



**HAL**  
open science

## Les mécanismes de la vulnérabilité à la chaleur : implication des stress systémique et cellulaire.

Virginie Michel

► **To cite this version:**

Virginie Michel. Les mécanismes de la vulnérabilité à la chaleur : implication des stress systémique et cellulaire.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00203725

**HAL Id: tel-00203725**

**<https://theses.hal.science/tel-00203725>**

Submitted on 11 Jan 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 231-2007

Année 2007

**THESE**

présentée

devant l'**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1**

pour l'obtention

du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 12 novembre 2007

par

**Virginie MICHEL**

**Les mécanismes de la vulnérabilité à la chaleur :  
implication des stress systémique et cellulaire**

Directeur de thèse : M. Raymond CESPUGLIO

Co-directeur : M. Frédéric CANINI

JURY : M. Rémi GERVAIS, Président  
M. Jean-Marie SAÏSSY, Rapporteur  
M. Michel HAMON, Rapporteur  
M. Raymond CESPUGLIO, Directeur de thèse  
M. Frédéric CANINI, Co-directeur de thèse  
M. Alain BUGUET, Membre invité



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

## **Secrétaire Général**

**M. le Professeur L. COLLET**

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

## ***SECTEUR SANTE***

### ***Composantes***

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***SECTEUR SCIENCES***

### ***Composantes***

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS



# **Liste des publications et communications**



## **Publications:**

**V. Michel**, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, F. Canini, Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment, *Neuroscience* 147 (2007) 522-531.

**V. Michel**, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, F. Canini, Effect of glucocorticoid depletion on heat-induced Hsp70, IL-1b and TNF-a gene expression, *Brain Research* 1164 (2007) 64-71.

**V. Michel**, S. Banzet, C. Mouret, R. Carter, F. Canini, A. Peinnequin, Target gene identification using quantitative real time PCR pool screening, soumis à *European Journal of pharmacology*.

**V. Michel**, J.B. Drouet, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, F. Canini, Metyrapone induces hypothermia and blocks the stress-induced hyperthermia, soumis à *Analytical Biochemistry*.

## **Communications affichées:**

**V. Michel**, F. Canini, A. Peinnequin, L. Bourdon, Is Hsp70 a biomarker of cellular stress : a Hsp70 mRNA time course in frontal cortex of vigil rats under heat exposure ? In *7ème Colloque de la Société des Neurosciences* (2005) Lille.

**V. Michel**, F. Canini, A. Peinnequin, L. Bourdon, Hsp70 and IL-1 $\beta$  mRNA expressions in frontal cortex of vigil rats during heat exposure : relations with heat load. In *2th International Congress on Stress Response in Biology and Medicine* (2005) Tomar, Portugal.

**V. Michel**, F. Canini, A. Peinnequin, L. Bourdon, Expression cérébrale des ARNm Hsp70 et IL-1 $\beta$  au cours de l'exposition à la chaleur chez le rat vigile. In *2ème Biennale de la Recherche du Service de Santé des Armées* (2006) Paris.

**V. Michel**, J.B. Drouet, C. Chevrier, A. Peinnequin, A. Alonso, R. Cespuglio, F. Canini, Decrease in heat tolerance is related to a defective hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis function. In *8ème Colloque de la Société des Neurosciences* (2007) Montpellier.

J.B. Drouet, **V. Michel**, C. Chevrier, A. Alonso, R. Cespuglio, F. Canini, Is glucocorticoid inhibition involved in metyrapone-induced effects on stress hyperthermia, locomotor activity and long term reactivity to novelty? In *8ème Colloque de la Société des Neurosciences* (2007) Montpellier.



# **Remerciements**



Ce travail expérimental et théorique n'aurait pu être accompli sans la contribution, l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens à remercier :

- Toutes les personnes du laboratoire de Neurophysiologie du Stress (passées et présentes) :

Lionel Bourdon pour son accueil au sein du laboratoire.

