING IN FREELY-BEHAVING ADULT RATS

Manuscript In preparation

Montandon Gaspard^{1&2}, Aida Bairam², Richard L. Horner¹, Richard Kinkead²

¹ Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Ontario.

² Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hôpital St-François d'Assise, Université Laval, Québec.

1. RÉSUMÉ

À la naissance, le nouveau-né prématuré possède un système nerveux immature et est fréquemment victime de désordres respiratoires tels que l'apnée caractérisée par un arrêt de la respiration pouvant, dans certains cas, être mortel. Afin d'éliminer ces apnées, un traitement à base de caféine est administré au nourrisson pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines. Or, parce que le système nerveux de l'enfant prématuré est immature et sensible, il est probable que le traitement néonatal à la caféine (NCT) induise des effets permanents persistant jusqu'à l'âge adulte. Nous avons démontré récemment, à l'aide d'un modèle animal, que le NCT modifie le comportement respiratoire du rat adulte. Parce que la caféine bloque les récepteurs de l'adénosine, une substance endogène impliquée dans la régulation du sommeil, on peut s'interroger sur les conséquences à long terme du NCT sur l'architecture du sommeil du rat adulte. Le NCT consiste à administrer aux ratons du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance chaque jour une dose de 15 mg/kg. Les mesures sont effectuées à l'âge adulte grâce à l'implantation d'un système de télémétrie permettant d'évaluer les stades d'éveil-sommeil tout en mesurant la ventilation par pléthysmographie. Nous observons chez le rat adulte NCT un sommeil à ondes lentes plus court et plus fragmenté que chez le rat contrôle. De plus, l'estimation de la ventilation à chaque stade d'éveil-sommeil montre que le rat NCT possède une ventilation plus prononcée, en particulier durant le sommeil. Également, nous montrons lors du sommeil du rat adulte NCT, une augmentation de la variabilité respiratoire accompagnée d'une diminution des désordres respiratoires tels que les apnées. Ces résultats permettent de dresser un tableau complet de l'impact de la caféine néonatale sur le comportement du rat conscient plusieurs mois après le traitement qui suggère que le traitement altère plusieurs systèmes de contrôle de façon permanente.

ABSTRACT

At birth, premature newborns present an immature nervous system and they suffer from apnea of prematurity. These apneas are treated with caffeine, an adenosine receptor antagonist, that stimulates breathing and decreases apnea occurrence. Since adenosine is an endogenous sleep factor, we tested the hypothesis that neonatal caffeine treatment (NCT) will induce dysregulations of sleep and breathing in the adult rat. We measured sleep and breathing in adult control and NCT rats (15 mg/kg/day from postnatal day 3-12) with a telemetry system and measured simultaneously ventilation by whole-body plethysmography. NCT adult rats spent less time during non-REM sleep and presented a fragmented non-REM sleep compared to control rats. Estimation of ventilation for each sleep-wake states demonstrated that ventilation during sleep was higher in NCT rats than in controls. Also, NCT rats had higher breathing variability, but less apneas than control rats during sleep. This study demonstrates that neonatal caffeine, in addition to alter respiratory control in awake and sleeping rats, also provoke dysregulation of sleep in the adult. This is of considerable importance since insomnia is frequently associated with cardiovascular pathologies.

2. INTRODUCTION

Development of the mammalian nervous system begins early in gestation and does not achieve “adult form” until several months or years after birth. During development, the nervous system is shaped by various complex interactions and may be influenced by multiple environmental factors, such as stress (Genest *et al.*, 2004), asphyxia (Gozal & Gozal, 2001), and pharmacological therapies (Carroll, 2003). Since gestation and infancy are times during which the nervous system is particularly sensitive to experience, exposure to drugs may lead to long-term changes of the nervous system that persist into adulthood. For instance, premature newborns present at birth an immature respiratory control system and are subject to apneas of prematurity. To reduce apnea, caffeine, an adenosine receptor antagonist, is commonly administered to these newborns (Hascoet *et al.*, 2000; Bhatt-Mehta & Schumacher, 2003), but the long-term impact of this treatment on neurological development is unknown (Finer *et al.*, 2006). Since the newborn rat has, during the first week of life, a similar development than a premature human newborn before birth (Clancy *et al.*, 2007), this animal model has been used to test the long-term impact of neonatal caffeine on brain development. Neonatal caffeine, when administered from postnatal day 2 to 6, increases adenosine A₁ receptor expression in the brainstem of rat pups (Gaytan *et al.*, 2006), and in the cerebellum, hippocampus, and thalamus of adult rats (Etzet & Guillet, 1994). Caffeine in the neonatal period also induces long-lasting modifications in the behaviour of adult rats, where these animals show enhanced locomotor activity in response to caffeine (Guillet, 1990) and decreased capacity for learning a task (Fisher & Guillet, 1997), further demonstrating that alterations of adenosine receptor expression leads to long-lasting functional changes.

Adenosine is an endogenous neuromodulator that regulates sleep-wake states (Basheer *et al.*, 2004). Inactivation of adenosine receptors by caffeine administration promotes wakefulness in the adult mouse (Fredholm *et al.*, 1999b). It has been shown in knockout mice for adenosine receptor genes that caffeine acts most likely on adenosine A_{2A} receptors (Huang *et al.*, 2005). In the premature newborn, caffeine administration presents similar effects since it disturbs and fragments sleep (Hayes *et al.*, 2007). These effects are

attributed to acute inactivation of adenosine receptors and it has been well characterised. However, little is known about the long term, persistent effect of caffeine treatment administered during the neonatal period on sleep-wake behavior later in life.

We previously showed that caffeine exposure during the postnatal period - with a similar dose that is used in the clinic in human to treat apnea of prematurity - modifies the respiratory control system of the adult rat. Chronic administration of caffeine from postnatal day 3 to 12 (neonatal caffeine treatment, NCT) changes the developmental trajectory of the hypercapnic respiratory chemoreflex in juvenile and adult rats (Montandon *et al.*, 2006a) and modifies adenosine A₁ receptor functions in juvenile rats (Montandon *et al.*, 2007). The same treatment increases the hypoxic respiratory chemoreflex in the adult rat, in part, by enhancing adenosine A_{2A} receptor expression in carotid bodies (Montandon *et al.*, 2008). This clearly demonstrates that NCT persistently modifies the respiratory control system of the adult rat. Since these previous studies were performed in awake or anaesthetized animals, breathing in adults previously treated with caffeine during the postnatal period might differ in natural sleep. Sleep exerts important clinically significant effects on breathing and its variability (Phillipson & Bowes, 1986), and most breathing disorders, such as obstructive and central apneas, occur during sleep (White, 2006), suggesting that NCT might affect differently breathing during sleep than during wakefulness.

The aim of the present study was to determine whether caffeine, a drug used to treat apnea of prematurity and administered during a sensitive period of rat development, will lead to long-lasting plasticity of sleep-wake regulation and control of breathing across sleep-wake states in freely-behaving adult rats. Accordingly, we measured sleep-wake states, ventilation, breathing variability, and the occurrence of apneas across sleep-wake states during room air. Since CO₂ is also known to modulate both sleep and breathing stability (Krimsky & Leiter, 2005), we also evaluated NCT-induced effects on sleep and breathing during respiratory hypercapnic challenge, and compared the breathing changes due to hypercapnia between control and NCT rats.

3. METHODS

3.1. *Animal mating and neonatal caffeine treatment*

Mating. The study was performed on 16 Sprague-Dawley male adult (3-4 months old) rats. All animals were born in the animal care facility of St-François d'Assise Hospital (Laval University, Québec, Canada). Dams and males were obtained from Charles Rivers Canada (St-Constant, Québec, Canada). Rats were supplied with food and water ad libidum and maintained in standard laboratory conditions (21°C, 12:12h dark-light cycle: lights on at 07:00 and off at 19:00). Laval University Animal Care Committee approved the experimental procedures and all protocols were in accordance with the guidelines outlined by the Canadian Council on Animal Care.

Neonatal caffeine treatment (NCT). Dams delivered 10 ± 2 pups. Only males were used in this study, but the litter size was kept constant at 12 pups by keeping females from the litter. There were 6 ± 2 male pups in each litter. Administration of caffeine was as previously described (Montandon *et al.*, 2006a). Briefly, caffeine was administered by gavage each day from postnatal day 3 to 12 at 15 mg/kg (Caffeine citrate, 30 mg/kg, Sabex, Boucherville, QC, Canada) in a volume of 0.05 mL/10g body weight (neonatal caffeine treatment, NCT, n=8). Another group received water (control group, n=8) at the same volume. This dose of caffeine is known to ensure plasma caffeine level of about 13 mg/L (Montandon *et al.*, 2006a), which corresponds to levels measured in premature newborns during caffeine treatment (Leon *et al.*, 2007).

3.2. *Surgery*

Animals were implanted with a three-channel radio transmitter (model TL10M3F50-EET, Data Sciences International, St-Paul, MN, USA) that allows continuous measurements of the electroencephalogram (EEG), neck electromyogram (neck EMG), and body temperature (T_{body}) in freely-behaving rats as previously described (Stephenson *et al.*, 2001). Sterile surgery was performed under anesthesia (isoflurane: 3-3.5%; oxygen: 50%) one week before measurements. During surgery, body temperature was maintained between 37°C and 38°C with a thermoregulated blanket (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

Mid-line incisions were made in the scalp and the abdomen to expose the skull and peritoneal cavity, respectively. A telemetry probe (model FET-50EEG, DataScience, Bethesba, USA) was placed inside the peritoneum and sutured behind the internal wall of the cavity with non-absorbable 3-0 silk. The electrode leads were tunnelled subcutaneously from the abdominal cavity to the neck, and the abdomen was closed and sutured with 3-0 vicryl silk. The rat was placed in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Tujunga, California, USA), the head was immobilised with blunt ear bars, and a mask was placed over the snout for administration of isoflurane anaesthesia. Two of the electrodes from the telemetry unit were sutured to the dorsal neck muscle for electromyographic recording. Three holes were drilled into the skull, two EEG wires and a reference electrode were attached with stainless steel screws (size 0-80X1/16, Plastic One Inc, Roanoke, VA, USA). The EEG electrodes were placed approximately 2 mm to the right and 2 mm anterior to bregma, and 2 mm to the left and 3 mm posterior to bregma, respectively. The reference electrode was placed 3 mm to the left and 5 mm anterior to bregma. Dental acrylic was used to affix electrodes and screws to the skull. The skin incision was then closed with 3-0 vicryl silk. Post-surgical care consisted of three subcutaneous injections of anti-inflammatory (ketoprofen, 2 mg/kg): immediately after surgery, 24h and 48h post-op.

3.3. *Protocol and measurements*

Experimental protocol. On the day of the experiment, the telemetry probe was activated with a magnet over the rat, and the animal was then placed at 9:00AM in the plethysmographic chamber for 1 hour of acclimation. Data recording always started at 10:00 and EEG, neck EMG, body temperature, and breathing were measured simultaneously for 3 hours. At 1:00PM, a hypercapnic gas mixture ($F_{I\text{CO}_2}=0.05$, $F_{I\text{O}_2}=0.2$, balance N_2) was delivered to the plethysmographic chamber at a flow rate of 2 l/min for 1 hour.

Recordings. Electroencephalography, neck EMG, and body temperature were collected through the telemetry receiver (RPC-1, Data Sciences International) placed under the plethysmographic chamber. Analog signals were digitized with a data acquisition

system (WinDAQ, DATAQ Instruments Inc, Akron, OH, USA) at a sample rate of 1 kHz. Breathing was obtained by whole body flow-through plethysmography (model PLY3223, Buxco Electronics, Sharon, CT, USA) according to our standard method (Montandon *et al.*, 2006a). Barometric pressure, flow rate, chamber temperature and humidity were also measured to express V_T (BTPS) in ml (Montandon *et al.*, 2006a).

3.4. Data analysis

Sleep-wake states. In 20-s epochs, EEG and neck EMG recordings (Figure 30A) were analyzed visually to determine sleep-wake states according to standard sleep scoring for rats (Morrison *et al.*, 2003). Customised scripts under Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) were made to analyze for each 20-s epoch: mean integrated EMG amplitude and EEG frequencies for the following bandwidths: δ_2 (0.5-2 Hz), δ_1 (2-4 Hz), θ (4-7.5 Hz), α (7.5-13.5 Hz), β_1 (13.5-20 Hz), β_2 (20-30 Hz). Based upon the frequency bands, the β_2/δ_1 ratio was calculated for each epoch as an index of EEG activation which reflects the overall shift to increased slower-frequencies and decreased faster-frequencies in non-REM sleep, and, thus, measured the depth of non-REM sleep (Hamrahi *et al.*, 2001). Percentage of time spent at each sleep-wake states (wakefulness, non-REM sleep, and REM sleep) was expressed as percentage of total recording time. Sleep fragmentation was assessed as number of bouts of sleep-wake states per hour. Bout duration was evaluated for each period of wakefulness, non-REM, and REM sleep during the entire recording of each animal. Mean bout duration was calculated for each sleep-wake states.

Breathing. Respiratory parameters were estimated from calibrated flow signal according to standard protocol (Montandon *et al.*, 2006a; Drorbaugh & Fenn, 1955). For each epoch, respiratory frequency (f_R), tidal volume (V_T), and minute ventilation ($\dot{V}_E = f_R \times V_T$) were average during the entire epoch. V_T and \dot{V}_E were normalized according to body weight. For calculation of means, breathing during transitions between sleep-wake states were not considered. This allows accurate measurements of breathing specific to each sleep-wake state without variability due to transitions. Percentage of changes between

ventilation at normocapnia and hypercapnia was calculated for each sleep-wake state in control and NCT rats.

Breathing variability. We evaluated breathing variability in control (n=7) and NCT (n=7) rats using Poincaré plot analysis using custom-made scripts using Matlab Software (Mathworks). A plot was traced for each animals and each sleep-wake states by representing the duration of a breath as function of the duration of the preceding breath (Li & Nattie, 2006) with a minimum of 100 breaths in each animal and for each sleep-wake states: $T_{n+1} = f(T_n)$. One rat per group was eliminated because in these rats there were not enough breaths that could be used to estimate breathing variability appropriately. Two standard Poincaré plot descriptors, short-term (SD1) and long-term variability (SD2) were calculated (Brennan *et al.*, 2001; Guzik *et al.*, 2007). SD1 was defined as the standard deviation of the projection of Poincaré plot on the line perpendicular to the line of identity, whereas SD2 was defined as the standard deviation of the projection of Poincaré plot on the line of identity (see Results). Short-term variability represented the variability of breath duration compared to the following breath (Li & Nattie, 2006). Long-term variability is an index of the breath duration variability of all breaths studied in a specific condition. Distribution or the total variability of Poincaré plot was estimated by calculating the surface of the ellipse defined by SD1 and SD2; $S = SD1 \times SD2 \times \pi$, the bigger the surface, the higher total breathing variability (Guzik *et al.*, 2007).

Occurrence of apneas. Apneas were counted visually and were defined as a pause in breathing for at least 2 sec which represents on average to two breathing cycles in adult rats. Two types of apneas were defined: post-sigh and spontaneous apneas. Post-sigh apneas were preceded by a sigh with an amplitude twice the preceding breath (see Results). Spontaneous apneas were defined as a cessation of breathing not preceded by a sigh. Occurrence of apneas was expressed as number of apneas per hour. Means of occurrence of apneas were calculated for each sleep-wake states, i.e. wakefulness, non-REM, and REM sleep.

Statistical analysis. Means \pm S.E. were calculated for all sleep and breathing variables at each sleep-wake states during room air breathing and hypercapnia. Statistics

were performed using two-way ANOVAs with repeated-measures (sleep-wake states \times treatment, with sleep-wake state as repeated factor, JMP 7, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) followed by Student *t*-tests as post-hoc tests. Data were considered significantly different when $p < 0.05$ and were expressed using means \pm S.E.

4. RESULTS

4.1. *Sleep-wake states*

NCT reduces non-REM sleep at rest. To test whether exposure to caffeine during the neonatal period alters sleep patterns in adult rats, we measured EEG and neck EMG activities when the rat breaths room air (Figure 30A). Sleep architecture was assessed by scoring 20-sec epochs during 3h of normocapnic recordings. In the control rat, more time was spent during non-REM sleep (dark gray) than in wakefulness (light gray) or REM sleep (black, Figure 30B). In the NCT rat, the opposite result was observed since more time was spent during wakefulness than during non-REM sleep (Figure 30C). Statistical analysis demonstrated that these observations were representative for the population studied. Figure 31A shows that NCT affects the percentage of time spent at each sleep-wake states compared to control rats (two-way ANOVA for states \times treatment, $P < 0.0001$). In fact, NCT augmented the time spent during wakefulness by 60% (Figure 31A). To the contrary, time spent in non-REM sleep in NCT rats was decreased by 28% compared to control rats (Figure 31A). No significant difference was found between control and NCT rats during REM sleep ($P = 0.09$). Similarly, NCT changed bout duration across sleep-wake states (two-way ANOVA, state \times treatment, $P < 0.001$, Figure 31B). In fact, mean bout duration of wakefulness in NCT rats was higher than in control rats (by 42%, $P = 0.009$, Figure 31B), whereas mean bout duration of non-REM and REM sleep were lower in NCT than in control rats (29% and 31%, $P = 0.004$ and $P = 0.003$, respectively). Finally, since sleep was reduced in NCT rats, we also estimated sleep fragmentation. NCT did not affect sleep fragmentation in a sleep-wake state dependant manner (two-way ANOVA for state \times

treatment, $P=0.087$, Figure 31C), despite the fact that NCT presented a fragmented non-REM sleep compared to control rats (by 50%, $P=0.0007$, Figure 31C).

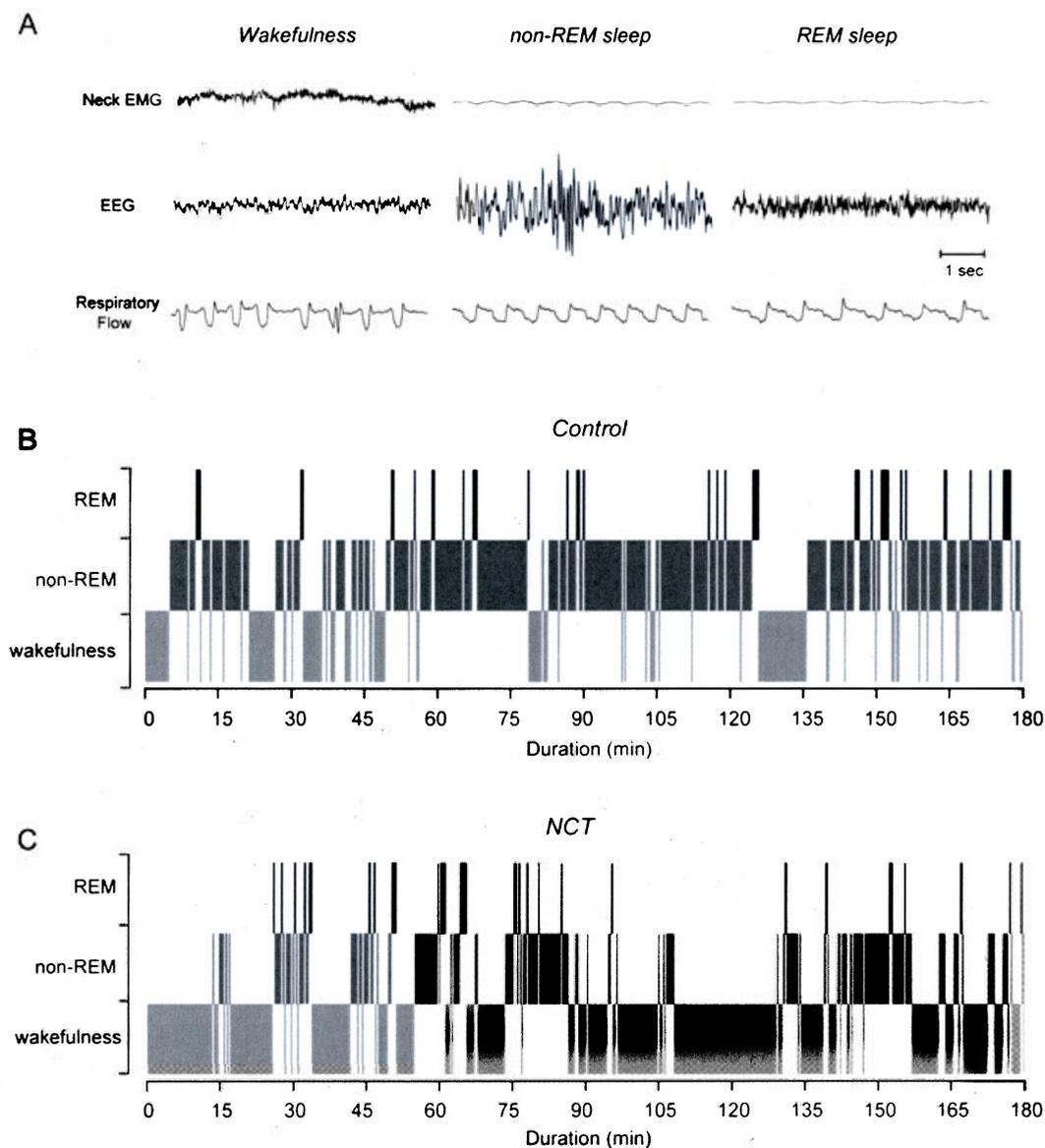


Figure 30. Sleep-wake patterns and respiratory activity at room air ($F_{I}CO_2=0$, $F_{I}O_2=0.21$, balance N_2) in a control rat (A) and sleep-wake state pattern in a control (B) and a NCT rat (C) during 3-hour. Note that raw neck EMG activity is not integrated in recordings of panel A. In panel B and C, light gray represents wakefulness, dark gray non-REM sleep, and black REM sleep.

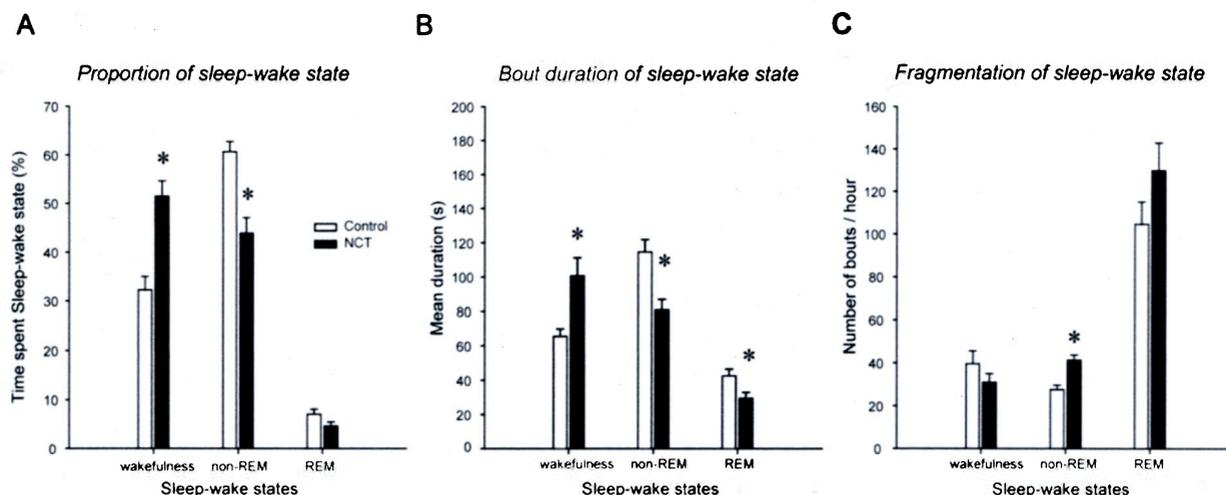


Figure 31. Percentage of time spent (A), durations of bout (B), and fragmentation (C) of each sleep-wake states at room air ($F_1\text{CO}_2=0$, $F_1\text{O}_2=0.21$, balance N_2) in control ($n=8$) and NCT ($n=8$) rats. There is a clear increase of wakefulness and net decrease of non-REM sleep in NCT compared to control rats. Also, NCT decreased mean bout duration of non-REM sleep, and fragmented non-REM sleep. Data are shown as means \pm S.E. * for $P < 0.05$ compared to control.