Frédéric Canini pour sa présence quotidienne tout au long de ces quatre années, son juste encadrement, son enthousiasme et sa persévérance.

Renaud Maury et Nadine Fidier, pour leur aide technique précieuse sur l'expérimentation animale et leur sympathie quotidienne.

Céline Chevrier pour son aide et sa sympathie.

Jean-Baptiste Drouet et tous ceux qui sont passés par le laboratoire au cours de ces quatre années.

- André Peinnequin pour la formation en biologie moléculaire qu'il m'a apportée, pour sa grande disponibilité et sa sympathie.

- Catherine Mouret pour la formation technique de biologie moléculaire qu'elle m'a apportée, sa rigueur et son expérience.

- Antonia Alonso et toute son équipe du Laboratoire d'Analyses Biologiques pour tous les dosages sanguins.

- Tout le personnel du Service Informatique.

- Raymond Cespuglio pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour le suivi de mes travaux, pour son aide dans l'écriture des articles.

- Alain Buguet pour son aide précieuse dans l'écriture et la correction de l'anglais des articles.

- Rémi Gervais pour avoir accepté de présider le jury.

- Jean-Marie Saïssy et Michel Hamon pour avoir accepté d'être rapporteurs.

- Le Centre de Recherches du Service de Santé des Armées pour son accueil et le Service de Santé des Armées pour le financement des travaux expérimentaux et le poste de VSSA qu'il m'a permis d'obtenir.

- Toute ma famille et mes amis pour leur encouragement, leur soutien, et un grand merci tout particulièrement à Olivier pour sa compréhension et son amour.



# **Table des matières**



<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>13</b>
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>21</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>27</b>
<b>I. LE COUP DE CHALEUR .....</b>	<b>29</b>
<b>A. Le coup de chaleur chez l'homme .....</b>	<b>29</b>
1. Historique.....	29
2. Définition .....	29
3. Epidémiologie .....	29
4. Les signes cliniques et paracliniques .....	30
a. L'hyperthermie et les troubles du métabolisme .....	30
b. Les troubles neurologiques .....	30
c. Les troubles du système cardio-vasculaire .....	31
d. L'inflammation systémique .....	32
e. La rhabdomyolyse.....	32
5. Les séquelles .....	32
<b>B. Le CC et l'expérimentation animale.....</b>	<b>33</b>
1. Pourquoi utiliser le modèle animal ?.....	33
2. Deux types de modèles animaux.....	33
3. Les signes cliniques lors de l'exposition vigile à la chaleur.....	34
a. Définition du CC chez le rat .....	34
b. Evolution de la température corporelle.....	34
c. Les signes neurologiques .....	36
4. Les mécanismes physio-pathologiques de la mort thermo-induite.....	36
a. Définition .....	36
b. L'ischémie cérébrale.....	36
c. Les dysfonctions cardio-vasculaires .....	36
d. Les altérations du métabolisme énergétique.....	37
e. Les altérations de la neurotransmission .....	37
f. L'inflammation.....	38
<b>C. Théorisation de la genèse du CC.....</b>	<b>38</b>
1. Hypothèse de la thermorégulation .....	38
2. Hypothèse musculaire .....	38
3. Hypothèse cardio-vasculaire .....	39
4. Hypothèse immuno-inflammatoire .....	39
5. Hypothèse métabolique.....	39
6. Hypothèse centrale.....	39
<b>II. LE STRESS SYSTEMIQUE ET LES GLUCOCORTICOÏDES.....</b>	<b>41</b>
<b>A. Qu'est-ce que le stress ?.....</b>	<b>41</b>
1. Définitions.....	41
2. Histoire.....	41
3. Intégration temporelle .....	42
<b>B. L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA) .....</b>	<b>44</b>
1. Généralités .....	44
2. Les systèmes hypothalamo-hypophysaires .....	44
a. Introduction.....	44
b. Le système zone parvocellulaire/hypophyse antérieure.....	45

c. Le système hypothalamo-neurohypophysaire (HNS).....	46
3. Le système hypophyso-corticosurrénalien.....	46
4. Conclusion .....	47
C. Les glucocorticoïdes .....	48
1. Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes .....	48
2. Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes .....	49
a. La transcortine ou CBG.....	49
b. Les 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases type 1 et type 2.....	49
3. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.....	50
a. Les effets génomiques .....	51
b. Les effets non génomiques .....	52
4. Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes .....	54
5. Le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes.....	55
D. Stress et glucocorticoïdes .....	56
1. Approche physiologique classique.....	56
2. Approche intégrée moderne .....	56
a. La dépendance temporelle .....	56
b. La relation concentration-fonction.....	57
c. La notion d'adéquation.....	59
III. LE STRESS CELLULAIRE ET LES HEAT SHOCK PROTEINS (HSP).....	60
A. Généralités.....	60
B. Les différentes familles d'HSP.....	60
1. La famille des Hsp110 .....	62
2. La famille des Hsp90 .....	62
3. La famille des Hsp70 .....	62
4. La famille des Hsp60 .....	63
5. La famille des Hsp47 .....	63
6. La famille des Hsp27 .....	64
7. La famille des Hsp10 .....	64
C. Rôles des Hsp.....	64
1. Dans des conditions basales.....	64
2. Dans des conditions de stress.....	65
3. Dans le pré-conditionnement .....	65
4. Rôle de marqueur de lésions cellulaires.....	66
D. L'induction des Hsp70.....	66
1. Les facteurs de transcription du choc thermique : HSF .....	66
2. Mécanisme d'induction des Hsp70.....	66
3. Les signaux intracellulaires d'activation.....	67
4. L'atténuation de la réponse des Hsp70 .....	68
E. Les interactions glucocorticoïdes-Hsp .....	68
1. L'effet potentialisateur des glucocorticoïdes .....	68
2. L'effet inhibiteur des glucocorticoïdes .....	69
<b>HYPOTHÈSES DE RECHERCHE .....</b>	<b>71</b>
I. HYPOTHESE DU STRESS DANS LE CC .....	73
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES INTERACTIONS ENTRE STRESS ET CHALEUR .....	73
A. Relation clinique entre stress et CC .....	73
1. L'analogie des décours temporels.....	73
2. L'analogie de variabilité inter-individuelle.....	74
3. La valeur du coup de chaleur .....	74
B. Relations entre glucocorticoïdes et chaleur .....	74