Quality of sleep in NCT rats. To determine whether depth of sleep is altered in NCT rats compared to control rats, mean integrated neck EMG and EEG frequencies were evaluated. Integrated neck EMG activity decreased during non-REM and REM sleep compared to wakefulness in control ($P < 0.0001$ and $P = 0.0001$, respectively, Figure 32A) as well as in NCT rats ($P = 0.0078$ and $P = 0.006$, respectively, Figure 32A), demonstrating that both groups decreased muscle activity similarly during sleep. Mean integrated neck EMG activity did not differ between control and NCT rats for each sleep-wake states (two-way ANOVA for states \times treatment, $P = 0.72$, Figure 32A), showing that NCT did not alter neck muscle activity. Ratio β_2/δ_1 was used as an index of non-REM sleep. Ratio β_2/δ_1 decreased during non-REM sleep compared to wakefulness in control and NCT rats ($P = 0.049$ and $p = 0.047$, respectively, Figure 32B). Decreases of ratio β_2/δ_1 during non-

REM sleep was not affected by NCT (two-way ANOVA for state \times treatment, $P=0.60$, Figure 32B), demonstrating that depth of non-REM sleep was similar in control and NCT rats.

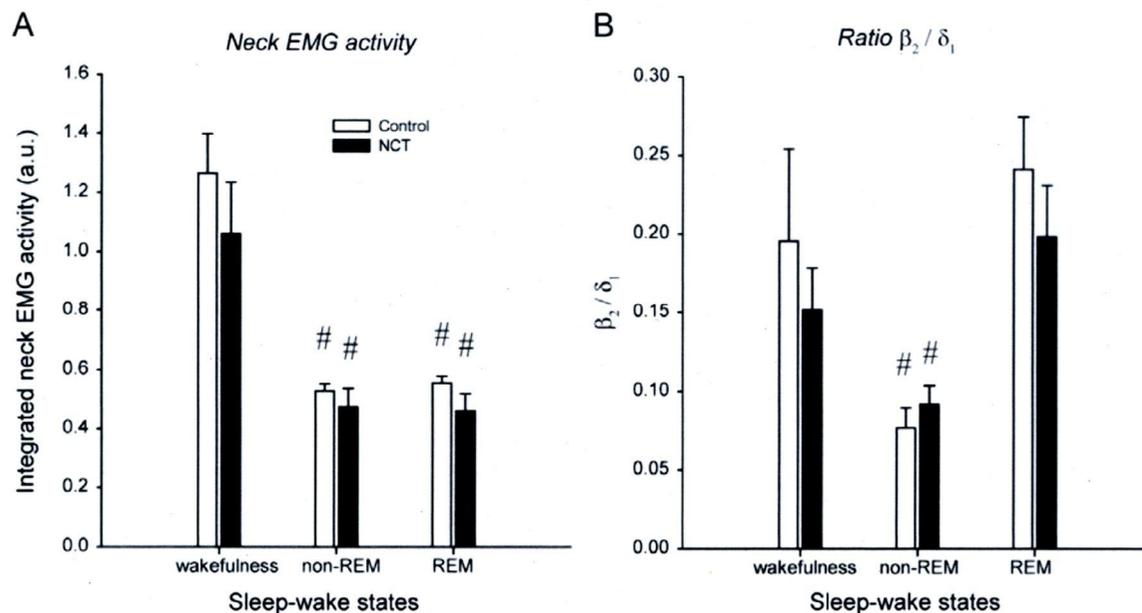


Figure 32. Integrated neck EMG activity (A) and ratio between EEG frequency bands β_2 (20-30 Hz) and δ_1 (2-4 Hz) (B) in control (white bars) and neonatal caffeine treated (NCT, black bars) rats for each sleep-wake states. Note that there was no difference of muscle activity and ratio β_2/δ_1 between control and NCT rats for each sleep-wake state. # represents means significantly different from wakefulness. Mean \pm S.E. Value is significantly different when $P < 0.05$.

Sleep-wake states in rats exposed to hypercapnia. To evaluate the effect of hypercapnia, an arousing as well as a ventilatory stimulus, on sleep pattern, we scored sleep-wake states for 1-hour when the rat breathes a hypercapnic gas mixture ($F_1\text{CO}_2=0.05$, $F_1\text{O}_2=0.2$, balance N_2). We first considered the effect of hypercapnia on sleep-wake states of control rats only (Figure 33). Hypercapnic effects depended on the prevailing sleep-wake state (two-way ANOVAs, state \times hypercapnia, $P < 0.0001$). In fact, hypercapnia increased

time spent during wakefulness (by 16%, Figure 33A), but decreased time spent during non-REM sleep (by 14%, Figure 33B). No difference was found for REM sleep. In NCT rats, hypercapnia did not augment or decrease time spent during wakefulness or non-REM sleep, respectively (Figure 33A and 33B), as we previously observed in control rats. However, hypercapnia reduced slightly, from 4.6% to 1.8%, times spent during REM sleep in NCT rats; an effect not observed in control rats.

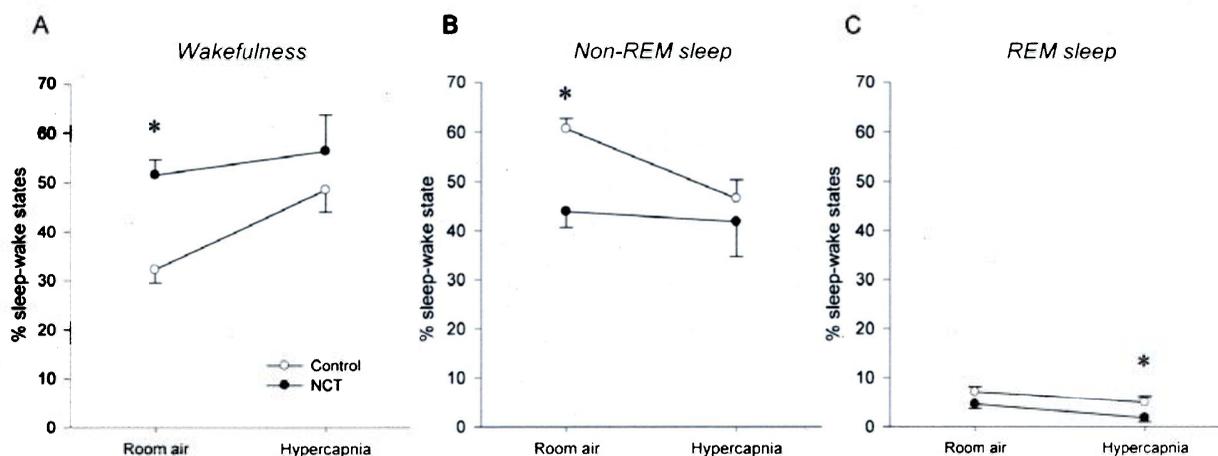


Figure 33. Sleep changes between normocapnia ($F_{I}CO_2=0$, $F_{I}O_2=0.21$, balance N_2) and hypercapnia ($F_{I}CO_2=0.05$, $F_{I}O_2=0.2$, balance N_2) of proportion of time spent at each sleep-wake states in control ($n=8$) and NCT rats ($n=8$). Data are shown as means \pm S.E. * for $P<0.05$ compared to control.

4.2. Breathing across sleep-wake states

Ventilation at room air for each sleep-wake states. To determine if NCT alters breathing during sleep, we measured ventilation using whole-body plethysmography at room air during wakefulness, non-REM, and REM sleep. NCT increased minute ventilation similarly for each sleep-wake states (by 57%, 56%, and 41%; $P=0.015$, $P=0.021$, and $P=0.021$, respectively for wakefulness, non-REM, and REM sleep; $n=8$, Figure 34A). This high ventilation was mainly due to high tidal volume in NCT compared to control rats for

each sleep-wake states (by 40%, 28%, and 30%; $P=0.010$, $P=0.0374$, and $P=0.022$; Figure 34B). This enhanced ventilation was not due to normalization by body weight since body weight was identical in both groups (body weight in controls, 597 ± 29 g, and in NCT 556 ± 29 g). Respiratory frequency did not change between control and NCT rats during wakefulness and REM sleep; however, it was higher during non-REM sleep (by 18%, $P=0.039$, $n=8$, Figure 34C). Two-way ANOVAs reveals that NCT did not change ventilation, tidal volume, or respiratory frequency in a sleep-wake state-dependant manner, but increased ventilation similarly for each sleep-wake states.

Ventilatory changes due to hypercapnia. We, first, evaluated the effects of hypercapnia on breathing by expressing the percentage changes from values at room air. In control rats, exposure to moderate hypercapnia increased minute ventilation during wakefulness, non-REM sleep, and REM sleep (by 98%, 103%, and 91%, respectively, Figure 35A). These increases were similar for each sleep-wake states (two-way ANOVA, $P=0.74$). Enhancements of minute ventilation were due to increased tidal volume and respiratory frequency observed at each sleep-wake states (Figure 35B and 35C). These hypercapnic effects did not depend upon the prevailing sleep-wake state ($P=0.54$). In NCT rats, enhancements of minute ventilation due to hypercapnia were strongly reduced compared to control rats and this effect was observed for each sleep-wake states (two-way ANOVAs, treatment \times hypercapnia, $P=0.037$, $P=0.025$, and $P=0.024$). Increases of tidal volume due to hypercapnia were also strongly attenuated in NCT compared to control rats, especially during non-REM and REM sleep ($P=0.030$ and $P=0.011$, respectively, Figure 35B). For respiratory frequency, similar increases were observed between control and NCT rats (Figure 35C).

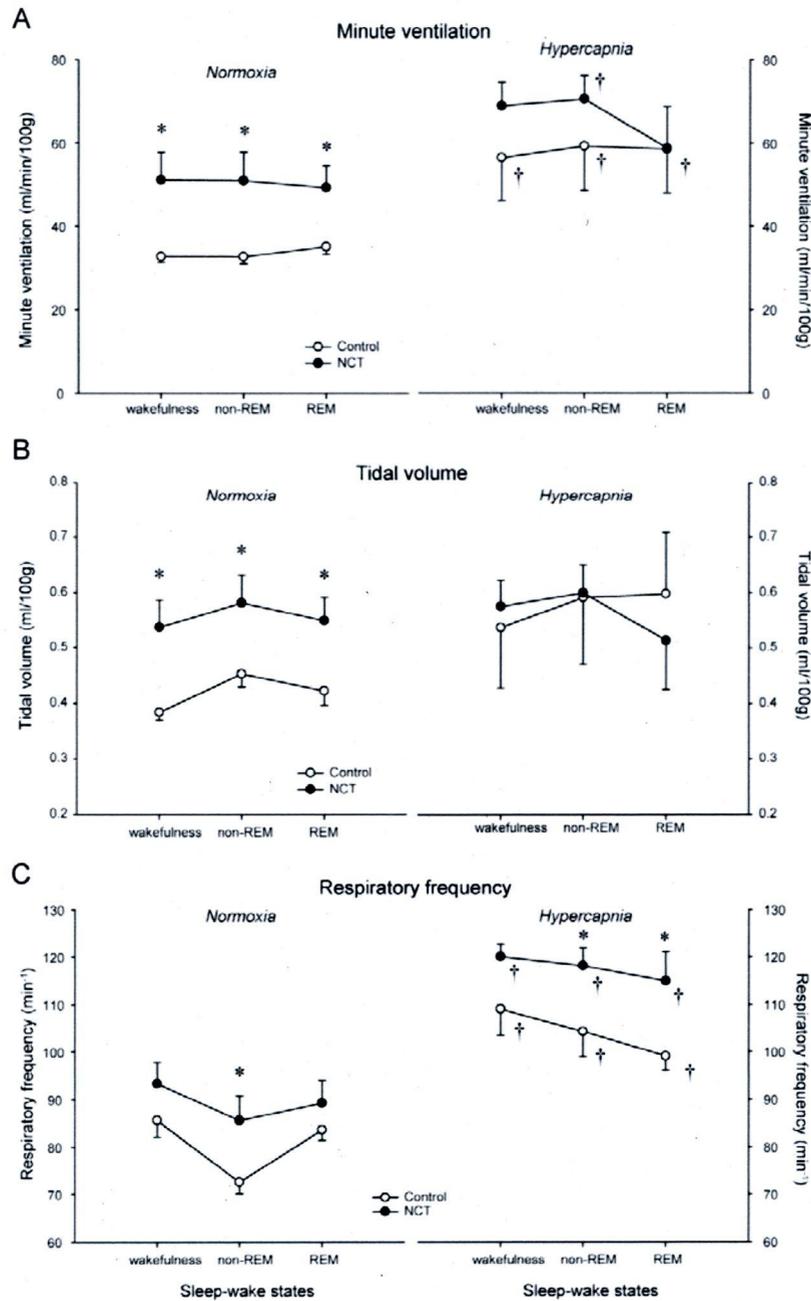


Figure 34. Minute ventilation (A), tidal volume (B), and respiratory frequency (C) for each sleep-wake states at room air ($F_1\text{CO}_2=0$, $F_1\text{O}_2=0.21$, balance N_2) and hypercapnia ($F_1\text{CO}_2=0.05$, $F_1\text{O}_2=0.2$, balance N_2) in control (white circles) and NCT (black circles) rats. Data are shown as means \pm S.E. * for $P < 0.05$ compared to control. † for $P < 0.05$ compared to normocapnia.

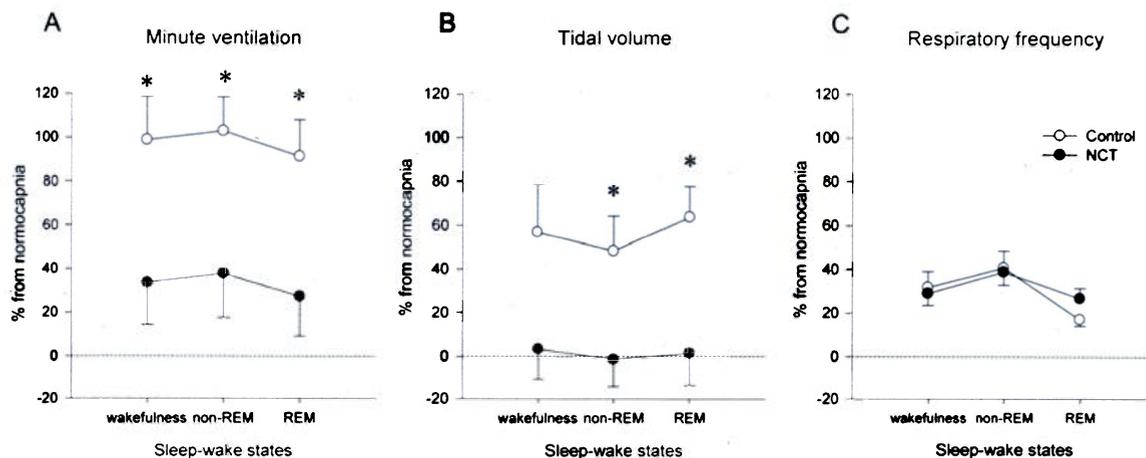


Figure 35. Relative changes of minute ventilation, tidal volume, and respiratory frequency due to hypercapnia ($F_{I\text{CO}_2}=0.05$, $F_{I\text{O}_2}=0.2$, balance N_2) for each sleep-wake states in control ($n=7$, white circles) and NCT ($n=7$, black circles) rats. * for $P<0.05$ compared to control.

4.3. Breathing variability across sleep-wake states

We determined whether NCT changes breathing variability for each sleep-wake states by comparing control ($n=7$) and NCT ($n=7$) rats. For a control and a NCT rat, Poincaré plots (Figure 36A and 36B respectively) were traced with breaths collected during wakefulness, non-REM, and REM sleep. In control rats, short-term, long-term, and total variability did not change across sleep-wake states, despite a small tendency for short-term variability to decrease during non-REM sleep compared to wakefulness and REM sleep ($P=0.084$). In NCT rats, short-term variability was increased compared to control rats during non-REM and REM sleep ($P=0.018$ and $P=0.029$, Figure 36C). Long-term variability was enhanced in NCT compared to control rats during REM sleep only ($P=0.014$, Figure 36D). Finally, total variability (ellipse S in Figure 36A) was increased in NCT compared to control rats during non-REM and REM sleep ($P=0.022$ and $P=0.014$, Figure 36E). Two-way ANOVAs demonstrated that NCT changes in breathing variability did not depend upon the sleep-wake states, despite the fact that we only observed NCT

effects during sleep. Breathing variability was not evaluated during hypercapnia because there was not enough breathing cycles at each sleep-wake states to accurately calculate Poincaré plots.

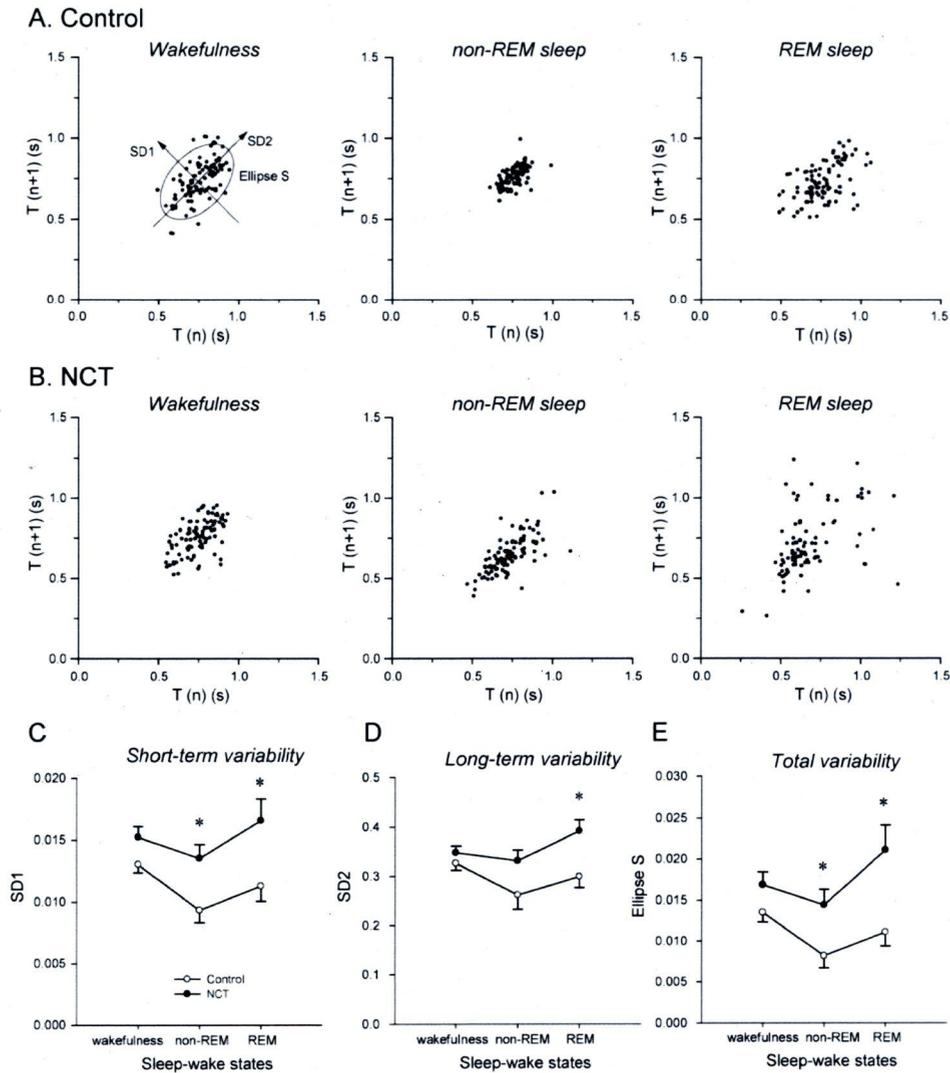


Figure 36. Breathing variability using Poincaré plot analysis for each sleep-wake states in a control (A) and a NCT (B) rat at room air ($F_1\text{CO}_2=0$, $F_1\text{O}_2=0.21$, balance N_2). Short-term SD1 (C), long-term SD2 (D), and total variability ellipse S (E) are presented for each sleep-wake states in control ($n=7$, white circles) and NCT ($n=7$, black circles) rats. * for $P<0.05$ compared to control.

4.4. *Post-sigh and spontaneous apneas across sleep-wake states*

Normocapnia. To evaluate the effect of NCT on apnea occurrence, post-sigh and spontaneous apneas were counted for each sleep-wake states in control (n=8) and NCT rats (n=8, Figure 37). In control rats, post-sigh apneas were mostly present during wakefulness and REM sleep (Figure 37A). During wakefulness, NCT rats presented less post-sigh apneas than controls (by 46%, $P=0.022$). No differences due to NCT were observed for non-REM and REM sleep. Two-way ANOVAs showed that the effects of NCT on post-sigh apneas did not depend upon the prevailing sleep-wake state. Few spontaneous apneas were observed during wakefulness and non-REM sleep at rest, whereas it occurs most of the time during REM sleep (Figure 37B). NCT had no effect on spontaneous apnea occurrence during wakefulness and non-REM sleep, but it suppressed completely spontaneous apneas during REM sleep ($P=0.002$, Figure 37B). This effect was specific to REM sleep (two-way ANOVA, state \times treatment, $P<0.0001$).

Hypercapnia. We compared occurrence of apnea between normocapnia and hypercapnia in control and NCT rats. In control rats, exposure to moderate hypercapnia decreased occurrence of post-sigh apneas during wakefulness and suppressed it during REM sleep ($P=0.008$ and $P=0.001$, respectively, Figure 37A). In NCT rats, hypercapnia had no further effects on post-sigh apnea occurrence during wakefulness and non-REM sleep, but produced more apneas during REM sleep. It is worth to note that, during wakefulness, hypercapnia reduced post-sigh apnea occurrence at the same level than NCT decreased it at room air. In control rats, hypercapnia did not change occurrence of spontaneous apnea during wakefulness and non-REM sleep (Figure 37B), whereas, during REM sleep, it suppressed all spontaneous apneas ($P=0.041$). Two-way ANOVAs showed that hypercapnic effect on spontaneous apnea varied across sleep-wake states (state \times treatment, $P<0.0001$). Indeed, in NCT rats, hypercapnia had no effects on spontaneous apneas, since NCT already suppressed spontaneous apneas.

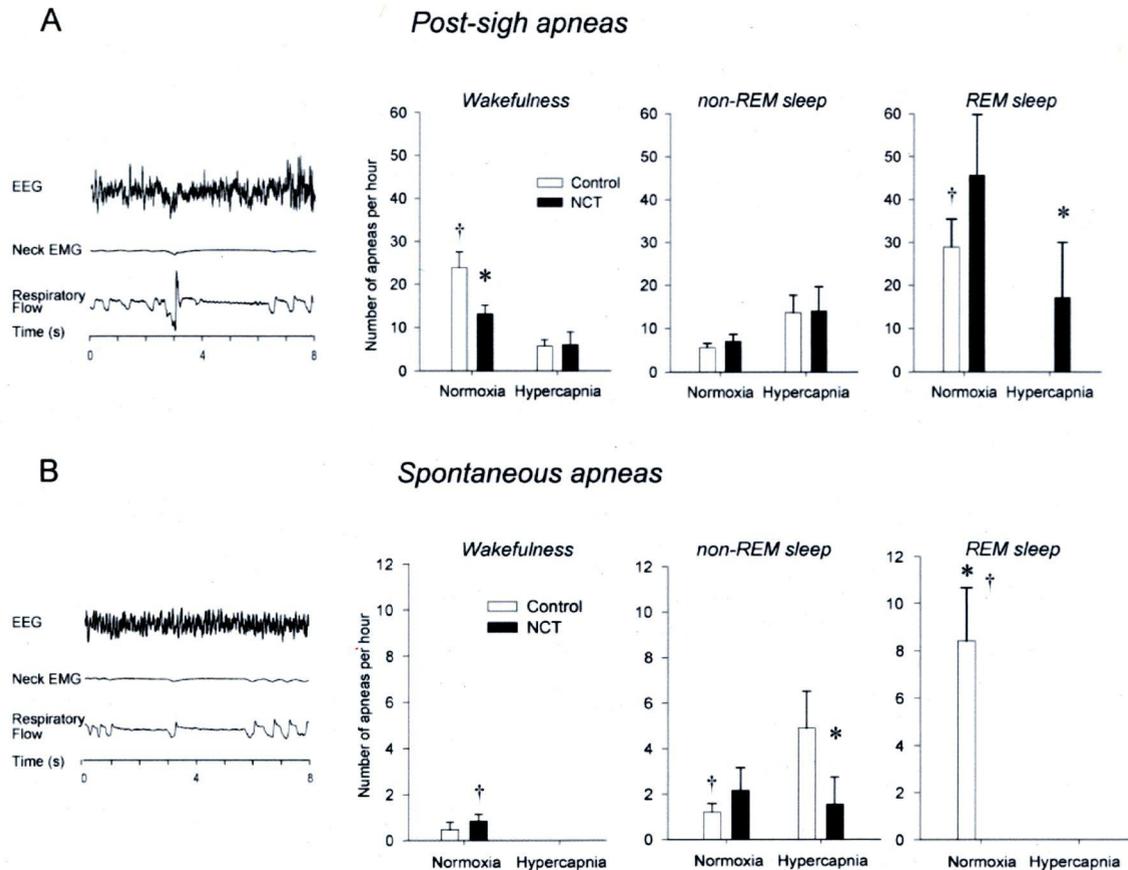


Figure 37. Occurrences of post-sigh and spontaneous apneas for each sleep-wake state during normocapnia ($F_1\text{CO}_2=0$, $F_1\text{O}_2=0.21$, balance N_2) and hypercapnia ($F_1\text{CO}_2=0.05$, $F_1\text{O}_2=0.2$, balance N_2) in control and NCT rats. Representative EEG, neck EMG, and respiratory flow recordings showing a post-sigh (A, left panel) and a spontaneous (B, left panel) apnea of at least 2 s occurring during non-REM sleep and REM sleep respectively. * for $p < 0.05$ compared to control. † for $p < 0.05$ compared to hypercapnia.