1. La sécrétion de glucocorticoïdes dans le CC .....	74
2. Les effets physiologiques des glucocorticoïdes dans le CC .....	75
C. <i>Relations entre expression d'Hsp et chaleur</i> .....	76
1. L'induction de la réponse.....	76
a. <i>Les inducteurs potentiels</i> .....	76
b. <i>Spécificités de l'induction</i> .....	76
2. Les effets physiologiques des Hsp à la chaleur.....	78
a. <i>Pré-induction d'Hsp et chaleur</i> .....	78
b. <i>Rôle des Hsp dans la tolérance à la chaleur</i> .....	78
III. OBJECTIFS DE LA THESE .....	79
A. <i>Objectifs généraux</i> .....	79
B. <i>Pré-supposés théoriques</i> .....	79
1. La naïveté des individus.....	79
2. La dynamique de la réponse.....	79
3. La tolérance à la chaleur comme marqueur de la charge allostasique .....	80
4. La variabilité inter-individuelle .....	80
C. <i>Critères de jugement d'intolérance</i> .....	80
1. Les critères du risque létal .....	80
2. Les critères du CC avéré .....	81
3. Les critères de l'émergence pathologique.....	81
D. <i>Démarche expérimentale</i> .....	81
<b>PRÉ-REQUIS SCIENTIFIQUES, TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTAUX.....</b>	<b>83</b>
I. PRE-REQUIS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES .....	85
A. <i>Introduction</i> .....	85
B. <i>Les premiers signes d'activation cellulaire</i> .....	86
1. Les marqueurs utilisés.....	86
a. <i>c-fos</i> .....	86
b. <i>c-jun</i> .....	86
c. <i>Early growth response-1 (EGRI)</i> .....	86
2. Relation glucocorticoïdes-IEGs .....	87
3. Valeur des IEGs comme marqueurs d'activation cellulaire.....	87
C. <i>Les marqueurs d'activation calcique</i> .....	88
1. Intérêt de l'exploration calcique au chaud .....	88
2. Marqueur de l'activation calcique.....	88
D. <i>Les marqueurs d'activation inflammatoire</i> .....	88
1. Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$ .....	88
a. <i>L'IL-1<math>\beta</math> et le cerveau</i> .....	89
b. <i>Le TNF-<math>\alpha</math> et le cerveau</i> .....	90
2. La voie du facteur de transcription Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) .....	91
a. <i>Mécanisme d'activation de NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	91
b. <i>Les gènes cibles de NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	92
c. <i>Les médiateurs de l'activation de NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	92
E. <i>Moyens de déplétion en glucocorticoïdes</i> .....	93
II. PRE-EXPERIMENTATION .....	95
A. <i>Objectifs et hypothèses</i> .....	95
B. <i>Protocole</i> .....	95
C. <i>Résultats non publiés</i> .....	96
1. Validité de la méthode pharmacologique de déplétion glucocorticoïdergique.....	96
2. Analyse des variables cliniques de température .....	96
3. Expression des ARNm Hsp70-1 et 2 .....	97

D. Résultats complémentaires .....	98
1. Objectifs .....	98
2. Protocole .....	98
3. Résultats .....	98
4. Conclusion .....	99
E. Conclusion .....	99
F. Article soumis à <i>European Journal of Pharmacology</i> .....	99
<b>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL.....</b>	<b>101</b>
I. EXPERIMENTATION 1 : METYRAPONE ET TOLERANCE A LA CHALEUR.....	103
A. Objectifs et hypothèses .....	103
B. Protocole.....	103
C. Résultats.....	103
D. Résultats complémentaires non publiés.....	104
E. Conclusion .....	106
F. Perspectives .....	106
G. Article <i>Brain Research</i> .....	106
II. EXPERIMENTATION 2 : STRESS ET TOLERANCE A LA CHALEUR.....	107
A. Objectifs et hypothèses .....	107
B. Protocole.....	107
C. Résultats.....	108
D. Résultats complémentaires .....	108
1. Objectifs .....	108
2. Prédiction sur le comportement pré-expérimental .....	108
a. Hypothèse.....	108
b. Résultats.....	108
3. Phase d'exposition à la chaleur.....	109
a. Hypothèse.....	109
b. Résultats.....	109
E. Conclusion .....	110
F. Perspectives .....	111
G. Article <i>Neuroscience</i> .....	111
III. EXPERIMENTATION 3 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE CRIBLAGE POUR L'ANALYSE D'UN GRAND NOMBRE DE GENES CIBLES EN QRT-PCR EN TEMPS REEL.....	112
A. Objectifs.....	112
B. Matériel de travail .....	112
4. Méthode de travail .....	112
5. Echantillons biologiques .....	113
C. Résultats.....	113
D. Conclusion .....	113
E. Perspectives .....	113
F. Article soumis à <i>Analytical Biochemistry</i> .....	114
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>115</b>
I. INTRODUCTION.....	117
II. ASPECTS METHODOLOGIQUES .....	118
A. Effets des conditions expérimentales .....	118
B. Effets secondaires de la pharmacologie .....	118
1. Effets du solvant PEG .....	119
2. Effets de la métyrapone.....	119
a. La thermorégulation .....	119

b. <i>Sur le stress</i> .....	120
C. <i>La cohérence inter-expérimentations</i> .....	122
1. <i>Introduction</i> .....	122
2. <i>Tableau de l'intolérance à la chaleur</i> .....	122
a. <i>Déshydratation et thermorégulation</i> .....	123
b. <i>Métabolisme</i> .....	123
c. <i>Inflammation</i> .....	123
d. <i>Activation cérébrale</i> .....	124
e. <i>Agression cérébrale</i> .....	125
f. <i>Conclusion</i> .....	126
III. <i>LES MECANISMES DE LA VULNERABILITE A LA CHALEUR</i> .....	127
A. <i>Rôle du stress cellulaire dans la vulnérabilité à la chaleur</i> .....	127
1. <i>Hypothèse originelle</i> .....	127
2. <i>La relation Hsp70-risque de CC</i> .....	127
3. <i>Les ARNm Hsp70 comme marqueurs de stress cellulaire</i> .....	128
4. <i>L'ambiguïté du pré-conditionnement</i> .....	129
5. <i>Conséquences thérapeutiques potentielles</i> .....	129
6. <i>Conclusion</i> .....	130
B. <i>Rôle du stress systémique dans la vulnérabilité à la chaleur</i> .....	130
1. <i>Hypothèse originelle</i> .....	130
2. <i>Analyse topographique de la dégradation de l'axe HPA</i> .....	130
3. <i>Conséquences mécanicistes d'un déficit en glucocorticoïdes</i> .....	131
a. <i>Interaction entre hypoglucocorticoïdergie et inflammation</i> .....	132
b. <i>L'impact des glucocorticoïdes sur l'induction des ARNm IκBα</i> .....	132
IV. <i>RELATION ENTRE STRESS ET CC</i> .....	134
A. <i>Généralités</i> .....	134
B. <i>La qualité fonctionnelle de l'axe HPA</i> .....	134
1. <i>Introduction</i> .....	134
2. <i>La fonctionnalité de l'axe HPA</i> .....	135
3. <i>Disponibilité et métabolisme cellulaire des glucocorticoïdes</i> .....	135
a. <i>Disponibilité cellulaire des glucocorticoïdes</i> .....	135
b. <i>Métabolisme cellulaire des glucocorticoïdes</i> .....	136
c. <i>Conclusion</i> .....	136
4. <i>La fonctionnalité des récepteurs aux glucocorticoïdes</i> .....	136
a. <i>Conséquences biologiques d'une dysfonction</i> .....	136
b. <i>Isoformes GR et polymorphisme génétique</i> .....	137
c. <i>Dysfonction par altération fonctionnelle</i> .....	138
C. <i>Qui sont les animaux à risque</i> .....	138
1. <i>Les animaux à risque de l'expérimentation</i> .....	138
2. <i>Les mécanismes potentiels</i> .....	140
3. <i>Les animaux à risque du CC : des animaux déjà stressés ?</i> .....	140
D. <i>Comment se structure un animal à risque ?</i> .....	141
1. <i>Introduction</i> .....	141
2. <i>Compensation par l'activation sympathique</i> .....	141
a. <i>L'association fonctionnelle</i> .....	141
b. <i>Le cadre de la compensation catécholaminergique périphérique</i> .....	142
c. <i>Le cadre de la compensation catécholaminergique centrale</i> .....	142
3. <i>Compensation par la neurotransmission ?</i> .....	142
a. <i>Cadre théorique</i> .....	142
b. <i>La neurotransmission dopaminergique</i> .....	143
c. <i>La neurotransmission sérotoninergique</i> .....	143
d. <i>La neurotransmission glutamatergique</i> .....	143