5. DISCUSSION

Here we addressed the impact of caffeine administered during the neonatal period on sleep and respiratory phenotypes of the adult. We observed that this treatment induces a strong, persistent dysregulation of sleep. NCT rats spend less time during non-REM sleep, fragment non-REM sleep, and have shorter bouts of non-REM sleep compared to control rats. Sleep alterations observed in NCT rats are comparable to those observed during hypercapnia in control rats.

Sleep scoring allows measurements of ventilation at each sleep-wake states. We showed NCT rats have higher ventilation than control rats for all states, and that this increase does not change between sleep-wake states. By measuring ventilation when rats were exposed to 5% of CO₂, we observe that hypercapnia increases ventilation in control rats, whereas it has no effect in NCT rats. This suggests that enhancements of ventilation in NCT rats reach a maximum that hypercapnia can not enhance further. Assessments of breathing cycle duration across time reveal that the variability of breathing duration is higher in NCT than in control rats during non-REM and REM sleep. Finally, we demonstrate that NCT decreases spontaneous apnea occurrence in a sleep-wake state dependant manner, since during REM sleep, spontaneous apneas were completely suppressed by NCT in a similar way than it was eliminated by hypercapnia in control rats. This study demonstrates that NCT disturbs sleep and breathing, and might be relevant clinically for a population of adult patients that received caffeine during the neonatal period. In fact, a large population of premature newborns receive caffeine for several weeks to months to treat apneas of prematurity and the long-term outcomes of this treatment are unknown in humans (Finer *et al.*, 2006).

5.1. *Decreased and fragmented non-REM sleep in NCT rats*

Sleep measurements were made from 10AM to 2PM, two hour after the beginning of the light period, ensuring that rats will spend most of their time sleeping. In fact, control rats spent at least 60% of their time during non-REM and 6% during REM sleep. Similar

sleep pattern is observed in an other study using the same species (Lu *et al.*, 2000). In NCT rats, however, propensity of sleep was reduced compared to control rats, mostly because NCT rats present less non-REM sleep and shorter non-REM sleep bout duration than controls. NCT rats also present a fragmented non-REM sleep compared to control rats. Despite changes in sleep-wake pattern, depth of non-REM sleep is not modified by NCT as it does not alter neck EMG activity or EEG activities. Similar long-term effects are observed in human premature newborn that received theophylline, an adenosine receptor antagonist similar to caffeine, to treat apnea of prematurity. Indeed, one month after chronic theophylline treatment, children present less quiet sleep than non-treated children (Thoman *et al.*, 1985). Despite the fact that sleep was measured in infants only, this study demonstrates that chronic blockade of adenosine receptors induces long-lasting changes of sleep later in life. In mice, however, opposite long-term alterations of sleep have been observed following chronic caffeine during gestation (Sinton *et al.*, 1981). In fact, *in utero* chronic caffeine treatment (200 mg/kg) increases propensity to sleep in the adult mice offspring. These results differ considerably from our study, probably because the treatment occurs early during gestation, a very sensitive period of development, and that high doses of caffeine (10x the dose used in the present study) were administered in this study. The dose used in this study is not clinically relevant and it involves different mechanisms such as inhibitions of phosphodiesterase isoenzymes and/or inactivation of GABA_A receptors (Fredholm *et al.*, 1999b). Chronic administration of caffeine at smaller doses of caffeine, however, inactivates adenosine A₁ and A_{2A} receptors.

Adenosine plays a pivotal role in sleep-wake regulation (Basheer *et al.*, 2004); during wakefulness it accumulates in specific brain structures and when concentrations are high it provokes sleep (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2002; Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000). Because adenosine A₁ and A_{2A} receptor present opposite effects on neuronal activity, their roles in sleep-wake regulation depend upon their specific expressions in brain structures involved in sleep. For instance in the rat, injection of adenosine A₁ receptor agonist CPA in the sleep-active ventrolateral preoptic area of the hypothalamus (VLPO) reduces neuronal activity and decreases sleep (Methippara *et al.*, 2005). On the other hand, injection of adenosine A_{2A} receptor agonist CGS21680 increases VLPO activity and enhances sleep. Prolonged exposure to caffeine, especially during the neonatal period when the nervous

system is the most sensitive to pharmacological treatments (Finer *et al.*, 2006), enhances adenosine A₁ receptor expression in brain structures, such as the thalamus, the cerebellum, and the hippocampus (Etzcel & Guillet, 1994) and also affect adenosine A_{2A} receptor expression (Montandon *et al.*, 2008). Consequently, long-lasting changes in adenosine receptor expression in brain structures involved in sleep regulation might alter sleep sensitivity to endogenous adenosine. Despite the fact that this hypothesis needs to be tested, we demonstrated that NCT decreases non-REM sleep and we suggest that it might be related to long-term enhancement of adenosine receptor expression in specific brain structures involved in sleep.

The use of a chemical stimulus, such as hypercapnia, helps us to understand how sleep is altered during specific conditions that occur frequently during the night. For instance, during non-REM sleep, blood CO₂ level is increased compared to wakefulness (Dempsey *et al.*, 2004). In addition, hypercapnia is a clinically relevant situation since patients suffering from sleep-disordered breathing, such as obstructive and central sleep apneas, frequently present high blood CO₂ level during sleep compared to normal subjects (Banno & Kryger, 2007). Increased arterial pCO₂ frequently arouses the patient just before resumption of ventilation, and consequently decreases and fragments sleep (Banno & Kryger, 2007). In that regard, we showed in the control adult rat that hypercapnia diminishes propensity to sleep and fragments non-REM sleep. In NCT rats, however, hypercapnia has no further effect on non-REM sleep since it is already low in these rats. It is worth to note that neither hypercapnia nor NCT alter by itself REM sleep; however, cumulative effects of NCT and hypercapnia decrease proportion of time spent during REM sleep. This is an important finding since hypercapnia in addition to the effect of neonatal caffeine might trigger more adverse changes of sleep in patients suffering from sleep-disordered breathing.

5.2. *NCT augments ventilation*

Our previous studies describing the effects of neonatal caffeine on ventilation did not find a higher minute ventilation in NCT compared to control rats at rest (Montandon *et*

al., 2006a). The fact that in the present study we eliminated recording during transitions between sleep-wake states reduces data variability. Also, ventilation was evaluated for a long period of time allowing a more stable average of data across time. In that regard, we previously observed a decrease of respiratory frequency at rest in NCT rats similar to what is observed during non-REM sleep in this study. This suggests that, in the present study, ventilatory measurements in naturally sleeping animals with simultaneous sleep recordings allow an accuracy that can't be reached with traditional respiratory measurements using plethysmograph and only behavioural identification of sleep-wake states.

NCT rats present higher ventilation at rest compared to control rats that might be related to changes in adenosine receptor expression in specific nervous structures of the respiratory control system. Systemic blockade of adenosine A_{2A} receptors by antagonist ZM241385 decreases ventilation in juvenile control rats, suggesting that adenosine A_{2A} receptors play an excitatory role on the generation of ventilation (Montandon *et al.*, 2007; Montandon *et al.*, 2008). Systemic injection does not allow specific identification of the structures affected by the antagonist; however, we demonstrated that NCT increases adenosine A_{2A} receptor mRNA expression in carotid bodies of adult rats (Montandon *et al.*, 2008). Enhancement of excitatory adenosine A_{2A} receptor expression in this structure might contribute, in part, to the high ventilation observed in NCT rats at each sleep-wake states.

5.3. *Hypercapnia has no effect on ventilation in NCT rats*

Since we recorded data during one hour under hypercapnic conditions, we were able to evaluate hypercapnic ventilatory changes for each sleep-wake state. In control rats, hypercapnia increases largely ventilation due to enhancements of both tidal volume and respiratory frequency. In NCT rats, however, ventilation is already high at room air, so hypercapnia has almost no effect on ventilation in these animals. Decrease of hypercapnic ventilatory changes may be related to the fragmented sleep observed in NCT rats. In fact, it has been shown that artificial sleep fragmentation decreased hypercapnic ventilatory sensitivity in adult dogs (Bowes *et al.*, 1980). In conclusion, ventilatory measurements at room air and under hypercapnic conditions show that NCT alters the respiratory control

system during sleep. This might be relevant for a population of patients suffering from sleep and breathing disorders by altering breathing stability. However, it is not clear whether NCT might enhance or worsen breathing variability in patients. In that regard, we evaluate breathing variability and sleep-disordered breathing in control and NCT rats.

5.4. *High breathing variability during sleep in NCT rats*

Variability of rhythmic activities, such as heart rate, is currently used to detect patients suffering from cardiac diseases (Brennan *et al.*, 2002; Task Force of the ESC and the NASPE, 1996). For instance, patients with heart failure present low heart rate variability compared to normal subjects (Woo *et al.*, 1992). This suggests that a healthy organism presents a certain amount of variability to be able to adapt to new conditions and new stimuli. Based upon the same concept, estimation of breathing variability should indicate the capacity of the respiratory control system to produce different breaths that might respond to many different conditions (Li & Nattie, 2006). We showed in this study that NCT increases breathing variability during non-REM and REM sleep. According to the concept derived from heart rate variability, high breathing variability should allow the respiratory control system to adapt to new conditions. Thus, less respiratory events should be observed in NCT rats compared to controls, especially during REM sleep for which breathing variability is higher. To address this hypothesis, we estimated breathing disorders in control and NCT rats by measuring post-sigh and spontaneous apneas at each sleep-wake states.

5.5. *Reductions of sleep-disordered breathing in NCT rats*

In a previous study, we measured the effect of NCT on post-sigh and spontaneous apnea occurrence during wakefulness (Montandon *et al.*, 2006a). The fact, that we did not evaluate sleep-wake states and that the recording duration was short, limited the conclusion of these previous results as we did not observe any effects of NCT on apnea occurrence. In

the present study, however, we noticed that post-sigh apneas mostly occur during REM sleep and spontaneous apneas during non-REM and REM sleep demonstrating the relevancy of sleep scoring in freely-behaving rats to evaluate apnea occurrence. It is also congruent with the fact that, in humans, sleep-disordered breathing occurs during sleep (Banno & Kryger, 2007). Two types of apneas were observed: post-sigh and spontaneous apneas that involve distinct mechanisms. Post-sigh apnea is due to activation of pulmonary stretch receptors by the large inspiration that precedes the sigh (Monti *et al.*, 1995). Post-sigh apneas are frequently observed during wakefulness, non-REM sleep, and are slightly more prominent during REM sleep. In NCT rats, post-sigh occurrence was smaller than in controls during wakefulness only. The clinical relevance of a decrease of post-sigh apneas in NCT rats is not clear, especially during wakefulness when there occurrence of sleep-disordered breathing is low in humans. On the other hand, spontaneous apneas involve cessation of respiratory rhythm generation and occur mostly during REM sleep when respiratory activity is inhibited (Krimsky & Leiter, 2005). In NCT rats, spontaneous apneas are suppressed during REM sleep, suggesting that NCT stimulates respiratory rhythm generation in a way that reduces spontaneous apneas. This is in agreement with the enhanced breathing variability observed during REM sleep in NCT rats.

During REM sleep, hypercapnia suppresses post-sigh apneas in control rats. This is not surprising since increasing CO₂ level is used in infants to reduce apneic events (Al-Aif *et al.*, 2001). In NCT rats, however, hypercapnia fails to suppress post-sigh apnea during REM sleep. This effect is not observed during wakefulness and non-REM sleep and is specific to post-sigh apnea since spontaneous apnea is completely suppressed during REM sleep by hypercapnia. It suggests that spontaneous and post-sigh apneas involve different mechanisms and are altered differently by hypercapnia and NCT. However, understanding the mechanisms of apnea occurrence need further studies since it might be relevant to comprehend central sleep apnea in humans.

5.6. *Clinical perspective*

It has been previously shown that the postnatal period of the rat is similar, in a neurological point of view, to the second half of human pregnancy (Clancy *et al.*, 2007). By using the specific maturation of the newborn rat, we showed that administration of caffeine during a sensitive period of development leads to long-lasting, permanent changes of sleep architecture and breathing across sleep-wake states in adult rats. This might be clinically relevant since a large population of newborns receives caffeine during prematurity to alleviate apneas (Millar & Schmidt, 2004; Leon *et al.*, 2007). Similar long lasting alterations of sleep and breathing in humans might contribute to cardiovascular diseases such as hypertension (Wolk *et al.*, 2005). On the other hand, we observed an increase of ventilation and reductions of sleep-disordered breathing suggesting that neonatal caffeine treatment might contribute to a permanent stimulation of the respiratory control system.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble des études présentées dans cet ouvrage montre que le traitement néonatal à la caféine modifie plusieurs fonctions essentielles de l'organisme chez lesquelles le système adénoenergique joue un rôle primordial. Ces changements affectent le système de contrôle de la respiration, la fonction cardiovasculaire et la régulation des stades d'éveil-sommeil. L'étude de ces différentes fonctions s'est avérée capitale lorsqu'on considère les interactions complexes qui lient ces différents systèmes. Ainsi, nous allons tenter de combiner les données de ces études, d'aborder leurs limites, de développer de nouvelles perspectives, et d'élaborer sur leur pertinence clinique.

1. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

1.1. Validité du modèle animal du nouveau-né prématuré

L'objectif de cette thèse était de tester les conséquences du traitement néonatal à la caféine utilisé en clinique chez l'enfant prématuré à l'aide d'un modèle animal. Or, l'utilisation en laboratoire de mammifères prématurés est techniquement très difficile. En effet, maintenir en vie un animal prématuré est certainement aussi difficile que maintenir en vie un enfant prématuré en clinique. Cependant, il est possible de contourner ce problème en utilisant un modèle animal qui possède un développement différent de l'humain. Les rongeurs présentent à la naissance une maturation moins avancée que celle du nouveau-né humain (Finlay & Darlington, 1995; Clancy *et al.*, 2001). Un modèle mathématique, utilisant le développement de plusieurs structures du SNC compare le stade de développement du rat nouveau-né à la naissance à celui d'un prématuré humain d'environ 15 semaines (Clancy *et al.*, 2001). Toujours basé sur le même modèle, le rat nouveau-né

atteindrait un niveau de maturité équivalent à celui de l'humain à la naissance à un âge situé autour de 12 jours. Au niveau du contrôle respiratoire, le rat présente à l'âge d'environ 10 jours une réponse ventilatoire à l'hypoxie similaire à celle du nouveau-né humain à terme (Bissonnette, 2000). Bien que de telles comparaisons aient leurs limites – le développement du rat est différent de celui de l'humain sous bien des aspects - le rat nouveau-né est un excellent modèle animal pour mimer le traitement néonatal à la caféine que reçoit le nouveau-né prématuré.

1.2. Traitement néonatal à la caféine

Le traitement néonatal à la caféine utilisé dans cet ouvrage permet d'atteindre des doses similaires à celles observées chez l'enfant prématuré en clinique. La procédure de gavage à la caféine chez le rat nouveau-né est facile et induit peu de dommages physiques chez le nouveau-né. Cependant, il est à noter que la comparaison du groupe contrôle (animaux recevant de l'eau) et les animaux naïfs (portée non-perturbée durant le développement) montrent que la procédure de gavage altère le développement du contrôle respiratoire du rat. En effet, dans l'étude I des différences dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie sont observées entre ces deux groupes. Plusieurs aspects liés à la procédure d'administration du traitement peuvent expliquer les différences observées. En effet, lors du gavage, la portée est perturbée et la mère est séparée de sa portée pour une période pouvant aller jusqu'à 30 minutes. De plus, l'introduction du cathéter dans l'œsophage du nouveau-né peut éventuellement provoquer des irritations et un stress chez l'animal. Ces résultats sont en accord avec les études de notre laboratoire démontrant qu'un stress en période néonatale modifie le contrôle respiratoire de l'animal adulte (Genest *et al.*, 2001; Genest *et al.*, 2004; Kinkead *et al.*, 2005a; Genest *et al.*, 2007). Bien que l'ensemble de ces facteurs puissent éventuellement contribuer à l'apparition d'effets persistants, la perturbation est similaire chez les deux groupes d'animaux, contrôle (administration d'eau) et caféine, permettant ainsi de tester uniquement les effets à long terme de la caféine et non ceux de la technique d'administration du traitement.

Pour que le traitement néonatal à la caféine soit similaire chez les nouveau-nés humains et rongeurs, il est nécessaire de déterminer les doses de caféine adéquates. Or, bien que la dose létale de caféine soit identique entre le rat et l'humain (Dews, 1982), le temps de demi-vie est d'environ 1 heure chez le rat tandis qu'il est de 3 heures chez l'humain (Hirsh, 1984). Ainsi, le métabolisme de la caféine chez l'humain est plus lent que chez ce rongeur et plus de temps est nécessaire à l'humain afin d'éliminer la caféine de son organisme. Cependant, chez l'enfant prématuré d'âge post-conception inférieur à 34 semaines, le métabolisme est plus lent, et le temps de demi-vie est estimé à 96 heures, tandis qu'il est de 5 heures chez l'enfant âgé de 1 an (Le Guennec *et al.*, 1985). Il est donc probable que chez le rat nouveau-né le métabolisme soit également plus lent que celui de l'adulte. Bien que le métabolisme de la caféine chez le rat nouveau-né n'ait pas été étudié, il est nécessaire de tenir compte de cet aspect. En se basant sur les différences entre le rat et l'humain adulte et le métabolisme lent de l'enfant nouveau-né, il est probable que le métabolisme du rat nouveau-né soit plus rapide que celui de l'enfant nouveau-né. C'est pourquoi dans nos études, nous avons utilisé une dose plus élevée que celle utilisée en clinique afin de mimer parfaitement les conditions cliniques (15 mg/kg/jour de caféine de base pour le rat *versus* 10 mg/kg/jour le premier jour et 2-5 mg/kg/jour les jours suivant pour l'enfant). Afin de confirmer qu'il y ait assez de caféine dans le sang du rat nouveau-né, nous avons mesuré deux heures après le traitement le taux plasmatique de caféine chez le rat âgé de 12 jours. Le taux est de 13.3 g/L une valeur comparable à celle observée en clinique chez l'enfant prématuré (Hascoet *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 1987).

2. CONTRÔLE RESPIRATOIRE ET CAFÉINE NÉONATALE

2.1. *Effet du NCT sur la ventilation du rat adulte non-anesthésié*

Les études I et V mesurent la ventilation au repos et durant le sommeil du rat adulte. Elles démontrent chacune que le NCT induit des modifications permanentes de la

ventilation chez l'animal non-anesthésié. Plus précisément dans l'étude I, la fréquence respiratoire est plus élevée chez les rats NCT et une augmentation similaire est observée lors du sommeil à ondes lentes dans l'étude V. La fréquence respiratoire est régulée par l'activité des structures de la RVLM, telles que le préBötzc (Smith *et al.*, 1991) ou les noyaux pFRG/RTN (Onimaru & Homma, 2003). Un changement de la neuromodulation adénoenergique au niveau de ces structures pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence respiratoire observée dans les études précédentes. Bien qu'aucune étude n'ait abordé le rôle de la neuromodulation adénoenergique au niveau de ces structures, quelques-unes ont identifié les récepteurs A₁ (Bissonnette & Reddington, 1991) et A_{2A} (Zaidi *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2000b) de l'adénosine au niveau de la RVLM (contenant le préBotzC et les pFRG/RTN) d'animaux nouveau-nés. Or, l'injection du R-PIA, un agoniste du récepteur A₁, dans la RVLM diminue la fréquence respiratoire d'une préparation *in vitro* d'encéphale isolé de rat nouveau-né (Herlenius *et al.*, 1997), suggérant que le récepteur A₁ a un effet inhibiteur sur la fréquence respiratoire. Le rôle du récepteur A_{2A} au niveau de cette structure n'a cependant pas été déterminé. Ainsi, si le NCT augmente l'expression des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans la RVLM, on peut alors s'attendre à une augmentation de la fréquence respiratoire chez les animaux NCT. Cependant, cette hypothèse reste à tester à l'aide, par exemple, d'une microdialyse des antagonistes spécifiques aux récepteurs de l'adénosine au niveau de la RVLM chez les rats NCT.

D'autres structures régulent la fréquence respiratoire. L'activation des neurones du NTS stimule l'activité de la RVLM, et donc accentue la fréquence respiratoire chez le rat conscient (Nattie & Li, 2002). Ainsi, si le NCT augmente l'activité du NTS, cela expliquerait l'augmentation de la fréquence respiratoire observée au repos chez le rat traité. L'augmentation de l'activité du NTS peut provenir de deux origines. Tout d'abord, une augmentation de l'activité du nerf du sinus carotidien accentue l'activité du NTS (Mifflin, 1997). L'activité du nerf du sinus dépend quant à lui de l'activité des chémorécepteurs dans les corps carotidiens (Gonzalez *et al.*, 1994). Or, il a été démontré dans l'étude IV que l'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs A_{2A} est accentuée par le NCT. Si l'augmentation de l'expression du récepteur est similaire à celle de l'ARNm, on peut alors s'attendre à une activité plus forte des corps carotidiens chez les rats NCT, puisque la

liaison de l'adénosine endogène au récepteur A_{2A} stimule l'activité des chémorécepteurs des corps carotidiens (Conde *et al.*, 2006). Également, au niveau du NTS, une augmentation de l'expression des récepteurs A_{2A} produit un effet similaire et accentue l'activité de cette structure. En conclusion, plusieurs études montrent que le récepteur A_{2A} de l'adénosine possède un rôle excitateur aux niveaux central et périphérique. Ce rôle fait de lui un bon candidat pour expliquer l'augmentation de la fréquence respiratoire observée chez le rat NCT. L'étude II de cet ouvrage appuie cette hypothèse. En effet, l'injection systémique d'un antagoniste des récepteurs A_{2A} (ZM241385) diminue la fréquence respiratoire du groupe contrôle. Chez le rat NCT, la même injection n'a pas d'effet sur la fréquence respiratoire, suggérant que chez le rat NCT la dose de ZM241385 n'est pas suffisante pour bloquer l'action excitatrice de l'adénosine endogène sur les récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Cette étude montre que le récepteur A_{2A} joue un rôle certain dans la régulation de la fréquence respiratoire. Cependant, parce qu'une injection systémique est utilisée dans cette étude, il est impossible de déterminer les structures nerveuses impliquées dans ces changements. Ainsi, pour évaluer l'impact du NCT sur les récepteurs A_{2A} de l'adénosine, la manipulation du système adénoenergique au niveau de structures nerveuses responsables de la génération du rythme respiratoire, telles que la RVLM, le NTS, ou les noyaux du pont, s'avère nécessaire.