E. Synthèse des mécanismes impliqués dans la vulnérabilité à la chaleur.....	144
V. PERSPECTIVES.....	145
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>147</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>175</b>
I. ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES DE LA PRE-EXPERIMENTATION.....	177
A. Espèce animale utilisée.....	177
B. Conditions d'hébergement des animaux.....	177
C. Traitement.....	177
D. Groupes expérimentaux.....	177
E. Protocole.....	178
D. Procédure d'anesthésie à l'halothane.....	179
E. Procédure de prélèvement post-mortem.....	179
F. Exploitation des données de température.....	180
II. ANNEXE 2 : MATERIEL ET METHODES DE L'EXPERIMENTATION 1 : METYRAPONE ET TOLERANCE A LA CHALEUR.....	181
A. Espèce animale utilisée.....	181
B. Conditions d'hébergement des animaux.....	181
C. Traitement.....	181
D. Goupes expérimentaux.....	181
E. Protocole.....	182
F. Procédure d'anesthésie à l'halothane.....	183
G. Procédure de prélèvement post-mortem.....	183
F. Exploitation des données de température.....	184
III. ANNEXE 3 : MATERIEL ET METHODES DE L'EXPERIMENTATION 2 : STRESS ET TOLERANCE A LA CHALEUR.....	185
A. Espèce animale utilisée.....	185
B. Conditions d'hébergement des animaux.....	185
C. Procédure d'implantation Dataquest.....	185
D. Groupes et procédure d'exposition à la chaleur.....	186
E. Procédure d'anesthésie à l'halothane.....	186
F. Procédure de prélèvement post-mortem.....	186
G. Exploitation des données de température.....	186
IV. ANNEXE 4 : PROCEDURES DE DOSAGES DES ARNm PAR RT-PCR EN TEMPS REEL.....	188
A. Extraction des ARNm par le MagNAPure :.....	188
B. Dessin des amorces.....	188
C. La PCR en temps réel.....	190
V. ANNEXE 5 : PROCEDURES DE DOSAGES SANGUINS.....	191
A. Protéines totales.....	191
B. Créatinine.....	191
C. Albumine.....	191
D. Lactate.....	192
E. Glucose.....	192
F. Triglycérides.....	192
G. Glycérol.....	193
H. Corticostérone plasmatique.....	193
I. ACTH plasmatique.....	194
J. Interleukine-1 $\beta$ .....	194
K. Evaluation de l'hématocrite.....	194

# **Abbreviations**



ACTH	: Adrenocorticotropin hormone (hormone adr�no-corticotrope)
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AIF	: Apoptosis-inducing factor (facteur induisant l'apoptose)
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
Apaf-1	: Apoptotic protease-activating factor (facteur d'activation de la protéase apoptotique)
ARE	: Adenine/uridine-rich element (séquence riche en éléments adénine/uridine)
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AP-1	: Activator protein-1 (dimère Fos-Jun ou Jun-Jun)
AUC	: Area under curve (aire sous la courbe)
AVP	: Arginine vasopressin (arginine vasopressine)
BHE	: Barrière hémato-encéphalique
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	: Concentration intracellulaire de calcium
CBG	: Corticosteroid-binding globuline (transcortine)
CC	: Coup de chaleur
CCC	: Coup de chaleur classique
CCE	: Coup de chaleur d'exercice
CIVD	: Coagulation intra-vasculaire disséminée
CPK	: Créatine phosphokinase
COX-2	: Cyclo-oxygenase-2
CREB	: Cyclic adenine monophosphate response element-binding protein
CRF	: Corticotropin releasing factor (corticolibérine)
CRF-R1	: CRF receptor 1 (récepteur de type 1 au CRF)
CTM	: Critical thermal maximum
11-DOC	: 11-désoxycorticostérone
5�-DHDOC	: 5�-dihydrod�soxycorticost�rone
3�, 5�-THDOC	: 3�, 5�-t�trahydrod�soxycorticost�rone
FC	: Fréquence cardiaque
FSC	: Flux sanguin cérébral
GABA	: �-amino-butyric acid (acide �-amino-butyrique)
GM-CSF	: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GR	: Glucocorticoid receptor (récepteur aux glucocortico�ides)
GRE	: Glucocorticoid response element
Grp	: Glucose-regulated protein
HNS	: Hypothalamo-neurohypophysial system (système hypothalamo-neurohypophysaire)
HPA	: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical (hypothalamo-hypophysio-corticosurrénalien)
h.r.	: humidité relative
HSE	: Heat shock element

HSF	: Heat shock factor
Hsp	: Heat shock protein (protéine de choc thermique)
11 $\beta$ -HSD	: 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
ICE	: IL-1 $\beta$ converting enzyme (enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$ )
IL	: Interleukine
IL-1ra	: IL-1 receptor antagonist (antagoniste du récepteur de l'IL-1)
I $\kappa$ B $\alpha$	: Inhibitory factor $\kappa$ B $\alpha$
iNOS	: inducible nitric oxide synthase (monoxyde d'azote synthase inductible)
i.p.	: intra-péritonéal
i.v.	: intra-veineux
JNK	: c-Jun N-terminal Kinase
JRE	: JNK responsive element
LDH	: Lactate déshydrogénase
LPS	: Lipopolysaccharide
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MCIP1	: Modulatory-calcineurin-interacting proteins
Mn-SOD	: manganèse superoxide-dismutase
MR	: Mineralocorticoid receptor (récepteur aux minéralocorticoïdes)
NF- $\kappa$ B	: Nuclear factor $\kappa$ B
nGRE	: negative GRE
NLS	: Nuclear localization sequence (séquence de localisation nucléaire)
NFAT	: Nuclear factor of activated T cells (facteur nucléaire d'activation des lymphocytes T)
NO	: Nitric oxide (monoxyde d'azote)
OXT	: Oxytocine (ocytocine)
OVLTL	: Organum vasculosum of the lamina terminalis (organe vasculaire de la lamina terminalis)
PAM	: Pression artérielle moyenne
PCO <sub>2</sub>	: pression partielle en CO <sub>2</sub>
PEG	: Polyéthylène glycol
PKA	: Protein kinase A
PKC	: Protein kinase C
PO <sub>2</sub>	: pression partielle en O <sub>2</sub>
POMC	: Pro-opiomelanocortin (pro-opiomélanocortine)
PTSD	: Post-traumatic stress disorder (état de stress post-traumatique)
PVN	: Paraventricular nucleus (noyau hypothalamique paraventriculaire)
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
s.c.	: sous-cutané
SNC	: Système nerveux central

SON	: Supraoptic nucleus (noyau supra-optique)
SRIS	: Syndrome de réponse inflammatoire systémique
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
TACE	: TNF- $\alpha$ converting enzyme (enzyme de conversion du TNF- $\alpha$ )
T <sub>a</sub>	: Température ambiante
T <sub>co</sub>	: Température corporelle
T <sub>re</sub>	: Température rectale
TNF- $\alpha$	: Tumour necrosis factor- $\alpha$ (facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ )
TR	: Tyrosines kinases
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance endothélial vasculaire)



# **Rappels bibliographiques**



# ***I. Le coup de chaleur***

## **A. Le coup de chaleur chez l'homme**

### ***1. Historique***

Le coup de chaleur (CC) semble avoir toujours été présent dans la vie de l'Homme, marquant les limites de son adaptation au chaud. Sa narration est retrouvée dans les plus vieux écrits tels que la Bible. Dans le livre de Judith (Chap. 8, verset 2 et 3), on rapporte la mort de Manassé, l'époux de Judith, qui, au cours de la période des moissons, fut frappé « d'insolation » tandis qu'il donnait ses ordres aux lieurs de gerbes, et mourut à Béthulie. Les arabes avaient baptisé le CC « Siriasis » d'après Sirius, l'étoile qui suit le soleil pendant les mois d'été. En l'an 24 avant J.-C., une expédition militaire romaine conduite en Arabie par Aelius Gallus fut complètement anéantie par le CC, décrit comme suit : « cette maladie ne ressemble à aucune autre, elle s'attaque à la tête qu'elle dessèche complètement et tue sur le champ la plupart de ceux qui ont été touchés » [217].