Il faut également noter que le NCT augmente la ventilation dans l'étude V à chaque stade d'éveil-sommeil, un effet qui n'est pas observé dans l'étude I. Ces différences sont dues à plusieurs aspects méthodologiques qui diffèrent entre les deux études. Les transitions entre les stades d'éveil-sommeil sont éliminées dans l'étude V réduisant ainsi la variabilité des mesures due aux réveils de l'animal qui sont souvent composés de soupirs et de reniflements. Également, le volume courant observé durant ces périodes de transition est plus élevé que durant l'éveil ou le sommeil, pouvant éventuellement expliquer les valeurs relativement basses de volume courant observées dans l'étude V. Finalement, le système de télémétrie placé dans l'abdomen possède un volume d'environ 10 mL pouvant ainsi diminuer le volume pulmonaire de l'animal. Malgré ces limites, l'étude V permet d'évaluer avec plus de précisions la ventilation de l'animal conscient tout en prenant compte de son état de vigilance qui module les mesures ventilatoires.

2.2. *Effets du NCT sur l'activité du nerf phrénique chez le rat anesthésié*

Bien que les résultats obtenus en conditions de base chez le rat conscient diffèrent de ceux obtenus chez le rat anesthésié (Étude III), il est cependant clair que le NCT altère également l'activité du nerf phrénique. En effet, l'amplitude de l'activité intégrée du nerf phrénique est plus élevée chez les rats NCT que chez les contrôles. Ce résultat surprenant est également observé lors des mesures de l'activité du nerf phrénique dans l'Étude IV. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette augmentation. Tout d'abord, l'augmentation de l'amplitude du nerf phrénique peut provenir d'une activité plus prononcée du noyau phrénique, une structure riche en récepteur A_1 de l'adénosine (Zaidi *et al.*, 2006). Également, la présence de récepteurs de l'adénosine au niveau des neurones moteurs de la moelle épinière peut également participer à cette augmentation (Nantwi *et al.*, 2003a). Une étude s'intéressant aux thérapies permettant de récupérer l'activité du nerf phrénique suite à une hémisection montre que l'activité phrénique augmente suite à un traitement chronique chez le rat adulte similaire au NCT (Nantwi *et al.*, 2003b). En effet, dans cette étude, l'administration chronique de théophylline (un antagoniste non-spécifique des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine) permet de récupérer l'activité du nerf phrénique du côté de la lésion. Cette étude démontre qu'un blocage chronique des récepteurs de l'adénosine au niveau des circuits générant l'activité phrénique augmente à long terme l'amplitude de l'activité intégrée du nerf phrénique. Il est possible qu'une facilitation similaire se produise dans le cas du traitement néonatal à la caféine.

2.3. *Effet du NCT sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie*

Le traitement néonatal à la caféine accentue la réponse du volume courant à l'hypercapnie chez le rat adulte (Étude I). Dans l'étude III, nous observons une augmentation de l'amplitude du nerf phrénique à tous les niveaux de CO_2 mesurés chez les rats NCT, sans observer cependant d'augmentation de la réponse à l'hypercapnie. Ces différences observées entre la ventilation chez le rat conscient et l'activité du nerf

phrénique chez le rat anesthésié peuvent être expliquées par plusieurs aspects qui diffèrent entre les techniques utilisées. Tout d'abord, l'anesthésie peut atténuer les effets du NCT. En effet, dans l'étude I, l'animal est conscient et sa respiration varie en fonction de son état de vigilance (voir étude V). Ainsi, une transition du sommeil à l'éveil peut influencer la ventilation (Stephenson *et al.*, 2001) lors de l'exposition à l'hypercapnie. Cependant, dans les études ventilatoires, nous nous sommes assurés que le rat ne dormait pas en tapotant régulièrement la chambre. Finalement, la vagotomie réalisée chez les rats anesthésiés de l'étude III explique peut-être l'absence de réponse à l'hypercapnie chez ces animaux. En effet, parce que le nerf vague véhicule des afférences pulmonaires et cardiaques en direction du tronc cérébral et parce que le NCT altère la pression artérielle en hypoxie et le rythme cardiaque lors de l'hypercapnie, il est possible que ces afférences accentuent la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les animaux NCT lorsque le nerf vague est intact. Il a été démontré récemment que les afférences du nerf vague inhibent l'activité des noyaux respiratoires du tronc cérébral, en particulier les cellules chémosensibles au CO₂ au niveau du RTN (Moreira *et al.*, 2007). Ainsi, une approche différente pourrait être envisagée afin de déterminer si la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est affectée par le traitement néonatal à la caféine. En effet, la mesure de la réponse de l'activité musculaire diaphragmatique à l'hypercapnie chez l'animal anesthésié, mais non vagotomisé et respirant spontanément, permettrait à la fois de contrôler les gaz sanguins et l'activité cardiovasculaire mais également de laisser intact le nerf vague.

2.4. Effet du NCT sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie

Chez les rats NCT, la réponse de la fréquence respiratoire à l'hypoxie est plus prononcée que chez les rats contrôles qu'elle soit évaluée chez le rat éveillé par pléthysmographie à corps entier ou chez le rat anesthésié en mesurant l'activité du nerf phrénique. L'évaluation des niveaux d'ARNm par RT-PCR dans les corps carotidiens suggère que l'augmentation de ces réponses est due à une expression plus élevée des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans cette structure. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le rôle d'une surexpression du récepteur A_{2A} dans les corps carotidiens. Trois séries d'expériences peuvent être proposées.

1) Tout d'abord, en bloquant les récepteurs A_{2A} de l'adénosine spécifiquement au niveau des corps carotidiens, on ne devrait pas observer d'augmentation dans la réponse chez les rats NCT. L'injection systémique d'un antagoniste périphérique ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique (par exemple le 8-SPT) avant la mesure de la réponse ventilatoire à l'hypoxie devrait permettre de tester cette hypothèse. Cependant, un tel antagoniste, bien qu'il soit périphérique, affecte l'activité d'autres structures contenant des récepteurs de l'adénosine tel que le cœur, les vaisseaux sanguins, les poumons, et les chémorécepteurs des arcs aortiques, et peut par conséquent affecter la réponse à l'hypoxie. Une approche différente est ainsi possible pour compléter cette étude.

2) La chémodénervation du nerf du sinus carotidien chez les rats contrôles et les rats NCT devrait également abolir l'augmentation prononcée de la réponse à l'hypoxie chez les rats NCT et les réponses devraient être similaires chez les rats contrôles et NCT si seuls les corps carotidiens sont responsables de l'accentuation de la réponse. Cette approche devrait ainsi déterminer le rôle de la chémosensibilité périphérique dans l'augmentation de l'activité du nerf phrénique en réponse à l'hypoxie chez le rat NCT.

3) Finalement, la mesure de l'activité du nerf du sinus carotidiens dans une préparation *ex vivo* des corps carotidiens provenant de rats contrôles ou NCT permettrait de déterminer si les chémosensibilités des corps carotidiens est altérée par le traitement. On pourrait également utiliser des antagonistes spécifiques aux récepteurs de l'adénosine, et également un antagoniste du récepteur D_2 de la dopamine qui est également affecté par le traitement, afin de déterminer leurs rôles spécifiques dans les effets de la caféine.

2.5. *Traitement à la caféine et stress néonatal*

Avec l'avancée des soins médicaux, les chances de survie de l'enfant prématuré ont augmenté considérablement. Toutefois, ces soins peuvent être très stressants et le prématuré n'est pas préparé aux stress à l'extérieur de l'utérus. Ces stress comprennent l'exposition à la lumière, l'exposition aux sons, la maladie, la séparation maternelle, les procédures invasives et les médicaments. De plus, l'enfant prématuré est beaucoup plus sensible à la

douleur que l'enfant à terme (Fitzgerald, 2005) et les procédures que subit le prématuré peuvent être douloureuses (Grunau *et al.*, 2006). Bien qu'on ne sache pas quel est l'impact de ces expériences sur le développement neurologiques et psychomoteurs de l'enfant prématuré, des chercheurs se sont intéressés à cette question en utilisant un modèle animal. L'impact de la séparation maternelle en période néonatale sur le développement du système de contrôle de la respiration a été évalué chez le rat adulte. La séparation maternelle, qui consiste en une séparation journalière de 3 heures du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance du raton modifie les réponses ventilatoires à l'hypoxie (Genest *et al.*, 2004; Genest *et al.*, 2007) et à l'hypercapnie (Genest *et al.*, 2001) chez le rat adulte. Les conséquences à long terme de la séparation maternelle semblent être dues à une modification de la neurotransmission GABAergique dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus faisant partie de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (Genest *et al.*, 2007). En clinique, en plus du stress auquel est exposé le nouveau-né, l'enfant prématuré reçoit un traitement à base de caféine. On peut alors s'interroger sur la synergie potentielle d'un stress affectif (la séparation maternelle) et un traitement pharmacologie (la caféine) sur le développement du contrôle respiratoire du rat. Cette synergie est d'autant plus probable si l'on considère que l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien est modulé par la caféine (Patz *et al.*, 2006) et que les récepteurs de l'adénosine modulent le relâchement du GABA dans certaines cellules de l'hypothalamus (Chen & van den Pol, 1997). De plus, le traitement néonatal à la caféine altère l'expression de l'ARNm du récepteur D₂ de la dopamine dans les corps carotidiens (étude IV) et un effet similaire est observé chez les rats adultes ayant subi une séparation maternelle néonatale (Kinkead *et al.*, 2005c). En conclusion, il est à noter que les rats sujets au traitement néonatal à la caféine subissent, en plus de l'action de la caféine, un stress relatif au gavage. Le stress induit lors du gavage est cependant de courte durée (1-2 minutes) mais il est suffisant afin de modifier le contrôle respiratoire des rats juvéniles (comparaison entre animaux véhicules et naïfs). L'exposition à un stress plus prolongé (comme celui des études citées précédemment) en complément au traitement à la caféine pourrait induire des effets fonctionnels notables.

3. FONCTION CARDIOVASCULAIRE ET CAFÉINE NÉONATALE

Les études III et IV évaluent les effets du NCT sur l'activité cardiovasculaire du rat adulte anesthésié. L'étude IV démontre qu'en ligne de base, les pressions artérielles moyenne et diastolique sont plus basses chez le rat NCT que chez les contrôles. Parce que l'adénosine joue un rôle important dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire, l'injection systémique d'adénosine ou d'agonistes des récepteurs de l'adénosine diminue la pression artérielle chez le rat anesthésié (Barraco *et al.*, 1987). Cependant, l'adénosine peut potentiellement augmenter ou diminuer la pression artérielle selon le type de récepteur auquel elle se lie, le récepteur A₁ ou le récepteur A_{2A} de l'adénosine respectivement (Barraco *et al.*, 1991). Ainsi, il est probable qu'une diminution de la pression artérielle induite par le NCT soit en partie due au changement de l'expression du récepteur A_{2A} de l'adénosine dans certaines structures du tronc cérébral. Par exemple dans le NTS, l'injection du CGS21680, un agoniste pour le récepteur A_{2A}, diminue la pression artérielle (Barraco *et al.*, 1996). Également, il ne faut pas négliger le fait que l'activation des récepteurs de l'adénosine des muscles lisses des vaisseaux sanguins (Tawfik *et al.*, 2005) peut également modifier la tonicité de ces derniers et ainsi modifier la résistance vasculaire et par conséquent la pression artérielle. Finalement, les résultats de l'étude IV obtenus en ligne de base ne sont pas reproduit dans l'étude III malgré une méthode expérimentale similaire. Il est possible que parce que le nombre d'animaux étudié est plus bas dans l'étude III que dans l'étude IV, la puissance statistique de l'étude III ne soit pas suffisante pour révéler de différences significatives. Plusieurs études complémentaires permettraient de mieux comprendre l'impact du NCT sur l'activité cardiovasculaire du rat adulte. La principale limitation des études III et IV est la vagotomie. La dénervation est nécessaire afin de pouvoir ventiler artificiellement l'animal et pouvoir ainsi contrôler les gaz sanguins précisément. Cependant, les nerfs vagues véhiculent des informations provenant des barorécepteurs pulmonaires (*slowly adapting receptors*) ou cardiaques (aortiques) en direction du tronc cérébral (Moreira *et al.*, 2007). Ainsi, l'évaluation de l'activité cardiovasculaire chez le rat NCT dont le nerf vague est intacte s'avère nécessaire. Il est possible de mesurer la pression artérielle chez l'animal conscient en implantant

chroniquement un cathéter fémoral ou encore de mesurer l'activité artérielle chez l'animal anesthésié mais respirant spontanément. Ces préparations permettraient de déterminer l'impact du traitement à la caféine sur le contrôle cardiovasculaire chez l'animal intact.

Lors de l'hypercapnie, la fonction cardiaque est également altérée chez les rats NCT. En effet, on observe des augmentations du rythme et de la variabilité cardiaque chez les rats NCT comparés aux contrôles. Ces différences ne sont pas observées en ligne de base, suggérant que l'activation des structures chémosensibles au CO₂ est nécessaire pour révéler des modifications chez les rats NCT. Les mécanismes responsables de ces augmentations ne sont cependant pas claires. En effet, peu d'études s'intéressent au rôle de l'adénosine dans la génération du rythme cardiaque. Il a cependant été démontré que l'activation des récepteurs A₁ de l'adénosine par le CPA diminue le rythme cardiaque du rat conscient, tandis que l'activation des récepteurs A_{2A} par le CGS21680 l'augmente (Schindler *et al.*, 2005; Dhalla *et al.*, 2006). Ainsi, l'augmentation du rythme cardiaque observée lors de l'hypercapnie chez les rats NCT implique probablement les récepteurs A_{2A} localisés dans des structures chémosensibles au CO₂ et impliquées dans la fonction cardiovasculaire. Le NTS répond à ces deux critères, mais l'injection d'un agoniste pour le récepteurs A_{2A} (CGS21680) a pour effet de diminuer le rythme cardiaque (Scislo & O'Leary, 2002) infirmant le rôle de cette structure dans l'augmentation du rythme chez les rats NCT. La RVLM est cependant une meilleure candidate puisque l'injection d'adénosine dans cette structure augmente le rythme cardiaque (Thomas & Spyer, 1996). Les corps carotidiens sont des structures également chémosensibles au CO₂, comme le démontre une étude où une faible augmentation de CO₂ provoquent un relâchement d'acétylcholine dans le corps carotidiens *ex vivo* du rat (Fitzgerald *et al.*, 2006a). De plus, les corps carotidiens jouent un rôle dans la régulation de la pression artérielle, plus précisément dans le baroréflexe, et envoient des afférences vers le NTS (Mifflin, 1997). Finalement, ils contiennent des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dont l'activation favorise le relâchement des neurotransmetteurs excitateurs (Sebastiao & Ribeiro, 1996) et nous avons démontré dans l'étude IV que le NCT augmente l'expression de l'ARNm des récepteurs A_{2A} dans ces structures. Bien qu'il soit probable que les corps carotidiens participent aux changements de pression artérielle et rythme cardiaque observés chez les rats NCT durant l'hypoxie ou l'hypercapnie, une étude démontre chez le rat anesthésié que le dénervation des nerfs du

sinus carotidiens n'a que peu d'effets sur la réponse de la pression artérielle à l'hypercapnie (Oikawa *et al.*, 2005). Malgré cette étude, on peut spéculer que le NCT augmente l'expression des récepteurs A_{2A} de l'adénosine dans des structures chémosensibles qui jouent un rôle cardiovasculaire comme, par exemple, la RVLM ou encore les corps carotidiens. Ainsi, la liaison de l'adénosine endogène aux récepteurs excitateurs A_{2A} ainsi que la stimulation des chémorécepteurs au CO_2 dans ces structures contribuerait à l'augmentation du rythme cardiaque observée chez les rats NCT en hypercapnie.

Chez l'humain adulte, la variabilité cardiaque est régulée par l'adénosine. En effet, l'injection systémique d'un agoniste du récepteur A_1 de l'adénosine (SDZ WAG994) accentue la variabilité cardiaque (Piot *et al.*, 1998). A l'opposé, l'administration de caféine chez l'humain adulte la diminue (Sondermeijer *et al.*, 2002). Bien que l'effet à long terme de la caféine n'ait pas été étudié chez l'humain, nous démontrons chez le rat que le NCT augmente la variabilité cardiaque lorsque l'animal est exposé à l'hypercapnie. Ainsi, l'effet cumulatif du traitement et de l'hypercapnie est nécessaire afin de déclencher une augmentation de la variabilité cardiaque. Ceci n'est pas surprenant puisqu'il a été démontré chez le cochonnet que l'hypercapnie augmente la variabilité cardiaque (Sica *et al.*, 2002). En conclusion, la combinaison de l'hypercapnie et d'un changement dans la neuromodulation adénoenergique est peut être à l'origine de l'augmentation de la variabilité cardiaque observée dans l'étude III. L'intérêt d'étudier la variabilité cardiaque est que cette variable est un indicateur de l'état de santé cardiovasculaire de l'organisme. Une variabilité cardiaque anormalement basse est signe d'une pathologie cardiaque (Task Force of the ESC and the NASPE, 1996; Casolo *et al.*, 1995). Bien qu'une augmentation de la variabilité ait un intérêt clinique, la vagotomie réalisée dans cette étude en limite la portée des conclusions. Une étude similaire chez l'animal anesthésié respirant spontanément permettrait d'estimer la variabilité cardiaque dans des conditions physiologiques. Dans ce cas, il serait possible d'utiliser des méthodes différentes et plus complètes pour évaluer la variabilité cardiaque comme l'analyse du spectre de fréquences du rythme cardiaque (Sica *et al.*, 2002), mais également du spectre de l'amplitude de la pression artérielle systolique (Malpas, 2002). Ces techniques permettent d'évaluer la balance sympathico-vagale, c'est-à-dire de déterminer l'influence relative des systèmes

sympathique et parasympathique (Pagani *et al.*, 1984; Pagani *et al.*, 1993), une information qui n'est pas disponible chez l'animal vagotomisé.

L'origine d'un changement de la fonction cardiaque par un traitement néonatal à la caféine ne peut se limiter à des modifications de la commande cardiaque au niveau du tronc cérébral. En effet, les récepteurs A_1 (Lasley & Smart, 2001) et A_{2A} (Hove-Madsen *et al.*, 2006) de l'adénosine ont été également identifiés dans les myocytes cardiaques. L'activation des récepteurs A_{2A} à l'aide du CGS21680 (un agoniste pour le récepteur A_{2A}) augmente l'amplitude de contraction des myocytes cardiaques *in vitro* (Xu *et al.*, 1996). Ainsi, une augmentation de l'expression des récepteurs A_{2A} dans ces cellules pourrait induire des changements dans la fonction cardiaque qui persisteraient jusqu'à l'âge adulte.

4. RÉGULATION DES STADES D'ÉVEIL-SOMMEIL ET CAFÉINE NÉONATALE

La caféine est une drogue consommée par les mères gestantes, administrée au nouveau-né prématuré, et consommée par les enfants et les adultes (Fredholm *et al.*, 1999b). Son effet aigu sur le sommeil est bien documenté (Huang *et al.*, 2005) et implique le récepteur A_{2A} de l'adénosine. Cependant, à notre connaissance, peu d'études se sont intéressées aux effets à long terme d'une administration ou une consommation chronique de caféine sur le sommeil. Chez le prématuré, un traitement à base de théophylline induit également des effets persistants sur le sommeil. En effet, un mois après le traitement ces nouveau-nés présentent moins de sommeil non-REM (Thoman *et al.*, 1985). Bien que cette diminution du sommeil soit observée chez le nouveau-né, elle est similaire aux résultats obtenus dans l'étude V. En effet, nous observons une diminution du temps consacré au sommeil à ondes lentes (non-REM), une fragmentation du sommeil à ondes lentes et une diminution de la durée moyenne des périodes de sommeil à ondes lentes chez les rats adultes NCT comparés aux contrôles. Bien que le NCT ait lieu plusieurs mois avant l'âge adulte et plusieurs mois avant les mesures de sommeil, les perturbations qu'il induit sur

l'architecture du sommeil sont d'une ampleur similaire, voire plus prononcée, à celles provoquées par une stimulation aigue comme l'hypercapnie.

Afin d'évaluer avec plus de précisions l'architecture du sommeil chez le rat, la durée des mesures de l'étude V pourrait être étendue sur un journée complète. En effet, 24 heures de mesures permettrait de déterminer le cycle circadien des rats contrôle et NCT. Dans l'étude V, le sommeil est évalué de 10 heures à 13 heures pour une durée totale de 3 heures. Ainsi, si le NCT décale le cycle circadien et retarde la phase diurne (phase inactive ou de repos) du rat, on peut s'attendre à une réduction du temps consacré au sommeil durant les premières heures de la phase diurne. Cette hypothèse est raisonnable car il a été démontré que l'activation du récepteur A_1 de l'adénosine (par une injection systémique de l'agoniste CHA) affecte la capacité de la souris à décaler son cycle circadien lorsque les phases diurne/nocturne sont décalées artificiellement (Sigworth & Rea, 2003). Bien que cette éventualité soit envisageable, la phase diurne débute 2 heures avant les mesures du sommeil et devrait laisser assez de temps à l'animal pour s'adapter aux changements de lumière et à débiter sa phase inactive. De plus, si le cycle circadien est retardé ou décalé par le traitement, on devrait d'attendre à un sommeil plus léger chez le rat NCT que chez le rat contrôle. Or, la profondeur du sommeil non-REM, évaluée par l'analyse des bandes de fréquences de l'EEG (ratio β_2/δ_1), est identique chez les rats contrôle et NCT. Ces données suggèrent que les sommeils des rats contrôle et NCT durant les trois heures sélectionnées sont de même nature. Ces arguments sont en faveur d'une modification de l'architecture du sommeil par le NCT plutôt qu'une altération ou un décalage du cycle circadien.

Les mécanismes responsables des changements de l'architecture du sommeil sont discutés dans l'étude V et impliquent probablement un altération de la neuromodulation adénoenergique dans des structures impliquées dans le sommeil comme la VLPO ou le télencéphale basal. Afin de comprendre par quels mécanismes le NCT altère le sommeil, plusieurs études supplémentaires sont envisageables. Tout d'abord, il est nécessaire de s'assurer que c'est bien le système adénoenergique qui est altéré par le traitement. L'administration systémique d'antagonistes pour les récepteurs A_1 et A_{2A} avant les mesures du sommeil chez les rats contrôle et NCT permettrait de comprendre quels types de récepteurs jouent un rôle dans l'altération du sommeil observée chez les rats NCT.

Cependant, parce qu'il est probable que la distribution des deux récepteurs soient altérés par le traitement, la manipulation locale de la neuromodulation adénoenergique au niveau des structures impliquées dans le sommeil permettrait de mieux comprendre l'origine des effets. Également, l'utilisation de souris transgéniques ont permis de déterminer le rôle des récepteurs de l'adénosine dans les mécanismes d'action de la caféine sur le sommeil (Huang *et al.*, 2005). En effet, les souris knock-out pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine ont perdues leur sensibilité à la caféine, démontrant le rôle primordial de ce récepteur. Il serait envisageable d'utiliser de telles souris (KO pour les récepteurs A₁ ou A_{2A} de l'adénosine) afin de tester si le sommeil de ces souris possèdent la même sensibilité à long terme au traitement à la caféine.

5. DIFFÉRENCES LIÉES AU SEXE

Dans les études I et IV, le traitement néonatal à la caféine modifie la ventilation des rats adulte mâle seulement. Les femelles ne montrent pas de sensibilité au traitement. Dans une étude comportementale, le NCT induit des modifications du comportement qui diffèrent également entre les mâles et les femelles adultes. En effet, les rats adultes NCT présentent des performances d'apprentissage moins élevées chez les mâles et plus élevées chez les femelles que les contrôles (Fisher & Guillet, 1997). Ces différences peuvent avoir deux origines. Tout d'abord, il est possible que les femelles soient plus résistantes au traitement durant la période néonatale. En effet, des sensibilités différentes à la caféine entre les mâles et les femelles sont observées dès la fin de la gestation. Par exemple, une consommation élevée de caféine chez la mère durant le troisième trimestre de grossesse mène à un plus grand nombre de garçons présentant un petit poids à la naissance et cet effet n'est pas observé chez les filles (Vik *et al.*, 2003). Ainsi, durant la gestation et peut-être aussi après la naissance, l'impact de la caféine peut différer entre les mâles et les femelles. Le deuxième facteur pouvant expliquer ces différences mâles/femelles est l'apport hormonal au moment des mesures et l'interaction de celles-ci avec le système adénoenergique.

Chez les singes mâles en bas âge, la testostérone diminue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Emery *et al.*, 1994) et il est possible que cet apport hormonal contribue à révéler ou accentuer les effets à long terme du traitement. Chez la femme, lors de la phase du cycle menstruel où le niveau de progestérone est le plus élevé, la ventilation est accentuée et la $P_{ET}CO_2$ est basse (Slatkovska *et al.*, 2006). L'effet stimulateur de la progestérone est confirmé car l'administration d'un agoniste des récepteurs de la progestérone chez le chat accentue l'activité du nerf phrénique (Bayliss & Millhorn, 1992). De plus, toujours chez la femelle, l'interaction entre l'oestrogène et les récepteurs de l'adénosine peut être à l'origine de ces différences car la suppression d'oestrogène chez les femelles ovariectomisées induit une diminution de l'expression des récepteurs A_1 , A_{2A} et A_3 de l'adénosine dans le cerveau du rat (Rose-Meyer *et al.*, 2003). À cet égard, une légère augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur A_{2A} dans les corps carotidiens est observée chez les femelles NCT et ceci sans conséquences fonctionnelles sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Ces données montrent que les femelles et les mâles possèdent des sensibilités différentes au traitement qui sont éventuellement dues à la présence d'oestrogène chez les femelles. Finalement, on peut également supposer que les hormones femelles et le cycle ovarien masquent les conséquences du traitement en augmentant la variabilité des mesures ventilatoires. En effet, parce que le cycle ovarien n'a pas été déterminé dans les études avec les femelles, les variations ventilatoires dues au niveau d'hormones changeant durant le cycle menstruel peuvent masquer l'effet du traitement à la caféine.

Afin de déterminer les rôles des hormones sexuelles dans les conséquences du traitement néonatal à la caféine et lors des mesures de la ventilation, l'ablation des organes sexuels est nécessaire. La suppression des hormones sexuelles par ovariectomie chez la femelle ou par castration chez les mâles une semaine avant les mesures permettrait ainsi de révéler si les effets du traitement dépendent des hormones sexuelles sécrétées par l'adulte. Si les femelles ovariectomisées se révèlent sensibles au NCT, ceci suggérerait que soit les hormones sexuelles protègent contre les effets du traitement ou encore que ces hormones brouillent ou masquent l'évaluation des conséquences du traitement. Si les mâles castrés ne présentent plus de sensibilité au traitement, cela démontrerait que la testostérone aggrave et accentue les conséquences de la caféine.

6. DÉVELOPPEMENT ET CAFÉINE NÉONATALE

6.1. Périodes critiques du développement du rat

Les périodes sensibles durant lesquelles le traitement néonatal à la caféine modifie à long terme le système de contrôle de la respiration ne sont pas bien définies. Nous avons choisi dans cet ouvrage d'administrer le NCT du 3^{ème} au 12^{ème} jour suivant la naissance du nouveau-né. Plusieurs études s'accordent à dire que le 12^{ème} jour suivant la naissance du rat correspond au développement du cortex de l'enfant nouveau-né au moment de sa naissance (Romijn *et al.*, 1991), suggérant que les jours précédant le 12^{ème} jour correspondent à un développement prématuré chez l'humain. Ainsi, la période relativement longue que nous avons choisie permet de s'assurer que la période du traitement chez le rat correspond à une période prénatale chez l'humain. Les limites temporelles des périodes critiques du développement peuvent également être ciblées en observant les périodes d'administration de la caféine dans d'autres études. Par exemple, l'administration *in utero* de caféine modifie l'activité respiratoire du rat nouveau-né (Bodineau *et al.*, 2003) en altérant l'expression du récepteur A₁ de l'adénosine dans les noyaux respiratoires du tronc cérébral (Saadani-Makki *et al.*, 2004). Ces études montrent que la gestation est une période sensible du développement du système nerveux durant laquelle la consommation de certaines drogues peut altérer le développement normal du nouveau-né. L'administration de caféine du 2^{ème} au 6^{ème} jour suivant la naissance produit des modifications du comportement chez le rat adulte (Guillet & Kellogg, 1991a), de l'expression des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau du rat adulte (Etzel & Guillet, 1994), et une augmentation de l'expression des récepteurs A₁ de l'adénosine dans certains noyaux respiratoires chémosensibles du tronc cérébral, comme le LC (Gaytan *et al.*, 2006). Ces données suggèrent l'existence d'une fenêtre développementale durant laquelle le système nerveux est particulièrement sensible. C'est également à l'âge de 3-4 jour que le système de contrôle de la respiration présente des changements. En effet, à cet âge, la ventilation du nouveau-né atteint un minimum (Liu *et al.*, 2006) et cette diminution est peut-être liée au bas niveau de glutamate et de récepteurs NMDA 1 ou au niveau élevé de GABA mesurés dans le complexe préBötzinger du rat au

même âge (Wong-Riley & Liu, 2005). Vers la fin du traitement néonatal à la caféine a également lieu des changements importants. En effet, au 12^{ème} jour suivant la naissance du rat, des changements spectaculaires ont lieu. Les expressions des récepteurs Glu2, GABA_B, et du récepteur pour la glycine présentent des niveaux beaucoup plus élevés que durant le reste du développement dans presque toutes les structures du tronc cérébral (Wong-Riley & Liu, 2005). C'est également à cet âge que la fréquence respiratoire atteint son maximum (Liu *et al.*, 2006). Bien que dans cette étude la ventilation soit mesurée par pléthysmographie chez l'animal éveillé et que la mesure de la fréquence respiratoire peut être altérée par le comportement de l'animal, cet âge semble un moment important du développement du rat.

En conclusion, les études présentées dans le paragraphe précédent portant sur le développement du système de contrôle de la respiration s'accorde à dire qu'entre le 3^{ème} et le 12^{ème} jour suivant la naissance du rat plusieurs étapes importantes prennent places. L'utilisation de périodes plus courtes durant lesquelles le traitement à la caféine serait administré permettrait de cibler les fenêtres temporelles critiques et éviter certaines périodes durant lesquelles le traitement altère le plus le système de contrôle de la respiration. Ces études montrent également que le système adénoenergique présente plusieurs changements durant le développement du rat et que l'évaluation des conséquences du traitement évolue avec l'âge. Cet aspect est abordé au paragraphe suivant.

6.2. Caféine néonatale et développement

Dans cet ouvrage, plusieurs changements surviennent durant le développement des rats nouveau-nés traités à la caféine. A l'âge de dix jours, les rats traités à la caféine ne présentent pas de changements dans leur comportement respiratoire par rapport aux contrôles (Figure 38) malgré une petite tendance, non significative, à diminuer la réponse du volume courant. Cependant, une semaine après le traitement (P20), les rats NCT présentent une réponse ventilatoire à l'hypercapnie plus prononcées que les rats contrôles. A l'âge adulte, la caféine néonatale altère le patron de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie sans augmentation nette de la réponse ventilatoire. Cependant, les adultes

traités à la caféine présentent une fréquence respiratoire plus prononcée que les contrôles. Ces données démontrent la présence d'une maturation des effets du NCT tout au long du développement du rat.

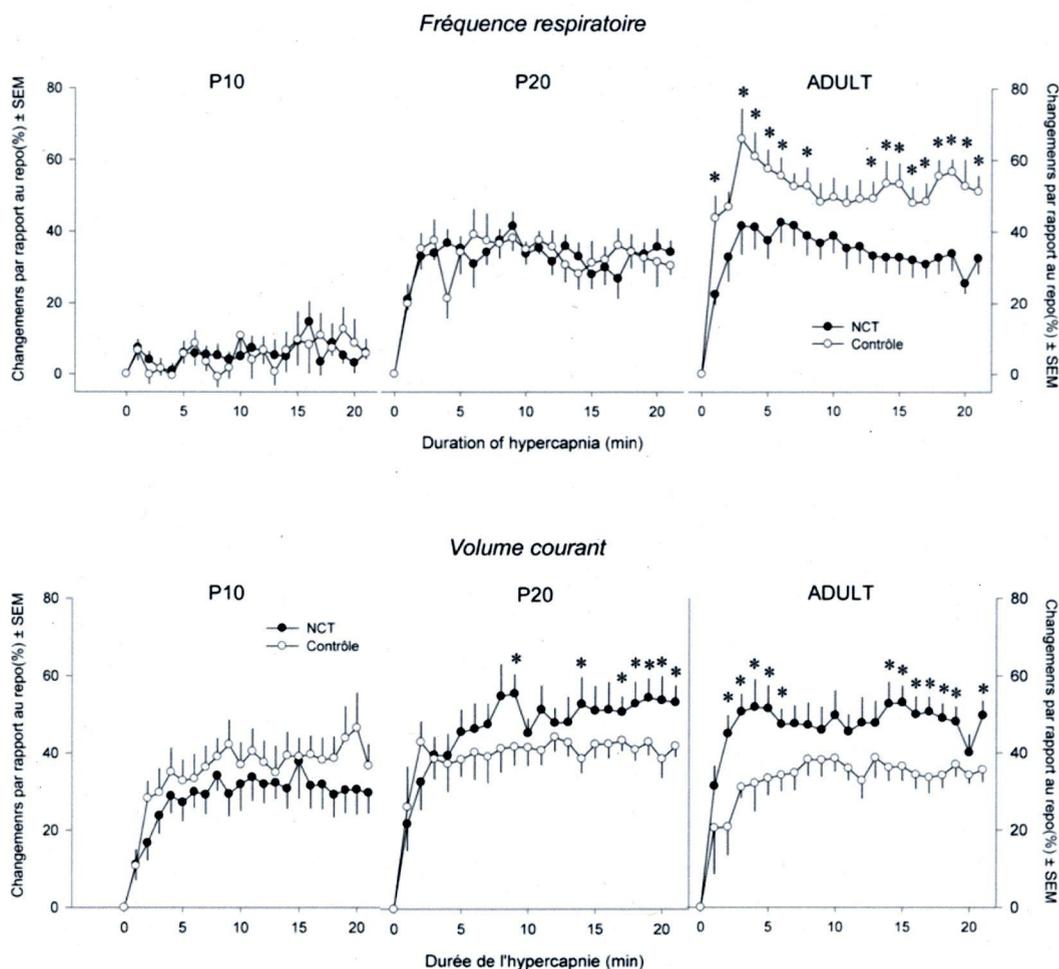


Figure 38. Maturation des effets du traitement néonatal à la caféine sur la réponse à l'hypercapnie ($FI_{CO_2}=0.05$) de la fréquence respiratoire et du volume courant des rats mâles nouveau-nés âgés de 10 jours, des rats juvéniles âgés de 20 jours et des rats adultes mesurés par pléthysmographie à corps entier. Le traitement néonatal à la caféine a lieu du 2^{ème} au 7^{ème} jour suivant la naissance chez les rats âgés de 10 jours afin que le rat ne soit plus sous l'influence de la caféine au moment des mesures. Ces données n'ont pas été présentées dans les chapitres précédents. Elles sont présentées sous la forme de moyenne \pm S.E.M. * signifie une moyenne significativement différente ($P<0.05$).

Pour expliquer les variations des conséquences du traitement durant la maturation du rat, plusieurs pistes peuvent être envisagées. Durant le développement, le système adénoenergique présente plusieurs changements. Les potentiels post-synaptiques excitateurs en réponse à l'application d'adénosine sur des coupes *in vitro* d'hippocampe augmente avec l'âge (Dumas & Foster, 1998). Cette augmentation est peut être liée à l'augmentation de l'expression des récepteurs A_1 et A_{2A} de l'adénosine durant le développement du rat (Johansson *et al.*, 1997a). Ceci expliquerait en partie les différences entre les rats juvéniles et les rats adultes. Cependant, le fait que la réponse ventilatoire à l'hypercapnie soit affectée chez le rat juvénile uniquement et que seul le patron de la réponse soit altéré chez l'adulte, n'est pas expliqué par la maturation des récepteurs de l'adénosine. Une autre hypothèse peut-être envisagée. Lors la maturation sexuelle du rat, la production hormonale augmente lentement durant les premières semaines suivant la naissance et présente une élévation très prononcée à partir de 1 mois (Umezu *et al.*, 2004). Ainsi, parce que la testostérone diminue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Emery *et al.*, 1994), on peut s'attendre à un changement de la réponse présentant un profil comparable aux changements hormonaux du rat. Chez le rat juvénile, il y a peu de testostérone et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est plus élevée chez le rat NCT, tandis que chez l'adulte, la présence de plus grandes quantités de testostérone réduit la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et masque l'effet de la caféine. Malgré ce masquage des modifications du patron respiratoire sont cependant observé. L'hypothèse d'un rôle de l'absence de testostérone dans l'augmentation de la réponse ventilatoire peut facilement être vérifiée en administrant de la testostérone aux mâles juvéniles contrôle et NCT avant les mesures ventilatoires et en observant si les différences persistent.

7. MÉCANISMES DE PLASTICITÉ DU SYSTÈME NERVEUX

7.1. *Effets chroniques de la caféine*

Les mécanismes par lesquels la caféine chronique néonatale modifie les différentes fonctions nerveuses évaluées dans les études de cet ouvrage ne sont pas connus. L'hypothèse privilégiée est que le blocage chronique des récepteurs de l'adénosine dans la cellule nerveuse force cette dernière à exprimer davantage de récepteurs de l'adénosine pour que l'adénosine garde son potentiel neuromodulateur (Boulenger *et al.*, 1983; Marangos *et al.*, 1984). Cependant, à l'arrêt du traitement, on devrait s'attendre à une progressive diminution de la surexpression des récepteurs de l'adénosine étant donné que la caféine ne bloque plus les récepteurs. Or, les effets chroniques de la caféine persistent plusieurs mois après le traitement, suggérant que les mécanismes régulant l'expression des récepteurs de l'adénosine sont affectés. Le fait que le traitement à la caféine ait lieu lors d'une fenêtre temporelle sensible et critique du développement expliquerait cet effet persistant (Carroll, 2003). Les mécanismes impliqués dans les effets à long terme de la caféine sur l'expression des récepteurs de l'adénosine ne sont pas encore expliqués; cependant une théorie peut être avancée. Une modification dans l'expression des récepteurs de l'adénosine peut être due à une altération des processus de transcription des protéines formant les récepteurs de l'adénosine. De tels mécanismes appelés mécanismes épigénétiques modifient l'expression des gènes grâce à des changements de la méthylation de l'ADN. Ces changements peuvent par exemple être altérés par l'expérience vécue par le nouveau-né. Par exemple, un changement dans les soins apportés par la mère aux nouveau-nés induit des modifications épigénétiques de la régulation de l'expression des protéines constituant le récepteur des glucocorticoïdes dans l'hippocampe du rat adulte (Weaver *et al.*, 2004). Ces mécanismes épigénétiques permettent de transmettre à chaque division cellulaire des traits acquis durant le développement sans modifications du génome. Ainsi, il est possible qu'un phénomène identique ait lieu lors du traitement néonatal à la caféine chez le nouveau-né. L'hypothèse de l'existence de mécanismes épigénétiques pourrait être

testée en déterminant si les modifications observées persistent d'une génération à l'autre et en étudiant les mécanismes de transduction des protéines G formant les récepteurs de l'adénosine.

D'autres mécanismes qui n'impliquent pas une surexpression des récepteurs de l'adénosine peuvent éventuellement expliquer les effets à long terme de la caféine sur le fonctionnement nerveux :

1) L'augmentation de l'activité neuronale due au blocage du rôle inhibiteur de l'adénosine pourrait favoriser ou défavoriser la synaptogénèse du nouveau-né; un effet qui persisterait très longtemps après le traitement. En appui à cet hypothèse, une étude récente montre qu'un traitement néonatal à la caféine modifie la formation des dendrites des neurones pyramidaux du rat adulte (Juarez-Mendez *et al.*, 2006), confirmant l'impact de la caféine néonatale sur le développement du neurone.

2) L'administration de méthylxanthines, tels que la caféine ou la théophylline chez l'enfant prématuré réduit, fragmente et altère son sommeil (Hayes *et al.*, 2007). Hors la privation de sommeil chez l'enfant affectent à court terme la respiration, en augmentant par exemple les apnées obstructives de l'enfant (Franco *et al.*, 2004) et altère également l'activité cardiaque (Franco *et al.*, 2003). Les effets à long terme d'une privation du sommeil (à l'aide de drogue comme la scopolamine ou la clonidine) chez le rat nouveau-né modifie le contrôle respiratoire du rat juvénile (Thomas *et al.*, 2000a). En effet, à l'âge de 20 jours les rats ayant reçu de la clonidine ou de la scopolamine présentent une réduction du volume courant. Les rats traités à la scopolamine ont une ventilation réduite et ceux traités à la clonidine une fréquence respiratoire plus élevée. Cette étude suggère que si la caféine altère de façon similaire le sommeil du nouveau-né, des effets à long terme dus à la privation du sommeil peuvent être responsables, en partie, d'une modification du contrôle respiratoire. Cependant, dans l'étude précédente, les effets peuvent également provenir d'une modification à long terme des modulations adrénergique ou cholinergique par la clonidine (agoniste adrénergique) ou la scopolamine (antagoniste des récepteurs muscariniques M1), plutôt qu'à l'effet d'une privation du sommeil. En effet, les auteurs démontrent que les deux traitements réduisent l'expression des récepteurs mACh et augmentent celle des récepteurs α_2 -adrénergiques dans le cortex du rat juvénile.

3) Une autre hypothèse permettrait d'expliquer les conséquences du traitement néonatal à la caféine sur le développement du contrôle respiratoire. Il est en effet possible que la caféine altère le comportement ou la réponse au stress du nouveau-né au moment du traitement. En effet, la caféine modifie l'activité motrice de la souris adulte (El Yacoubi *et al.*, 2000) et accentue la réponse au stress du rat adulte en activant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Patz *et al.*, 2006). Il est probable que l'administration de caféine en période néonatale induit des effets similaires chez le nouveau-né. Hors, un stress en période néonatale, par exemple la séparation maternelle, modifie le contrôle respiratoire du rat adulte en altérant le fonctionnement de certaines composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Genest *et al.*, 2004; Genest *et al.*, 2007; Kinkead *et al.*, 2005a). Bien que l'impact de la caféine dans cet ouvrage et les conséquences du stress dans les études précédentes diffèrent considérablement, il est possible que les effets de la caféine sur le contrôle respiratoire soient dus à la combinaison d'effets à long terme sur les récepteurs de l'adénosine et de l'impact du stress subi un période néonatale par l'animal. A l'appui de cette hypothèse nous démontrons dans l'étude I que la procédure du traitement altère la réponse ventilatoire à l'hypercapnie du rat adulte. Cependant, bien que plusieurs mécanismes puissent être responsables des effets à long terme de la caféine, il demeure que le traitement néonatal modifie l'expression des récepteurs de l'adénosine dans plusieurs structures nerveuses du rat (Etzel & Guillet, 1994; Guillet & Kellogg, 1991a) et dans les corps carotidiens (Etude IV) et qu'aucun changement dans la neurotransmission adénosinergique n'est observé suite à la séparation maternelle néonatale (Bairam & Carroll, 2005).

Afin de comprendre par quels mécanismes le traitement néonatal à la caféine altère les phénotypes respiratoires, cardiovasculaires et somnogènes, il est nécessaire de déterminer l'impact du traitement sur l'expression des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau du rat adulte, en particulier l'expression du récepteur A_{2A} de l'adénosine qui a été peu étudié. Des études de liaison de ligands radioactifs aux récepteurs de l'adénosine au niveau des noyaux respiratoires du tronc cérébral, au niveau de l'hypothalamus, du thalamus et du télencéphale basal chez les rat adultes NCT et contrôles permettraient de déterminer quelles structures sont affectées par le traitement. Une étude similaire au niveau des corps carotidiens permettrait également de confirmer les résultats de l'étude IV en

déterminant si le traitement augmente l'expression du récepteur A_{2A} de l'adénosine de la même manière qu'il augmente le niveau d'ARNm de ce récepteur.

7.2. *Modulation adénoenergique des neurotransmetteurs*

Les récepteurs de l'adénosine modifient l'activité neuronale principalement en modulant le relâchement des neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs dans la fente synaptique, mais également en modulant l'affinité d'autres récepteurs (voir plus bas). Le traitement néonatal à la caféine en altérant l'expression des récepteurs de l'adénosine de certains neurones y modifie également la neurotransmission. Ainsi, plusieurs types de neurotransmissions sont affectés par l'activation des récepteurs A_1 et/ou A_{2A} de l'adénosine.

7.2.1. Récepteur A_1 de l'adénosine

L'activation des récepteurs A_1 de l'adénosine inhibe l'activité neuronale grâce à la combinaison d'une hyperpolarisation post-synaptique due à l'activation des canaux potassiques et à une inhibition présynaptique du relâchement de neurotransmetteurs excitateurs (Dunwiddie, 1985), tel que le glutamate (Ambrosio *et al.*, 1996). Bien que ce mécanisme soit observé dans la plupart des cellules nerveuses, d'autres mécanismes peuvent également moduler l'activité neuronale par des voies différentes. En effet, le récepteur A_1 de l'adénosine est couplé à d'autres récepteurs sous la forme d'hétéromères. Le récepteur A_1 forme par exemple un complexe hétéromère antagoniste avec le récepteur D_1 de la dopamine (Fuxe *et al.*, 2007). Dans le striatum du rat par exemple, un agoniste pour le récepteur D_1 a pour effet de faciliter la neurotransmission GABAergique. L'ajout d'un agoniste pour le récepteur A_1 de l'adénosine inhibe cependant le rôle du récepteur D_1 et diminue ainsi la neurotransmission GABAergique (Ferre *et al.*, 1997). L'ensemble de ces études montre que le récepteur A_1 interagit et module d'autres neurotransmissions qui jouent des rôles importants dans le contrôle respiratoire. Par exemple, le récepteur D_1 est un

important stimulateur respiratoire. À l'aide d'un agoniste spécifique pour ce récepteur (le 6-chloro APB), il est possible de stimuler l'activité respiratoire chez le chat (Lalley, 2005) et augmenter la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Lalley, 2004) lorsque ce dernier reçoit du fentanyl, un agoniste des récepteurs μ -opioïdes ayant pour effet de diminuer l'activité respiratoire.

Le récepteur A_1 de l'adénosine peut également former un hétéromère avec le récepteur mGlu5 pour le glutamate (Ciruela *et al.*, 2001). Or, tout changement d'expression d'un des récepteurs composant l'hétéromère modifie l'expression de l'autre récepteur. En effet, l'exposition chronique à un agoniste du récepteur A_1 (R-PIA) augmente l'expression du récepteur mGlu dans des cellules nerveuses du rat adulte (Albasanz *et al.*, 2002), mettant en évidence cette relation. Bien que la relation fonctionnelle entre le récepteur A_1 de l'adénosine et le récepteur mGlu ne soit pas encore définie, il est possible que le traitement néonatal à la caféine modifie par l'intermédiaire de cet hétéromère l'expression des récepteurs mGlu. Cependant, le rôle du mGlu dans le contrôle de la respiration n'a pas été déterminé.

7.2.2. Récepteur A_{2A} de l'adénosine

Bien que l'activation du récepteur A_{2A} facilite le relâchement de neurotransmetteurs tel que l'acétylcholine, le GABA, et la dopamine (Sebastiao & Ribeiro, 1996), il agit également sous la forme d'un hétéromère avec le récepteur D_2 de la dopamine. Ainsi, un agoniste pour le récepteur A_{2A} active l'hétéromère A_{2A}/D_2 et inhibe le récepteur D_2 de la dopamine (Fuxe *et al.*, 2005). Ainsi, une forte interaction entre les récepteurs A_{2A} et D_2 est observée dans certains tissus nerveux. En particulier au niveau des corps carotidiens, nous observons dans l'étude IV que l'augmentation du niveau d'ARNm du récepteur A_{2A} dans le groupe NCT est accompagnée par une augmentation du niveau d'ARNm du récepteur D_2 . Le rôle fonctionnel du récepteur D_2 dans le contrôle respiratoire n'est pas parfaitement défini. Au niveau central, le blocage du récepteur D_2 par l'halopéridone injecté de façon intra-cérébro-ventriculaire réduit l'activité respiratoire chez le rat anesthésié suggérant que le récepteur est excitateur à ce niveau (Hedner *et al.*, 1982). Au niveau périphérique, le

récepteur D₂ de la dopamine joue un rôle différent dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. L'administration du dompéridone, un antagoniste périphérique pour les récepteurs D₂, augmente le relâchement des catécholamines au niveau des corps carotidiens suggérant un rôle inhibiteur pour la dopamine endogène à ce niveau (Iturriaga *et al.*, 1994). Le même antagoniste administré systémiquement chez le chat anesthésié accentue la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Hsiao *et al.*, 1989) appuyant ainsi le rôle inhibiteur de la dopamine en périphérie. Finalement, l'inactivation du récepteur A_{2A} de l'adénosine ne se limite pas à inhiber l'activité du récepteur D₂ de la dopamine, mais potentialise également les réponses induites par le récepteur D₁ de la dopamine au niveau des ganglions de la base (Ferre *et al.*, 1997). Parce que le récepteur A_{2A} de l'adénosine module l'activité des récepteurs de la dopamine, les antagonistes pour ce récepteur sont actuellement en étude dans le développement de nouveaux traitements de la maladie de Parkinson (Schwarzschild *et al.*, 2006) et ceci montre le lien important entre ces deux types de récepteurs. Cet aspect est particulièrement intéressant lorsque l'on sait que les patients atteints de la maladie de Parkinson présente des troubles du contrôle de la respiration et une obstruction des voies aériennes supérieures (Brown, 1994). De plus, le L-DOPA (un précurseur de la synthèse de la dopamine qui augmente le niveau de dopamine dans la cellule nerveuse) accentue les troubles du contrôle de la respiration (Brown, 1994; Zupnick *et al.*, 1990).

En conclusion, l'ensemble de ces études montrent des relations agonistiques et antagonistiques entre les récepteurs de l'adénosine et ceux de la dopamine, suggérant que le traitement néonatal à la caféine affecte également le système dopaminergique. Cet aspect pourrait être abordé dans les études mécanistiques de la plasticité due à la caféine.

7.3. *Spécificité de la caféine*

Parce que la caféine bloque les récepteurs A₁ et A_{2A} de l'adénosine avec des affinités différentes, il est difficile de définir le rôle de chaque type de récepteurs de l'adénosine dans les conséquences observées lors du traitement à la caféine. L'utilisation d'antagonistes spécifiques aux récepteurs A₁ ou A_{2A} de l'adénosine permettrait de mieux comprendre deux aspects du traitement néonatal à la caféine. Tout d'abord, en remplaçant

la caféine par un antagoniste spécifique aux récepteurs A_1 ou A_{2A} de l'adénosine, on serait alors à même de comprendre quel récepteur est responsable de l'effet aigu de la caféine sur l'activité respiratoire de l'enfant prématuré. Ensuite, en observant les effets chroniques à long terme de chacun des 2 types d'antagonistes, on pourrait alors déterminer la spécificité des effets à long terme de chaque type de récepteur sur le contrôle respiratoire et les autres fonctions nerveuses affectées par le traitement. La compréhension de ces deux aspects du traitement pourrait alors déboucher sur le développement d'un antagoniste spécifique au récepteur responsable de l'effet stimulateur de la caféine chez l'enfant prématuré et qui aurait peu d'impacts à long terme. Plusieurs antagonistes des récepteurs de l'adénosine sont actuellement en phase d'essais cliniques comme traitement des symptômes de la maladie de Parkinson (Schwarzschild *et al.*, 2006). Par exemple, l'istradéfylline (KW-6002) est un antagoniste du récepteur A_{2A} de l'adénosine actuellement en phase III d'essais cliniques (Hauser & Schwarzschild, 2005). L'avantage d'utiliser un antagoniste du récepteur A_{2A} de l'adénosine est que ce récepteur est moins largement distribué dans le système nerveux que le récepteur A_1 , suggérant que les effets à long terme de cette drogue seraient moins importants que ceux de la caféine. Cependant, cette hypothèse reste à prouver car l'interaction existant entre les deux types de récepteurs peut très bien entraîner une modification de l'expression du récepteur A_1 lorsque le récepteur A_{2A} est inactivé.

8. CONSÉQUENCES DU TRAITEMENT NÉONATAL À LA CAFÉINE CHEZ L'HUMAIN

Il est difficile de définir les conséquences reportées dans cet ouvrage comme négatives ou positives pour le devenir à long terme du système de contrôle respiratoire du nouveau-né et des autres systèmes affectés par le traitement. Chez l'enfant prématuré, les bénéfices immédiats du traitement ne font aucun doute et ce traitement est largement utilisé en clinique depuis plusieurs années. Ainsi, les observations rapportées dans ce travail chez le rat peuvent être interprétées comme positives ou négatives chez l'humain dépendamment du contexte dans lequel elles sont placées.

8.1. *Les effets potentiellement négatifs.*

Sur le contrôle de la respiration. Tout d'abord, envisageons les conséquences du traitement observées chez le rat juvénile. L'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez le rat traité à la caféine peut être critique dans le maintien de la stabilité respiratoire (Al-Matary *et al.*, 2004). En effet, l'augmentation de la ventilation en réponse à une augmentation en CO₂ a pour objectif d'éliminer le CO₂ excédentaire afin de revenir à un niveau de CO₂ normal. Cependant, une réponse trop forte et trop rapide à l'hypercapnie, comme celle qui est observée chez les juvéniles traités à la caféine, provoque une hyperventilation. Cette hyperventilation peut se prolonger au delà du stimulus hypercapnique et diminuer par la suite la pCO₂ artériel. Par conséquent, la ventilation ralentit et peut même s'arrêter. Ce patron respiratoire est observé chez les patients souffrant de respiration périodique ou respiration de Cheyne-Stokes (Khoo, 2000), qui est caractérisée par la répétition cyclique d'une hyperventilation suivie d'un arrêt de la respiration. Également, un débit inspiratoire trop prononcé provoqué par l'hypercapnie peut provoquer un écrasement des voies aériennes supérieures, et donc une obstruction (White, 2005), spécialement durant le sommeil lorsque les voies aériennes sont peu toniques.

Finalement, une altération des chémossensibilités à l'hypoxie et à l'hypercapnie contribuerait à l'hypertension observée chez les patients souffrant d'apnées obstructives (Smith & Pacchia, 2007). En effet, il a été suggéré que ces patients présentent une élévation de l'activité tonique sympathique due, en partie, à une élévation anormale des chémossensibilités.

Sur la fonction cardiovasculaire. Nous observons également une tachycardie lorsque l'animal est exposé à 5% de CO₂. La présence de tachycardie durant une longue période peut entraîner un mauvais débit cardiaque et une fatigue du muscle cardiaque qui, si elle se prolonge, peut mener à une fibrillation cardiaque (Nattel *et al.*, 2005). Il est à noter qu'une tachycardie apparaît en général en réponse à une hypotension. Bien que nous n'observons pas d'hypotension lors de l'hypercapnie, la pression diastolique est basse dans l'étude IV au repos et en hypoxie. Le lien entre la tachycardie et l'hypotension observée dans nos études n'est pas clair, mais il suggère que la fonction cardiovasculaire est profondément affectée par le traitement et les conséquences à long terme de ces modifications cardiaques méritent des études supplémentaires.

Sur le sommeil. Le traitement néonatal à la caféine provoque également des changements dans l'architecture du sommeil. Un manque de sommeil, tel qu'observé dans l'étude V, peut contribuer à une somnolence durant la journée et au développement d'autres pathologies telles que l'hypertension (Budhiraja *et al.*, 2005; Wolk *et al.*, 2005). Bien que l'étude V utilise un modèle animal spécifique visant à reproduire le traitement à la caféine dont bénéficie les prématurés, les résultats de cette étude mettent en évidence les effets chroniques de la caféine sur le sommeil et permettent de s'interroger sur les effets à long terme de la caféine administré au nouveau-né sur cet aspect de la physiologie.

8.2. *Les effets potentiellement positifs.*

Sur le contrôle de la respiration. A l'opposé des spéculations précédentes, une sensibilité accrue aux variations d'oxygène ou de CO₂ peut être bénéfique à l'organisme. En effet, l'apparition d'apnées lors du sommeil paradoxal est due, en partie, à une

diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie à ce stade d'éveil-sommeil (Gothe *et al.*, 1981). Ainsi, une réponse ventilatoire à l'hypercapnie plus élevée chez les animaux NCT peut s'avérer un avantage lors du sommeil paradoxal afin de réagir plus rapidement à l'hypercapnie présente lors d'un apnée. De façon similaire, une augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie peut contribuer à diminuer l'apparition des apnées (Lefter *et al.*, 2007). Dans la même logique, l'augmentation de la variabilité respiratoire chez les rats NCT durant le sommeil paradoxal peut être vue comme une respiration présentant une activité riche et complexe lui permettant de s'adapter à plusieurs types de perturbations environnementales. En effet, il est normal d'observer chez l'individu sain une activité respiratoire présentant une certaine variabilité compte tenu des boucles de rétroaction et des entrées inhibitrices et excitatrices régulant le système (Li & Nattie, 2006). La variabilité observée chez les animaux NCT procure donc un avantage à ces animaux comparés aux contrôles. A l'appui de cette hypothèse, l'occurrence des apnées observée lors du sommeil est plus basse chez les rats NCT que chez les rats contrôles. En conclusion, ces résultats suggèrent que, grâce aux changements du contrôle respiratoire induits par le NCT, comme l'augmentation des réponses à l'hypoxie et à l'hypercapnie et de la variabilité respiratoire, le système de contrôle de la respiration du rat NCT s'adapte plus facilement aux irrégularités respiratoires auquel il est exposé.

La compréhension des mécanismes par lesquels la caféine induit une plasticité ou un changement permanent des fonctions nerveuses peut aider au développement de nouvelles thérapies ou du moins suggérer de nouvelles approches. Les rats traités à la caféine présentent des amplitudes plus élevées de l'activité du nerf phrénique quelles que soient les conditions dans lesquelles le nerf phrénique est mesuré. Ce phénomène pourrait être développé et exploité par traiter certaines pathologies liées au manque de tonicité musculaire. Par exemple, l'apnée obstructive du sommeil est caractérisée par l'obstruction des voies aériennes due au rétrécissement des voies aériennes supérieures qui est dû à plusieurs facteurs comme l'obésité, une accumulation de fluides dans les tissus des voies aériennes, mais aussi à la relaxation des muscles gardant les voies aériennes ouvertes lors de l'inspiration. C'est donc en partie la diminution de la commande motrice des voies aériennes qui contribue à l'obstruction, spécialement durant le sommeil paradoxal. Ainsi, la recherche d'une thérapie pharmacologique permettant de stimuler l'activité des voies

aériennes chez les patients souffrant d'apnées obstructives est d'un intérêt grandissant. À la lumière de nos résultats montrant une augmentation permanente prononcée de l'activité du nerf phrénique chez les rats NCT, on peut s'interroger si les nerfs commandant l'activité musculaire des voies aériennes présentent une augmentation similaire. Par exemple, au niveau du nerf de l'hypoglosse, un des nerfs qui innerve les muscles des voies aériennes supérieures, une augmentation persistante de l'activité respiratoire par un traitement chronique pourrait contribuer à la réduction de l'apnée. De façon similaire, les patients souffrant de sclérose latérale amyotrophique meurent en général d'un arrêt de la commande respiratoire lié à la destruction des neurones moteurs respiratoires constituant les nerfs phréniques. On peut alors s'interroger sur les effets à long terme d'un traitement chronique bloquant les récepteurs de l'adénosine sur l'activité du nerf phrénique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de plasticité mis en jeu par la caféine, en particulier au niveau du récepteur A_{2A} de l'adénosine, ouvre peut-être de nouvelles pistes dans le développement de thérapies. A ce propos, l'effet neuroprotecteur des antagonistes du récepteur A_{2A} de l'adénosine est actuellement envisagé comme traitement de cette pathologie (Mojsilovic-Petrovic *et al.*, 2006).

9. CONCLUSION

Le traitement néonatal à la caféine est largement utilisé en clinique pour traiter les apnées du prématuré. En utilisant un modèle animal, nous avons évalué les conséquences à long terme de ce traitement chez les rats juvénile et adulte. À l'aide de plusieurs techniques et approches complémentaires, nous démontrons que le traitement néonatal à la caféine induit une plasticité développementale des systèmes de contrôle de la respiration, de contrôle de la fonction cardiovasculaire et de régulation des stades d'éveil-sommeil. La compréhension des mécanismes responsables de la plasticité de la neuromodulation adénoenergique n'est pas encore complète mais les études présentées dans cet ouvrage ont permis d'en comprendre plusieurs aspects tout en ouvrant la voie à plusieurs études prometteuses. L'ensemble de ces travaux démontre également que l'étude du

fonctionnement du vivant ne peut pas se limiter à l'étude d'un seul système, ni se réduire à l'étude de l'animal anesthésié ou à celle de l'organe, mais requiert l'analyse de plusieurs systèmes interagissant entre eux. Cet ouvrage se termine donc par une réflexion sur la recherche biomédicale proposée par le pionnier de la physiologie, Julien-Jean-César Legallois (1770-1814). Bien que cette réflexion date du début du XIX^{ème} siècle, elle est toujours d'actualité et est encore parfois ignorée par le monde scientifique.

Je désirais bien disculper un peu les physiologistes qui font des expériences sur les animaux vivans[sic], des reproches de cruauté qu'on leur a si souvent adressés[sic]. Je conviens qu'il serait barbare de faire souffrir en vain des animaux, si le but des expériences pouvait être atteint sans cela. Mais c'est malheureusement une chose impossible. Les expériences sur les animaux sont un des plus grands flambeaux de la physiologie. Il y a l'infini entre l'animal mort et l'animal le plus faiblement vivant. Si le plus habile mécanicien ne peut connaître tout l'effet d'une machine qu'après l'avoir vue en action, comment le plus savant anatomiste pourrait-il deviner, par la seule étude des organes, le jeu d'une machine aussi prodigieusement compliquée que l'est le corps animal. Pour en pénétrer les secrets, il ne suffit pas d'observer le jeu simultané de toutes les fonctions dans l'animal en santé, il est surtout important d'étudier les effets du dérangement ou de la cessation de telle ou telle fonction. C'est à déterminer par cette analyse la fonction de tel ou tel organe, et sa corrélation[sic] avec les autres fonctions, qui consiste tout l'art des expériences sur les animaux vivans[sic]. Mais pour parvenir à le faire avec quelque précision, on est dans l'indispensable nécessité de multiplier les victimes, à cause du grand nombre de circonstances et d'accidents qui peuvent rendre les résultats nuls ou incertains. Je dirais volontiers des expériences physiologiques, ce que l'on a dit des bienfaits : *Perdenda sunt multa, ut semel ponas bene.*¹ Senèque.

Œuvres de C^{ar} Legallois, tome premier,
Expériences sur le principe de la vie,
notamment sur celui des mouvements du
cœur, et sur le siège de ce principe, Paris
1830.

¹ Traduction française de Jean-Jacques Rousseau. *Perdez force bienfaits, pour en bien placer un.*

BIBLIOGRAPHIE

Abu-Shaweesh JM, Dreshaj IA, Thomas AJ, Haxhiu MA, Strohl KP, & Martin RJ (1999). Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. *J Appl Physiol* **87**, 484-490.

Aden U, Herlenius E, Tang LQ, & Fredholm BB (2000). Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr Res* **48**, 177-183.

Agence de santé publique du Canada (2006). Système canadien de surveillance périnatale. http://www.phac-aspc.gc.ca/rhs-ssg/factsheets/pterm_f.html.

Al-Aif S, Alvaro R, Manfreda J, Kwiatkowski K, Cates D, Qurashi M, & Rigatto H (2008). A Randomized Controlled Trial of Theophylline Versus CO₂ Inhalation for Treating Apnea of Prematurity. *J Pediatr*.

Al-Aif S, Alvaro R, Manfreda J, Kwiatkowski K, Cates D, & Rigatto H (2001). Inhalation of low (0.5%-1.5%) CO₂ as a potential treatment for apnea of prematurity. *Semin Perinatol* **25**, 100-106.

Al-Matary A, Kutbi I, Qurashi M, Khalil M, Alvaro R, Kwiatkowski K, Cates D, & Rigatto H (2004). Increased peripheral chemoreceptor activity may be critical in destabilizing breathing in neonates. *Semin Perinatol* **28**, 264-272.

Alam MN, Szymusiak R, Gong H, King J, & McGinty D (1999). Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J Physiol* **521 Pt 3**, 679-690.

Albasanz JL, Leon D, Ruiz MA, Fernandez M, & Martin M (2002). Adenosine A1 receptor agonist treatment up-regulates rat brain metabotropic glutamate receptors. *Biochim Biophys Acta* **1593**, 69-75.

Albino-Teixeira A, Matias A, Polonia J, & Azevedo I (1991). Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J Hypertens Suppl* **9**, S196-S197.

Alden ER, Mandelkorn T, Woodrum DE, Wennberg RP, Parks CR, & Hodson WA (1972). Morbidity and mortality of infants weighing less than 1,000 grams in an intensive care nursery. *Pediatrics* **50**, 40-49.

Alheid GF, Milsom WK, & McCrimmon DR (2004). Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 105-114.

Ali S, Mustafa SJ, & Metzger WJ (1994). Adenosine receptor-mediated bronchoconstriction and bronchial hyperresponsiveness in allergic rabbit model. *Am J Physiol* **266**, L271-L277.

Altman DG & Bland JM (2003). Interaction revisited: the difference between two estimates. *BMJ* **326**, 219.

Ambrosio AF, Malva JO, Carvalho AP, & Carvalho CM (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by activation of adenosine A1 receptors in rat striatal glutamatergic nerve terminals. *Neurosci Lett* **220**, 163-166.

American Academy of Pediatrics (1985). Task Force on Prolonged Infantile Apnea. Prolonged infantile apnea: 1985. *Pediatrics* **76**, 129-131.

Aranda JV, Gorman W, Bergsteinsson H, & Gunn T (1977). Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant. *J Pediatr* **90**, 467-472.

Bairam A, Boutroy MJ, Badonnel Y, & Vert P (1987). Theophylline versus caffeine: comparative effects in treatment of idiopathic apnea in the preterm infant. *J Pediatr* **110**, 636-639.

Bairam A & Carroll JL (2005). Neurotransmitters in carotid body development. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 217-232.

Bairam A, De GP, Dauphin C, & Marchal F (1997). Effects of caffeine on carotid sinus nerve chemosensory discharge in kittens and cats. *J Appl Physiol* **82**, 413-418.

Bairam A, Joseph V, Lajeunesse Y, & Kinkead R (2006a). Developmental pattern of M1 and M2 muscarinic gene expression and receptor levels in cat carotid body, petrosal and superior cervical ganglion. *Neuroscience* **139**, 711-721.

Bairam A, Kinkead R, & Joseph V (2006b). Neonatal Environment and Neuroendocrine Programming of the Peripheral Respiratory Control System. *Current Pediatric Reviews* **2**, 199-208.

Ballantyne D & Scheid P (2001). Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir Physiol* **129**, 5-12.

Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, & Mahy N (1991). Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* **142**, 97-103.

Banno K & Kryger MH (2007). Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep Med* **8**, 400-426.

Barraco RA, el-Ridi MR, Ergene E, & Phillis JW (1991). Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. *Brain Res Bull* **26**, 59-84.

Barraco RA & Janusz CA (1989). Respiratory effects of 5'-ethylcarboxamidoadenosine, an analog of adenosine, following microinjections into the nucleus tractus solitarius of rats. *Brain Res* **480**, 360-364.

Barraco RA, Marcantonio DR, Phillis JW, & Campbell WR (1987). The effects of parenteral injections of adenosine and its analogs on blood pressure and heart rate in the rat. *Gen Pharmacol* **18**, 405-416.

Barraco RA, O'Leary DS, Ergene E, & Scislo TJ (1996). Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst* **59**, 113-124.

Basheer R, Halldner L, Alanko L, McCarley RW, Fredholm BB, & Porkka-Heiskanen T (2001). Opposite changes in adenosine A1 and A2A receptor mRNA in the rat following sleep deprivation. *Neuroreport* **12**, 1577-1580.

Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, & McCarley RW (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol* **73**, 379-396.

Bauer J, Maier K, Linderkamp O, & Hentschel R (2001). Effect of caffeine on oxygen consumption and metabolic rate in very low birth weight infants with idiopathic apnea. *Pediatrics* **107**, 660-663.

- Bayliss DA & Millhorn DE (1992). Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *J Appl Physiol* **73**, 393-404.
- Benington JH & Heller HC (1995). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* **45**, 347-360.
- Benington JH, Kodali SK, & Heller HC (1995). Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation. *Brain Res* **692**, 79-85.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, & Larnicol N (2000). Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res* **857**, 30-40.
- Bhatt-Mehta V & Schumacher RE (2003). Treatment of apnea of prematurity. *Paediatr Drugs* **5**, 195-210.
- Biaggioni I, Killian TJ, Mosqueda-Garcia R, Robertson RM, & Robertson D (1991a). Adenosine increases sympathetic nerve traffic in humans. *Circulation* **83**, 1668-1675.
- Biaggioni I, Olafsson B, Robertson RM, Hollister AS, & Robertson D (1987). Cardiovascular and respiratory effects of adenosine in conscious man. Evidence for chemoreceptor activation. *Circ Res* **61**, 779-786.
- Biaggioni I, Paul S, Puckett A, & Arzubiaga C (1991b). Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **258**, 588-593.
- Bissonnette JM (2000). Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, 1391-400.
- Bissonnette JM & Reddington M (1991). Autoradiographic localization of adenosine A1 receptors in brainstem of fetal sheep. *Brain Res Dev Brain Res* **61**, 111-115.
- Blanchard PW, Cote A, Hobbs S, Foulon P, Aranda JV, & Bureau MA (1986). Abolition of ventilatory response to caffeine in chemodenervated lambs. *J Appl Physiol* **61**, 133-137.
- Bodineau L, Cayetanot F, Sadani-Makki F, Bach V, Gros F, Lebleu A, Collin T, & Frugiere A (2003). Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pediatr Res* **53**, 266-273.

Bodineau L, Saadani-Makki F, Jullien H, & Frugiere A (2006). Caffeine in the milk prevents respiratory disorders caused by in utero caffeine exposure in rats. *Respir Physiol Neurobiol* **150**, 94-98.

Boulenger JP, Patel J, Post RM, Parma AM, & Marangos PJ (1983). Chronic caffeine consumption increases the number of brain adenosine receptors. *Life Sci* **32**, 1135-1142.

Bowes G, Woolf GM, Sullivan CE, & Phillipson EA (1980). Effect of sleep fragmentation on ventilatory and arousal responses of sleeping dogs to respiratory stimuli. *Am Rev Respir Dis* **122**, 899-908.

Brackett LE, Shamim MT, & Daly JW (1990). Activities of caffeine, theophylline, and enprofylline analogs as tracheal relaxants. *Biochem Pharmacol* **39**, 1897-1904.

Bradley SR, Pieribone VA, Wang W, Severson CA, Jacobs RA, & Richerson GB (2002). Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. *Nat Neurosci* **5**, 401-402.

Brennan M, Palaniswami M, & Kamen P (2001). Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans Biomed Eng* **48**, 1342-1347.

Brennan M, Palaniswami M, & Kamen P (2002). Poincare plot interpretation using a physiological model of HRV based on a network of oscillators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1873-H1886.

Brown LK (1994). Respiratory dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Chest Med* **15**, 715-727.

Brown RD, Thoren P, Steege A, Mrowka R, Sallstrom J, Skott O, Fredholm BB, & Persson AE (2006). Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1324-R1329.

Budhiraja R, Sharief I, & Quan SF (2005). Sleep disordered breathing and hypertension. *J Clin Sleep Med* **1**, 401-404.

Burr D & Sinclair JD (1988). The effect of adenosine on respiratory chemosensitivity in the awake rat. *Respir Physiol* **72**, 47-57.

Cacciari B, Pastorin G, & Spalluto G (2003). Medicinal chemistry of A2A adenosine receptor antagonists. *Curr Top Med Chem* **3**, 403-411.

Cardot V, Chardon K, Tourneux P, Micallef S, Stephan E, Leke A, Bach V, Libert JP, & Telliez F (2007). Ventilatory Response to a Hyperoxic Test Is Related to the Frequency of Short Apneic Episodes in Late Preterm Neonates. *Pediatr Res* **62**, 591-596.

Carlo WA, Martin RJ, & DiFiore JM (1988). Differences in CO2 threshold of respiratory muscles in preterm infants. *J Appl Physiol* **65**, 2434-2439.

Carnielli VP, Verlato G, Benini F, Rossi K, Cavedagni M, Filippone M, Baraldi E, & Zacchello F (2000). Metabolic and respiratory effects of theophylline in the preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **83**, F39-F43.

Carrettiero DC & Fior-Chadi DR (2004). Adenosine A1 receptor distribution in the nucleus tractus solitarius of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neural Transm* **111**, 465-473.

Carroll JL (2003). Plasticity in Respiratory Motor Control: Invited Review: Developmental plasticity in respiratory control. *J Appl Physiol* **94**, 375-89.

Caruso M, Holgate ST, & Polosa R (2006). Adenosine signalling in airways. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 251-256.

Casolo GC, Stroder P, Sulla A, Chelucci A, Freni A, & Zeraushek M (1995). Heart rate variability and functional severity of congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Eur Heart J* **16**, 360-367.

Chardon K, Bach V, Telliez F, Cardot V, Tourneux P, Leke A, & Libert JP (2004). Effect of caffeine on peripheral chemoreceptor activity in premature neonates: interaction with sleep stages. *J Appl Physiol* **96**, 2161-2166.

Chen G & van den Pol AN (1997). Adenosine modulation of calcium currents and presynaptic inhibition of GABA release in suprachiasmatic and arcuate nucleus neurons. *J Neurophysiol* **77**, 3035-3047.

Cherniack NS, Longobardo G, & Evangelista CJ (2005). Causes of Cheyne-Stokes respiration. *Neurocrit Care* **3**, 271-279.

Ciruela F, Escriche M, Burgueno J, Angulo E, Casado V, Soloviev MM, Canela EI, Mallol J, Chan WY, Lluís C, McIlhinney RA, & Franco R (2001). Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem* **276**, 18345-18351.

Clancy B, Darlington RB, & Finlay BL (2001). Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* **105**, 7-17.

Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, & Anand KJ (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* **28**, 931-937.

Coates EL, Li A, & Nattie EE (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* **75**, 5-14.

Coleman CG, Baghdoyan HA, & Lydic R (2006). Dialysis delivery of an adenosine A2A agonist into the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse increases pontine acetylcholine release and sleep. *J Neurochem* **96**, 1750-1759.

Comer AM, Perry CM, & Figgitt DP (2001). Caffeine citrate: a review of its use in apnoea of prematurity. *Paediatr Drugs* **3**, 61-79.

Conde SV & Monteiro EC (2004). Hypoxia induces adenosine release from the rat carotid body. *J Neurochem* **89**, 1148-1156.

Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, Rocher A, & Gonzalez C (2006). Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. *J Neurochem* **98**, 616-628.

Curran-Everett D & Benos DJ (2004). Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R247-R249.

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

D'Urzo AD, Jhirad R, Jenne H, Avendano MA, Rubinstein I, D'Costa M, & Goldstein RS (1990). Effect of caffeine on ventilatory responses to hypercapnia, hypoxia, and exercise in humans. *J Appl Physiol* **68**, 322-328.

Dampney RA (1994). The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Prog Neurobiol* **42**, 197-227.

Dampney RA, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MA, Potts PD, & Polson JW (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand* **177**, 209-218.

Davi MJ, Sankaran K, Simons KJ, Simons FE, Seshia MM, & Rigatto H (1978). Physiologic changes induced by theophylline in the treatment of apnea in preterm infants. *J Pediatr* **92**, 91-95.

Davis PG, Doyle LW, Rickards AL, Kelly EA, Ford GW, Davis NM, & Callanan C (2000). Methylxanthines and sensorineural outcome at 14 years in children < 1501 g birthweight. *J Paediatr Child Health* **36**, 47-50.

Day TA & Wilson RJ (2007). Brainstem PCO₂ modulates phrenic responses to specific carotid body hypoxia in an in situ dual perfused rat preparation. *J Physiol* **578**, 843-857.

De Carolis MP, Romagnoli C, Muzii U, Tortorolo G, Chiarotti M, De GN, & Carnevale A (1991). Pharmacokinetic aspects of caffeine in premature infants. *Dev Pharmacol Ther* **16**, 117-122.

de Paula PM & Machado BH (2001). Antagonism of adenosine A(1) receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R2072-R2078.

deGraaf-Peters VB & Hadders-Algra M (2006). Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? *Early Hum Dev* **82**, 257-266.

Dempsey JA, Smith CA, Przybylowski T, Chenuel B, Xie A, Nakayama H, & Skatrud JB (2004). The ventilatory responsiveness to CO₂ below eupnoea as a determinant of ventilatory stability in sleep. *J Physiol* **560**, 1-11.

Dews PB (1982). Caffeine. *Annu Rev Nutr* **2**, 323-341.

Dhalla AK, Wong MY, Wang WQ, Biaggioni I, & Belardinelli L (2006). Tachycardia caused by A_{2A} adenosine receptor agonists is mediated by direct sympathoexcitation in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 695-702.

Doan VD, Gagnon S, & Joseph V (2004). Prenatal blockade of estradiol synthesis impairs respiratory and metabolic responses to hypoxia in newborn and adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R612-R618.

Drorbaugh JE & Fenn WO (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**, 81-87.

Dumas TC & Foster TC (1998). Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* **105**, 137-139.

Dunwiddie TV (1985). The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* **27**, 63-139.

Dunwiddie TV & Diao L (1994). Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 537-545.

Dunwiddie TV, Diao L, Kim HO, Jiang JL, & Jacobson KA (1997). Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 607-614.

Dunwiddie TV & Fredholm BB (1989). Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* **249**, 31-37.

Dunwiddie TV & Masino SA (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**, 31-55.

Edwards FA & Robertson SJ (1999). The function of A2 adenosine receptors in the mammalian brain: evidence for inhibition vs. enhancement of voltage gated calcium channels and neurotransmitter release. *Prog Brain Res* **120**, 265-273.

Ehrengruber MU, Doupnik CA, Xu Y, Garvey J, Jasek MC, Lester HA, & Davidson N (1997). Activation of heteromeric G protein-gated inward rectifier K⁺ channels overexpressed by adenovirus gene transfer inhibits the excitability of hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7070-7075.

El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, & Vaugeois JM (2000). The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol* **129**, 1465-1473.

Emery MJ, Hlastala MP, & Matsumoto AM (1994). Depression of hypercapnic ventilatory drive by testosterone in the sleeping infant primate. *J Appl Physiol* **76**, 1786-1793.

Enhorning G, van SS, Lundgren C, & Vargas I (1998). Whole-body plethysmography, does it measure tidal volume of small animals? *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 945-951.

Erenberg A, Leff RD, Haack DG, Mosdell KW, Hicks GM, & Wynne BA (2000). Caffeine citrate for the treatment of apnea of prematurity: a double-blind, placebo-controlled study. *Pharmacotherapy* **20**, 644-652.

Etzell BA & Guillet R (1994). Effects of neonatal exposure to caffeine on adenosine A1 receptor ontogeny using autoradiography. *Brain Res Dev Brain Res* **82**, 223-230.

Ezure K (2004). Respiration-related afferents to parabrachial pontine regions. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 167-175.

Fastbom J & Fredholm BB (1990). Effects of long-term theophylline treatment on adenosine A1-receptors in rat brain: autoradiographic evidence for increased receptor number and altered coupling to G-proteins. *Brain Res* **507**, 195-199.

Feldberg S & Sherwood SW (1954). Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J Physiol* **123**, 148-167.

Feldman JL (1976). A network model for control of inspiratory cutoff by the pneumotaxic center with supportive experimental data in cats. *Biol Cybern* **21**, 131-138.

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

Feldman JL, Mitchell GS, & Nattie EE (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* **26**, 239-266.

- Fencl V, Miller TB, & Pappenheimer JR (1966). Studies on the respiratory response to disturbances of acid-base balance, with deductions concerning the ionic composition of cerebral interstitial fluid. *Am J Physiol* **210**, 459-472.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, & Fuxe K (1997). Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **20**, 482-487.
- Finer NN, Higgins R, Kattwinkel J, & Martin RJ (2006). Summary proceedings from the apnea-of-prematurity group. *Pediatrics* **117**, S47-S51.
- Finlay BL & Darlington RB (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* **268**, 1578-1584.
- Finlayson K, Butcher SP, Sharkey J, & Olverman HJ (1997). Detection of adenosine receptor antagonists in rat brain using a modified radioreceptor assay. *J Neurosci Methods* **77**, 135-142.
- Finley JC & Katz DM (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* **572**, 108-116.
- Fisher S & Guillet R (1997). Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age- and gender-related manner. *Brain Res Dev Brain Res* **98**, 145-149.
- Fitzgerald M (2005). The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**, 507-520.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, & Chang I (2006a). The impact of PCO₂ and H⁺ on the release of acetylcholine from the cat carotid body. *Neurosci Lett* **397**, 205-209.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, Chang I, & Balbir A (2006b). Modulators of cat carotid body chemotransduction. *Adv Exp Med Biol* **580**, 307-311.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, & Wang HY (1999). Acetylcholine release from cat carotid bodies. *Brain Res* **841**, 53-61.
- Franco P, Seret N, Van Hees JN, Lanquart JP, Jr., Groswasser J, & Kahn A (2003). Cardiac changes during sleep in sleep-deprived infants. *Sleep* **26**, 845-848.

Franco P, Seret N, Van Hees JN, Scaillet S, Vermeulen F, Groswasser J, & Kahn A (2004). Decreased arousals among healthy infants after short-term sleep deprivation. *Pediatrics* **114**, e192-e197.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, & Zvartau EE (1999a). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**, 83-133.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, & Zvartau EE (1999b). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**, 83-133.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, & Vaugeois JM (2005). Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**, 191-270.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, & Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527-552.

Fuxe K, Ferre S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Marcellino D, Goldberg SR, Staines W, Jacobsen KX, Lluis C, Woods AS, Agnati LF, & Franco R (2005). Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J Mol Neurosci* **26**, 209-220.

Fuxe K, Ferre S, Genedani S, Franco R, & Agnati LF (2007). Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav.*

Gallopin T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, Lambollez B, & Fort P (2005). The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* **134**, 1377-1390.

Gauda EB & Lawson EE (2000). Developmental influences on carotid body responses to hypoxia. *Respir Physiol* **121**, 199-208.

Gauda EB, Northington FJ, Linden J, & Rosin DL (2000). Differential expression of A(2a), A(1)-adenosine and D(2)-dopamine receptor genes in rat peripheral arterial chemoreceptors during postnatal development. *Brain Res* **872**, 1-10.

- Gaytan SP, Saadani-Makki F, Bodineau L, Frugiere A, Larnicol N, & Pasaro R (2006). Effect of postnatal exposure to caffeine on the pattern of adenosine A(1) receptor distribution in respiration-related nuclei of the rat brainstem. *Auton Neurosci* **126-127**, 339-346.
- Genest SE, Balon N, Laforest S, Drolet G, & Kinkead R (2007). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* **583**, 299-314.
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, & Kinkead R. Neonatal maternal separation alters development of the hypercapnic ventilatory response in awake adult rats. *Respir Res* 2[Suppl 1], S31-S37. 2001.
Ref Type: Abstract
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, & Kinkead R (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* **554**, 543-557.
- Gerhardt T & Bancalari E (1984). Apnea of prematurity: I. Lung function and regulation of breathing. *Pediatrics* **74**, 58-62.
- Gleeson K & Zvillich CW (1992). Adenosine infusion and periodic breathing during sleep. *J Appl Physiol* **72**, 1004-1009.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, & Rigual R (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**, 829-898.
- Gothe B, Altose MD, Goldman MD, & Cherniack NS (1981). Effect of quiet sleep on resting and CO₂-stimulated breathing in humans. *J Appl Physiol* **50**, 724-730.
- Gourine AV, Llaudet E, Thomas T, Dale N, & Spyer KM (2002). Adenosine release in nucleus tractus solitarii does not appear to mediate hypoxia-induced respiratory depression in rats. *J Physiol* **544**, 161-170.
- Gozal E & Gozal D (2001). Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: developmental interactions. *J Appl Physiol* **90**, 1995-9.

- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, & Feldman JL (2001). Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* **4**, 927-930.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, & Feldman JL (1999). Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* **286**, 1566-1568.
- Greene RW & Haas HL (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **36**, 329-341.
- Greer JJ & Funk GD (2005). Perinatal development of respiratory motoneurons. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 43-61.
- Griffiths TL, Christie JM, Parsons ST, & Holgate ST (1997). The effect of dipyridamole and theophylline on hypercapnic ventilatory responses: the role of adenosine. *Eur Respir J* **10**, 156-160.
- Grunau RE, Holsti L, & Peters JW (2006). Long-term consequences of pain in human neonates. *Semin Fetal Neonatal Med* **11**, 268-275.
- Guillet R (1990). Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in the developing rat. *Dev Pharmacol Ther* **15**, 94-100.
- Guillet R & Kellogg C (1991a). Neonatal exposure to therapeutic caffeine alters the ontogeny of adenosine A1 receptors in brain of rats. *Neuropharmacology* **30**, 489-496.
- Guillet R & Kellogg CK (1991b). Neonatal caffeine exposure alters developmental sensitivity to adenosine receptor ligands. *Pharmacol Biochem Behav* **40**, 811-817.
- Guimaraes S & Albino-Teixeira A (1996). Hypertension due to chronic blockade of P1-purinoceptors. *J Auton Pharmacol* **16**, 367-370.
- Guimaraes S, Morato M, Sousa T, & bino-Teixeira A (2003). Hypertension due to blockade of adenosine receptors. *Pharmacol Toxicol* **92**, 160-162.
- Guo ZL, Li P, & Longhurst JC (2002). Central pathways in the pons and midbrain involved in cardiac sympathoexcitatory reflexes in cats. *Neuroscience* **113**, 435-447.

- Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335-346.
- Guyenet PG, Mulkey DK, Stornetta RL, & Bayliss DA (2005). Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J Neurosci* **25**, 8938-8947.
- Guzik P, Piskorski J, Krauze T, Schneider R, Wesseling KH, Wykretowicz A, & Wysocki H (2007). Correlations between Poincare Plot and Conventional Heart Rate Variability Parameters Assessed during Paced Breathing. *J Physiol Sci* **57**, 63-71.
- Halldner L, Aden U, Dahlberg V, Johansson B, Ledent C, & Fredholm BB (2004). The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2A receptors. *Neuropharmacology* **46**, 1008-1017.
- Hamrahi H, Chan B, & Horner RL (2001). On-line detection of sleep-wake states and application to produce intermittent hypoxia only in sleep in rats. *J Appl Physiol* **90**, 2130-2140.
- Hascoet JM, Hamon I, & Boutroy MJ (2000). Risks and benefits of therapies for apnoea in premature infants. *Drug Saf* **23**, 363-379.
- Hauser RA & Schwarzschild MA (2005). Adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. *Drugs Aging* **22**, 471-482.
- Hawkins M, Dugich MM, Porter NM, Urbancic M, & Radulovacki M (1988). Effects of chronic administration of caffeine on adenosine A1 and A2 receptors in rat brain. *Brain Res Bull* **21**, 479-482.
- Hayes MJ, Akilesh MR, Fukumizu M, Gilles AA, Sallinen BA, Troese M, & Paul JA (2007). Apneic preterms and methylxanthines: arousal deficits, sleep fragmentation and suppressed spontaneous movements. *J Perinatol* **27**, 782-789.
- Hedner J, Hedner T, Jonason J, & Lundberg D (1982). Evidence for a dopamine interaction with the central respiratory control system in the rat. *Eur J Pharmacol* **81**, 603-615.

Herlenius E, Aden U, Tang LQ, & Lagercrantz H (2002). Perinatal respiratory control and its modulation by adenosine and caffeine in the rat. *Pediatr Res* **51**, 4-12.

Herlenius E, Lagercrantz H, & Yamamoto Y (1997). Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. *Pediatr Res* **42**, 46-53.

Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, & Bevençut M (2004). Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 187-197.

Hirsh K (1984). Central nervous system pharmacology of the dietary methylxanthines. *Prog Clin Biol Res* **158**, 235-301.

Horiuchi J, McDowall LM, & Dampney RA (2006). Differential control of cardiac and sympathetic vasomotor activity from the dorsomedial hypothalamus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 1265-1268.

Horne RS, Parslow PM, & Harding R (2004). Respiratory control and arousal in sleeping infants. *Paediatr Respir Rev* **5**, 190-198.

Housley GD, Martin-Body RL, Dawson NJ, & Sinclair JD (1987). Brain stem projections of the glossopharyngeal nerve and its carotid sinus branch in the rat. *Neuroscience* **22**, 237-250.

Housley GD & Sinclair JD (1988). Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *J Physiol* **406**, 99-114.

Hove-Madsen L, Prat-Vidal C, Llach A, Ciruela F, Casado V, Lluís C, Bayes-Genis A, Cinca J, & Franco R (2006). Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release. *Cardiovasc Res* **72**, 292-302.

Howell LL (1993). Comparative effects of caffeine and selective phosphodiesterase inhibitors on respiration and behavior in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 894-903.

Howell LL, Morse WH, & Spealman RD (1990). Respiratory effects of xanthines and adenosine analogs in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **254**, 786-791.

Hsiao C, Lahiri S, & Mokashi A (1989). Peripheral and central dopamine receptors in respiratory control. *Respir Physiol* **76**, 327-336.

Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, & Hayaishi O (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* **8**, 858-859.

Iturriaga R & Alcaayaga J (2004). Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev* **47**, 46-53.

Iturriaga R, Larrain C, & Zapata P (1994). Effects of dopaminergic blockade upon carotid chemosensory activity and its hypoxia-induced excitation. *Brain Res* **663**, 145-154.

Jacky JP (1980). Barometric measurement of tidal volume: effects of pattern and nasal temperature. *J Appl Physiol* **49**, 319-325.

Janczewski WA & Feldman JL (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* **570**, 407-420.

Javaheri S (1999). A mechanism of central sleep apnea in patients with heart failure. *N Engl J Med* **341**, 949-954.

Jee SH, He J, Whelton PK, Suh I, & Klag MJ (1999). The effect of chronic coffee drinking on blood pressure: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Hypertension* **33**, 647-652.

Johansson B, Georgiev V, & Fredholm BB (1997a). Distribution and postnatal ontogeny of adenosine A2A receptors in rat brain: comparison with dopamine receptors. *Neuroscience* **80**, 1187-1207.

Johansson B, Georgiev V, Lindstrom K, & Fredholm BB (1997b). A1 and A2A adenosine receptors and A1 mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res* **762**, 153-164.

Jonzon B, Sylven C, Beermann B, & Brandt R (1989). Adenosine receptor mediated stimulation of ventilation in man. *Eur J Clin Invest* **19**, 65-71.

Jouvet M (1994). Paradoxical sleep mechanisms. *Sleep* **17**, S77-S83.

Juarez-Mendez S, Carretero R, Martinez-Tellez R, Silva-Gomez AB, & Flores G (2006). Neonatal caffeine administration causes a permanent increase in the dendritic length of prefrontal cortical neurons of rats. *Synapse* **60**, 450-455.

Kalia M (1977). Neuroanatomical organization of the respiratory centers. *Fed Proc* **36**, 2405-2411.

Kalia M (2006). Neurobiology of sleep. *Metabolism* **55**, S2-S6.

Kara T, Narkiewicz K, & Somers VK (2003). Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand* **177**, 377-384.

Karcz-Kubicha M, Antoniou K, Terasmaa A, Quarta D, Solinas M, Justinova Z, Pezzola A, Reggio R, Muller CE, Fuxe K, Goldberg SR, Popoli P, & Ferre S (2003). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1281-1291.

Kawai A, Ballantyne D, Muckenhoff K, & Scheid P (1996). Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* **492 (Pt 1)**, 277-292.

Khan A, Qurashi M, Kwiatkowski K, Cates D, & Rigatto H (2005). Measurement of the CO₂ apneic threshold in newborn infants: possible relevance for periodic breathing and apnea. *J Appl Physiol* **98**, 1171-1176.

Khoo MC (2000). Determinants of ventilatory instability and variability. *Respir Physiol* **122**, 167-182.

Kinkead R, Dupenloup L, Valois N, & Gulemetova R (2001). Stress-induced attenuation of the hypercapnic ventilatory response in awake rats. *J Appl Physiol* **90**, 1729-35.

Kinkead R, Genest SE, Gulemetova R, Lajeunesse Y, Laforest S, Drolet G, & Bairam A (2005a). Neonatal maternal separation and early life programming of the hypoxic ventilatory response in rats. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 313-324.

Kinkead R, Gulemetova R, & Bairam A (2005b). Neonatal maternal separation enhances phrenic responses to hypoxia and carotid sinus nerve stimulation in the adult anesthetised rat. *J Appl Physiol* **99**, 189-196.

Kinkead R, Joseph V, Lajeunesse Y, & Bairam A (2005c). Neonatal maternal separation enhances dopamine D(2)-receptor and tyrosine hydroxylase mRNA expression levels in carotid body of rats. *Can J Physiol Pharmacol* **83**, 76-84.

Kobayashi S, Conforti L, & Millhorn DE (2000). Gene expression and function of adenosine A(2A) receptor in the rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L273-L282.

Koos BJ & Chau A (1998). Fetal cardiovascular and breathing responses to an adenosine A2a receptor agonist in sheep. *Am J Physiol* **274**, R152-R159.

Koos BJ, Kawasaki Y, Kim YH, & Bohorquez F (2005). Adenosine A2A-receptor blockade abolishes the roll-off respiratory response to hypoxia in awake lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1185-R1194.

Koos BJ, Maeda T, & Jan C (2001). Adenosine A(1) and A(2A) receptors modulate sleep state and breathing in fetal sheep. *J Appl Physiol* **91**, 343-350.

Krimsky WR & Leiter JC (2005). Physiology of breathing and respiratory control during sleep. *Semin Respir Crit Care Med* **26**, 5-12.

Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, & McCrimmon DR (2006). Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol* **101**, 618-627.

Kumar P, Conway AF, Vandier C, Marshall NJ, Bruynseels J, & Matthews GM (2000). Effect of adenosine on CO₂ chemosensitivity. Functional, cellular, and molecular studies. *Adv Exp Med Biol* **475**, 405-410.

Lagercrantz H, Yamamoto Y, Fredholm BB, Prabhakar NR, & von EC (1984). Adenosine analogues depress ventilation in rabbit neonates. Theophylline stimulation of respiration via adenosine receptors? *Pediatr Res* **18**, 387-390.

Lahiri S & Forster RE (2003). CO₂/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1413-1435.

Lahiri S, Mokashi A, Mulligan E, & Nishino T (1981). Comparison of aortic and carotid chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol* **51**, 55-61.

Lalley PM (2004). Dopamine1 receptor agonists reverse opioid respiratory network depression, increase CO2 reactivity. *Respir Physiol Neurobiol* **139**, 247-262.

Lalley PM (2005). D1-dopamine receptor agonists prevent and reverse opiate depression of breathing but not antinociception in the cat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R45-R51.

Lasley RD & Smart EJ (2001). Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. *Trends Cardiovasc Med* **11**, 259-263.

Le Guennec JC, Billon B, & Pare C (1985). Maturation changes of caffeine concentrations and disposition in infancy during maintenance therapy for apnea of prematurity: influence of gestational age, hepatic disease, and breast-feeding. *Pediatrics* **76**, 834-840.

Lee MG, Hassani OK, Alonso A, & Jones BE (2005). Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* **25**, 4365-4369.

Leevers AM, Simon PM, & Dempsey JA (1994). Apnea after normocapnic mechanical ventilation during NREM sleep. *J Appl Physiol* **77**, 2079-2085.

Lefter R, Morency CE, & Joseph V (2007). Progesterone increases hypoxic ventilatory response and reduces apneas in newborn rats. *Respir Physiol Neurobiol* **156**, 9-16.

Leon AE, Michienzi K, Ma CX, & Hutchison AA (2007). Serum caffeine concentrations in preterm neonates. *Am J Perinatol* **24**, 39-47.

Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, Fernandez M, & Martin M (2002). Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem* **82**, 625-634.

Li A & Nattie E (2002). CO2 dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir Physiol Neurobiol* **133**, 11-22.

Li A & Nattie E (2006). Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* **570**, 385-396.

- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, & Meaney MJ (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* **3**, 799-806.
- Liu Q, Lowry TF, & Wong-Riley MT (2006). Postnatal changes in ventilation during normoxia and acute hypoxia in the rat: implication for a sensitive period. *J Physiol* **577**, 957-970.
- Lopez-Barneo J, Pardal R, & Ortega-Saenz P (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* **63**, 259-287.
- Lu J, Greco MA, Shiromani P, & Saper CB (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* **20**, 3830-3842.
- Lumsden T (1923). Observations on the respiratory centres in the cat. *J Physiol* **57**, 153-160.
- Lundblad LK, Irvin CG, Adler A, & Bates JH (2002). A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. *J Appl Physiol* **93**, 1198-1207.
- Lupica CR, Berman RF, & Jarvis MF (1991). Chronic theophylline treatment increases adenosine A1, but not A2, receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study. *Synapse* **9**, 95-102.
- Malpas SC (2002). Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H6-20.
- Marangos PJ, Boulenger JP, & Patel J (1984). Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies. *Life Sci* **34**, 899-907.
- Marchal F, Bairam A, & Vert P (1987). Neonatal apnea and apneic syndromes. *Clin Perinatol* **14**, 509-529.
- Marcus CL (2001). Sleep-disordered breathing in children. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 16-30.
- Marks GA, Birabil CG, & Speciale SG (2005). Adenosine A1 receptors mediate inhibition of cAMP formation in vitro in the pontine, REM sleep induction zone. *Brain Res* **1061**, 124-127.

Marks GA, Shaffery JP, Speciale SG, & Birabil CG (2003). Enhancement of rapid eye movement sleep in the rat by actions at A1 and A2a adenosine receptor subtypes with a differential sensitivity to atropine. *Neuroscience* **116**, 913-920.

Martin RJ & Abu-Shaweesh JM (2005). Control of breathing and neonatal apnea. *Biol Neonate* **87**, 288-295.

Martin RJ, Abu-Shaweesh JM, & Baird TM (2004). Apnoea of prematurity. *Paediatr Respir Rev* **5 Suppl A**, S377-S382.

Martin-Body RL, Robson GJ, & Sinclair JD (1985). Respiratory effects of sectioning the carotid sinus glossopharyngeal and abdominal vagal nerves in the awake rat. *J Physiol* **361**, 35-45.

Martin-Body RL, Robson GJ, & Sinclair JD (1986). Restoration of hypoxic respiratory responses in the awake rat after carotid body denervation by sinus nerve section. *J Physiol* **380**, 61-73.

Matsumura H, Nakajima T, Osaka T, Satoh S, Kawase K, Kubo E, Kantha SS, Kasahara K, & Hayaishi O (1994). Prostaglandin D2-sensitive, sleep-promoting zone defined in the ventral surface of the rostral basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11998-12002.

Maxwell DL, Fuller RW, Nolop KB, Dixon CM, & Hughes JM (1986). Effects of adenosine on ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in humans. *J Appl Physiol* **61**, 1762-1766.

Mayer CA, Haxhiu MA, Martin RJ, & Wilson CG (2006). Adenosine A2A receptors mediate GABAergic inhibition of respiration in immature rats. *J Appl Physiol* **100**, 91-97.

McCarley RW (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med* **8**, 302-330.

McQueen DS & Ribeiro JA (1983). On the specificity and type of receptor involved in carotid body chemoreceptor activation by adenosine in the cat. *Br J Pharmacol* **80**, 347-354.

McQueen DS & Ribeiro JA (1986). Pharmacological characterization of the receptor involved in chemoexcitation induced by adenosine. *Br J Pharmacol* **88**, 615-620.

Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiario CM, & Feldman JL (2003). Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* **37**, 821-826.

Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Giesen H, Wagner R, & Rapoport SI (1988). Periodic cessation of respiratory effort during sleep in adult rats. *Physiol Behav* **43**, 229-234.

Methippara MM, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, & McGinty D (2005). Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1715-R1723.

Mifflin SW (1997). Short-term potentiation of carotid sinus nerve inputs to neurons in the nucleus of the solitary tract. *Respir Physiol* **110**, 229-236.

Millar D & Schmidt B (2004). Controversies surrounding xanthine therapy. *Semin Neonatol* **9**, 239-244.

Miller HC, Behrle FC, & Smull NW (1959). Severe apnea and irregular respiratory rhythms among premature infants; a clinical and laboratory study. *Pediatrics* **23**, 676-685.

Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, & Severinghaus JW (1963). Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol* **18**, 523-533.

Modlinger PS & Welch WJ (2003). Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 497-502.

Mojsilovic-Petrovic J, Jeong GB, Crocker A, Arneja A, David S, Russell DS, & Kalb RG (2006). Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors. *J Neurosci* **26**, 9250-9263.

Montandon G, Bairam A, & Kinkead R (2006a). Long-term consequences of neonatal caffeine on ventilation, occurrence of apneas, and hypercapnic chemoreflex in male and female rats. *Pediatr Res* **59**, 519-524.

Montandon G, Bairam A, & Kinkead R (2008). Neonatal caffeine induces sex-specific developmental plasticity of the hypoxic respiratory chemoreflex in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

Montandon G, Kinkead R, & Bairam A (2007). Disruption of adenosinergic modulation of ventilation at rest and during hypercapnia by neonatal caffeine in young rats: role of adenosine A1 and A2A receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1621-R1631.

Montandon G, Kinkead R, Lajeunesse Y, & Bairam A (2006b). Neonatal caffeine augments the acute breathing frequency response to hypoxia and the adenosine and the dopamine receptor mRNA expression in the carotid body of adult rats. *The FASEB Journal, Abstracts* A1215, 752.3.

Monteiro EC & Ribeiro JA (1987). Ventilatory effects of adenosine mediated by carotid body chemoreceptors in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **335**, 143-148.

Monteiro EC & Ribeiro JA (1989). Adenosine deaminase and adenosine uptake inhibitions facilitate ventilation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **340**, 230-238.

Monti D, Carley DW, & Radulovacki M (1995). Adenosine analogues modulate the incidence of sleep apneas in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **51**, 125-131.

Monti D, Carley DW, & Radulovacki M (1996). p-SPA, a peripheral adenosine A1 analogue, reduces sleep apneas in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **53**, 341-345.

Moorthy SS, Sullivan TY, Fallon JH, Dierdorf SF, Radpour S, & DeAtley RE (1993). Loss of hypoxic ventilatory response following bilateral neck dissection. *Anesth Analg* **76**, 791-794.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, West GH, & Guyenet PG (2007). Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Physiol* **580**, 285-300.

Morrison JL, Sood S, Liu H, Park E, Nolan P, & Horner RL (2003). GABAA receptor antagonism at the hypoglossal motor nucleus increases genioglossus muscle activity in NREM but not REM sleep. *J Physiol* **548**, 569-583.

Mortola JP & Dotta A (1992). Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *Am J Physiol* **263**, R267-R272.

Mortola JP & Frappell PB (1998). On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 937-944.

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, & Guyenet PG (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* **7**, 1360-1369.

Murray TF (1982). Up-regulation of rat cortical adenosine receptors following chronic administration of theophylline. *Eur J Pharmacol* **82**, 113-114.

Nagel J, Schladebach H, Koch M, Schwienbacher I, Muller CE, & Hauber W (2003). Effects of an adenosine A2A receptor blockade in the nucleus accumbens on locomotion, feeding, and prepulse inhibition in rats. *Synapse* **49**, 279-286.

Nanoff C, Mitterauer T, Roka F, Hohenegger M, & Freissmuth M (1995). Species differences in A1 adenosine receptor/G protein coupling: identification of a membrane protein that stabilizes the association of the receptor/G protein complex. *Mol Pharmacol* **48**, 806-817.

Nantwi KD, Basura GJ, & Goshgarian HG (2003a). Adenosine A1 receptor mRNA expression and the effects of systemic theophylline administration on respiratory function 4 months after C2 hemisection. *J Spinal Cord Med* **26**, 364-371.

Nantwi KD, Basura GJ, & Goshgarian HG (2003b). Effects of long-term theophylline exposure on recovery of respiratory function and expression of adenosine A1 mRNA in cervical spinal cord hemisected adult rats. *Exp Neurol* **182**, 232-239.

Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, & Rivard L (2005). Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* **48**, 9-28.

Nattie E (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* **59**, 299-331.

Nattie EE (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol* **129**, 257-268.

Nattie EE & Li A (1996). Central chemoreception in the region of the ventral respiratory group in the rat. *J Appl Physiol* **81**, 1987-95.

Nattie EE & Li A (2001). CO₂ dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J Appl Physiol* **90**, 1247-1257.

Nattie EE & Li A (2002). CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J Appl Physiol* **92**, 2119-2130.

Nehlig A, Daval JL, Boyet S, & Vert P (1986). Comparative effects of acute and chronic administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* **129**, 93-103.

Nehlig A, Lucignani G, Kadekaro M, Porrino LJ, & Sokoloff L (1984). Effects of acute administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Eur J Pharmacol* **101**, 91-100.

Nelson RM, Resnick MB, Holstrum WJ, & Eitzman DV (1980). Developmental outcome of premature infants treated with theophylline. *Dev Pharmacol Ther* **1**, 274-280.

Neubauer JA, Posner MA, Santiago TV, & Edelman NH (1987). Naloxone reduces ventilatory depression of brain hypoxia. *J Appl Physiol* **63**, 699-706.

Newby AC (1991). Adenosine: origin and clinical roles. *Adv Exp Med Biol* **309A**, 265-270.

Neylan TC (1995). Physiology of arousal: Moruzzi and Magoun's ascending reticular activating system. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **7**, 250.

Noordzij M, Uiterwaal CS, Arends LR, Kok FJ, Grobbee DE, & Geleijnse JM (2005). Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* **23**, 921-928.

O'Regan M (2005). Adenosine and the regulation of cerebral blood flow. *Neurol Res* **27**, 175-181.

Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, & Hayashida Y (2005). Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci* **117**, 105-114.

Onimaru H & Homma I (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* **23**, 1478-1486.

Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, & Scheid P (1998). Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol* **513** (Pt 2), 381-398.

Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Sandrone G, Rimoldi O, Malfatto G, Cerutti S, & Malliani A (1984). Power spectral density of heart rate variability as an index of sympatho-vagal interaction in normal and hypertensive subjects. *J Hypertens Suppl* **2**, S383-S385.

Pagani M, Lombardi F, & Malliani A (1993). Heart rate variability: disagreement on the markers of sympathetic and parasympathetic activities. *J Am Coll Cardiol* **22**, 951-953.

Palmer TM, Poucher SM, Jacobson KA, & Stiles GL (1995). 125I-4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5] triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A2a adenosine receptor. *Mol Pharmacol* **48**, 970-974.

Pan HZ & Chen HH (2007). Hyperalgesia, low-anxiety, and impairment of avoidance learning in neonatal caffeine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)* **191**, 119-125.

Panula P, Yang HY, & Costa E (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2572-2576.

Patz MD, Day HE, Burow A, & Campeau S (2006). Modulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis by caffeine. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 493-500.

Paul S, Kurunwune B, & Biaggioni I (1993). Caffeine withdrawal: apparent heterologous sensitization to adenosine and prostacyclin actions in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* **267**, 838-843.

Peever JH & Stephenson R (1997). Day-night differences in the respiratory response to hypercapnia in awake adult rats. *Respir Physiol* **109**, 241-248.

Phillipson EA & Bowes G (1986). Control of breathing during sleep. In *Handbook of Physiology - The respiratory system II* pp. 649-989.

Pianosi P, Grondin D, Desmond K, Coates AL, & Aranda JV (1994). Effect of caffeine on the ventilatory response to inhaled carbon dioxide. *Respir Physiol* **95**, 311-320.

Pickel VM, Chan J, Linden J, & Rosin DL (2006). Subcellular distributions of adenosine A1 and A2A receptors in the rat dorsomedial nucleus of the solitary tract at the level of the area postrema. *Synapse* **60**, 496-509.

Piot O, Chauvel C, Lazarus A, Pellerin D, David D, Leneveut-Ledoux L, Guize L, & Le Heuzey JY (1998). Effects of a selective A1-adenosine receptor agonist on heart rate and heart rate variability during permanent atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* **21**, 2459-2464.

Poets CF, Stebbens VA, Samuels MP, & Southall DP (1993). The relationship between bradycardia, apnea, and hypoxemia in preterm infants. *Pediatr Res* **34**, 144-147.

Polson JB, Krzanowski JJ, Goldman AL, & Szentivanyi A (1978). Inhibition of human pulmonary phosphodiesterase activity by therapeutic levels of theophylline. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **5**, 535-539.

Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, & Stenberg D (2002). Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* **6**, 321-332.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, & McCarley RW (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* **99**, 507-517.

Portas CM, Thakkar M, Rainnie DG, Greene RW, & McCarley RW (1997). Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* **79**, 225-235.

Powell FL, Milsom WK, & Mitchell GS (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* **112**, 123-34.

Prabhakar NR (2006). O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* **91**, 17-23.

Prediger RD, Da CC, & Takahashi RN (2005a). Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol* **16**, 209-218.

- Prediger RD, Fernandes D, & Takahashi RN (2005b). Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res* **159**, 197-205.
- Prediger RD & Takahashi RN (2005). Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci Lett* **376**, 160-165.
- Radulovacki M (1985). Role of adenosine in sleep in rats. *Rev Clin Basic Pharm* **5**, 327-339.
- Radulovacki M, Virus RM, Djuricic-Nedelson M, & Green RD (1984). Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 268-274.
- Rainnie DG, Grunze HC, McCarley RW, & Greene RW (1994). Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science* **263**, 689-692.
- Reeves SR & Gozal D (2005). Developmental plasticity of respiratory control following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 301-311.
- Regenold JT & Illes P (1990). Inhibitory adenosine A1-receptors on rat locus coeruleus neurones. An intracellular electrophysiological study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **341**, 225-231.
- Richerson GB (2004). Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* **5**, 449-461.
- Rigatto H, Brady JP, & de IT, V (1975a). Chemoreceptor reflexes in preterm infants: I. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhalation of 100% and 15% oxygen. *Pediatrics* **55**, 604-613.
- Rigatto H, Brady JP, & de IT, V (1975b). Chemoreceptor reflexes in preterm infants: II. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhaled carbon dioxide. *Pediatrics* **55**, 614-620.
- Rivkees SA (1995). The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. *Brain Res Dev Brain Res* **89**, 202-213.

- Rivkees SA, Price SL, & Zhou FC (1995). Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* **677**, 193-203.
- Romijn HJ, Hofman MA, & Gramsbergen A (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* **26**, 61-67.
- Rorke S & Holgate ST (2002). Targeting adenosine receptors: novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Med* **1**, 99-105.
- Rose'Meyer RB, Mellick AS, Garnham BG, Harrison GJ, Massa HM, & Griffiths LR (2003). The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Brain Res Protoc* **11**, 9-18.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, & Linden J (1998). Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **401**, 163-186.
- Runold M, Cherniack NS, & Prabhakar NR (1990). Effect of adenosine on isolated and superfused cat carotid body activity. *Neurosci Lett* **113**, 111-114.
- Runold M, Lagercrantz H, & Fredholm BB (1986). Ventilatory effect of an adenosine analogue in unanesthetized rabbits during development. *J Appl Physiol* **61**, 255-259.
- Saadani-Makki F, Frugiere A, Gros F, Gaytan S, & Bodineau L (2004). Involvement of adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Neuroscience* **127**, 505-518.
- Saper CB, Scammell TE, & Lu J (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* **437**, 1257-1263.
- Satoh S, Matsumura H, Suzuki F, & Hayaishi O (1996). Promotion of sleep mediated by the A2a-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D2 in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5980-5984.

Scammell TE, Gerashchenko DY, Mochizuki T, McCarthy MT, Estabrooke IV, Sears CA, Saper CB, Urade Y, & Hayaishi O (2001). An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience* **107**, 653-663.

Schindler CW, Karcz-Kubicha M, Thorndike EB, Muller CE, Tella SR, Ferre S, & Goldberg SR (2005). Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A1 and A2A subtype receptor agonists. *Br J Pharmacol* **144**, 642-650.

Schmidt B (2005). Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) trial. *Biol Neonate* **88**, 208-213.

Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, & Tin W (2006). Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* **354**, 2112-2121.

Schultz HD, Li YL, & Ding Y (2007). Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. *Hypertension* **50**, 6-13.

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, & Morelli M (2006). Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **29**, 647-654.

Scislo TJ, Kitchen AM, Augustyniak RA, & O'Leary DS (2001). Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 120-124.

Scislo TJ & O'Leary DS (2002). Mechanisms mediating regional sympathoactivatory responses to stimulation of NTS A(1) adenosine receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1588-H1599.

Scislo TJ & O'Leary DS (2005). Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. *Neurol Res* **27**, 182-194.

Sebastiao AM & Ribeiro JA (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* **48**, 167-189.

Sharp FR & Beraudin M (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* **5**, 437-448.

Shi D & Daly JW (1999). Chronic effects of xanthines on levels of central receptors in mice. *Cell Mol Neurobiol* **19**, 719-732.

Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, & Daly JW (1993). Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol* **13**, 247-261.

Shirahata M, Balbir A, Otsubo T, & Fitzgerald RS (2007). Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **157**, 93-105.

Sica AL, Ruggiero DA, Zhao N, & Gootman PM (2002). Developmental changes in heart rate variability during exposure to prolonged hypercapnia in piglets. *Auton Neurosci* **100**, 41-49.

Sigworth LA & Rea MA (2003). Adenosine A1 receptors regulate the response of the mouse circadian clock to light. *Brain Res* **960**, 246-251.

Sinton CM & Petitjean F (1989). The influence of chronic caffeine administration on sleep parameters in the cat. *Pharmacol Biochem Behav* **32**, 459-462.

Sinton CM, Valatx JL, & Jouvet M (1981). Increased sleep time in the offspring of caffeine-treated dams from two inbred strains of mice. *Neurosci Lett* **24**, 169-174.

Slatkovska L, Jensen D, Davies GA, & Wolfe LA (2006). Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. *Respir Physiol Neurobiol* **154**, 379-388.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, & Feldman JL (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726-729.

Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, Otto MR, & Feldman JL (1989). Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J Comp Neurol* **281**, 69-96.

Smith ML & Pacchia CF (2007). Sleep apnoea and hypertension: role of chemoreflexes in humans. *Exp Physiol* **92**, 45-50.

Sondermeijer HP, van Marle AG, Kamen P, & Krum H (2002). Acute effects of caffeine on heart rate variability. *Am J Cardiol* **90**, 906-907.

St-John WM & Paton JF (2004). Role of pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 321-332.

Stenberg D, Litonius E, Halldner L, Johansson B, Fredholm BB, & Porkka-Heiskanen T (2003). Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J Sleep Res* **12**, 283-290.

Stephenson R, Liao KS, Hamrahi H, & Horner RL (2001). Circadian rhythms and sleep have additive effects on respiration in the rat. *J Physiol* **536**, 225-235.

Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, Rainnie DG, Portas CM, Greene RW, & McCarley RW (2000). Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* **115**, 183-204.

Subramanian HH, Chow CM, & Balnave RJ (2007). Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res* **1141**, 119-132.

Sved AF, Cano G, Passerin AM, & Rabin BS (2002). The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav* **77**, 737-742.

Szewczak JM & Powell FL (2003). Open-flow plethysmography with pressure-decay compensation. *Respir Physiol Neurobiol* **134**, 57-67.

Talley EM, Lei Q, Sirois JE, & Bayliss DA (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**, 399-410.

Task Force of the ESC and the NASPE (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* **93**, 1043-1065.

Tawfik HE, Schnermann J, Oldenburg PJ, & Mustafa SJ (2005). Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1411-H1416.

Thoman EB, Davis DH, Raye JR, Philipps AF, Rowe JC, & Denenberg VH (1985). Theophylline affects sleep-wake state development in premature infants. *Neuropediatrics* **16**, 13-18.

Thomas AJ, Erokwu BO, Yamamoto BK, Ernsberger P, Bishara O, & Strohl KP (2000a). Alterations in respiratory behavior, brain neurochemistry and receptor density induced by pharmacologic suppression of sleep in the neonatal period. *Brain Res Dev Brain Res* **120**, 181-189.

Thomas T & Spyer KM (1996). The role of adenosine receptors in the rostral ventrolateral medulla in the cardiovascular response to defence area stimulation in the rat. *Exp Physiol* **81**, 67-77.

Thomas T, St Lambert JH, Dashwood MR, & Spyer KM (2000b). Localization and action of adenosine A2a receptors in regions of the brainstem important in cardiovascular control. *Neuroscience* **95**, 513-518.

Traversa U, Rosati AM, Florio C, & Vertua R (1994). Effects of chronic administration of adenosine antagonists on adenosine A1 and A2a receptors in mouse brain. *In Vivo* **8**, 1073-1078.

Tye K, Pollard I, Karlsson L, Scheibner V, & Tye G (1993). Caffeine exposure in utero increases the incidence of apnea in adult rats. *Reprod Toxicol* **7**, 449-452.

Umezu M, Kagabu S, Jiang JY, Niimura S, & Sato E (2004). Developmental hormonal profiles in rdw rats with congenital hypothyroidism accompanying increased testicular size and infertility in adulthood. *J Reprod Dev* **50**, 675-684.

Urade Y, Eguchi N, Qu WM, Sakata M, Huang ZL, Chen JF, Schwarzschild MA, Fink JS, & Hayaishi O (2003). Sleep regulation in adenosine A2A receptor-deficient mice. *Neurology* **61**, S94-S96.

Van Wylen DG, Park TS, Rubio R, & Berne RM (1986). Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**, 522-528.

Vik T, Bakketeig LS, Trygg KU, Lund-Larsen K, & Jacobsen G (2003). High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender-specific effects on fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol* **17**, 324-331.

Wang JL, Wu ZH, Pan BX, & Li J (2005). Adenosine A1 receptors modulate the discharge activities of inspiratory and biphasic expiratory neurons in the medial region of Nucleus Retrofacialis of neonatal rat in vitro. *Neurosci Lett* **379**, 27-31.

Warner G, Skatrud JB, & Dempsey JA (1987). Effect of hypoxia-induced periodic breathing on upper airway obstruction during sleep. *J Appl Physiol* **62**, 2201-2211.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, & Meaney MJ (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**, 847-854.

Wessberg P, Hedner J, Hedner T, Persson B, & Jonason J (1984). Adenosine mechanisms in the regulation of breathing in the rat. *Eur J Pharmacol* **106**, 59-67.

White DP (2005). Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 1363-1370.

White DP (2006). The pathogenesis of obstructive sleep apnea: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 1-6.

White PJ & Nguyen TT (2002). Chronic caffeine treatment causes changes in cardiac adenosine receptor function in rats. *Pharmacology* **65**, 129-135.

Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, & Burdakov D (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10685-10690.

Wolk R, Gami AS, Garcia-Touchard A, & Somers VK (2005). Sleep and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol* **30**, 625-662.

Wong-Riley MT & Liu Q (2005). Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 83-98.

Woo MA, Stevenson WG, Moser DK, Trelease RB, & Harper RM (1992). Patterns of beat-to-beat heart rate variability in advanced heart failure. *Am Heart J* **123**, 704-710.

- Xu F, Xu J, Tse FW, & Tse A (2006). Adenosine stimulates depolarization and rise in cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ in type I cells of rat carotid bodies. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1592-C1598.
- Xu H, Stein B, & Liang B (1996). Characterization of a stimulatory adenosine A2a receptor in adult rat ventricular myocyte. *Am J Physiol* **270**, H1655-H1661.
- Yamamoto M, Nishimura M, Kobayashi S, Akiyama Y, Miyamoto K, & Kawakami Y (1994). Role of endogenous adenosine in hypoxic ventilatory response in humans: a study with dipyridamole. *J Appl Physiol* **76**, 196-203.
- Yang JN, Tiselius C, Dare E, Johansson B, Valen G, & Fredholm BB (2007). Sex differences in mouse heart rate and body temperature and in their regulation by adenosine A1 receptors. *Acta Physiol (Oxf)* **190**, 63-75.
- Youngson C, Nurse C, Yeger H, & Cutz E (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* **365**, 153-155.
- Zaidi SI, Jafri A, Martin RJ, & Haxhiu MA (2006). Adenosine A2A receptors are expressed by GABAergic neurons of medulla oblongata in developing rat. *Brain Res* **1071**, 42-53.
- Zapata P (2007). Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors? *Respir Physiol Neurobiol* **157**, 106-115.
- Zimmerberg B, Carr KL, Scott A, Lee HH, & Weider JM (1991). The effects of postnatal caffeine exposure on growth, activity and learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **39**, 883-888.
- Zupnick HM, Brown LK, Miller A, & Moros DA (1990). Respiratory dysfunction due to L-dopa therapy for parkinsonism: diagnosis using serial pulmonary function tests and respiratory inductive plethysmography. *Am J Med* **89**, 109-114.