### ***2. Définition***

Le CC se définit par une augmentation de la température corporelle accompagnée de troubles neurologiques et d'un état de choc cardio-vasculaire. Il est considéré comme une pathologie grave dont le pronostic vital peut être mis en jeu. Le risque léthal s'étend de 10 à 50% selon les auteurs [37, 41, 47, 416, 445]. Le congrès scientifique international de Sydney (1987) dédié aux accidents liés à la chaleur [1] a défini deux types de CC : le coup de chaleur de repos ou coup de chaleur classique (CCC) et le coup de chaleur d'exercice (CCE). Le premier survient chez les sujets à risque dans des conditions d'environnement chaud et humide alors que le CCE survient chez des sujets généralement sains à la suite d'une activité physique intense et prolongée non nécessairement en ambiance chaude et humide.

### ***3. Epidémiologie***

Le CCE est habituellement rencontré dans les forces armées [383], dans certaines industries telles les exploitations minières [122, 277] et chez les sportifs, en particulier les marathoniens [182, 363].

Le CCC peut se voir dans l'ensemble des pays du globe, mais sévit principalement dans les pays chauds et lors de vagues de chaleur. A la Mecque, un nombre élevé de patients décèdent chaque année d'un CC lors des pèlerinages [232]. A Chicago, en juillet 1995, une vague de chaleur de trois jours a fait 600 victimes et provoqué 3300 consultations supplémentaires aux urgences [116, 437]. En France métropolitaine, la canicule d'août 2003 d'une durée et d'une intensité exceptionnelles a été associée à une surmortalité à court terme d'environ 15000 personnes, soit une augmentation de 60% par rapport à la mortalité attendue [188, 489].

Le CCC touche toutes les tranches d'âge malgré l'existence de facteurs de risque rencontrés chez certains sujets : sujets souffrants de maladies cardio-vasculaires [232, 416], respiratoires ou métaboliques [416], sujets atteints de maladies neurologiques ou psychiatriques (épilepsie [456], sclérose en plaque [15], Parkinson, schizophrénie), patients sous traitements anti-psychotiques, diurétiques, amphétaminiques, anti-dopaminergiques et anti-cholinergiques [41, 138, 181, 226, 271, 437, 536], sujets alcooliques [142, 271, 465], nouveau-nés et personnes âgées en raison de leur difficulté à se réhydrater seuls, personnes isolées ou de milieu social défavorisé.

#### ***4. Les signes cliniques et paracliniques***

##### *a. L'hyperthermie et les troubles du métabolisme*

###### ➤ L'hyperthermie

L'hyperthermie ne constitue ni une condition nécessaire, ni une condition suffisante de diagnostic du CC. En effet, une élévation de température centrale de plus de 40,6°C a été observée chez des sujets à l'exercice sans autres signes cliniques de CCE [311]. Inversement, des températures profondes ne dépassant pas 39°C ont été décrites lors de CCE avérés [417]. Le niveau de température final atteint n'est donc pas déterminant. En revanche, la pente d'augmentation de température semble plus pertinente comme critère de diagnostic, une ascension thermique rapide témoignant d'une altération de la fonction cérébrale de thermorégulation. L'hyperthermie doit donc être considérée comme un facteur aggravant mais non comme le *corpus* de la pathologie. D'autres mécanismes interviennent, plus ou moins directement liés à l'agression thermique.

###### ➤ Les perturbations métaboliques et acido-basiques

L'hyperthermie s'accompagne d'une augmentation du métabolisme. Il s'ensuit au niveau cellulaire une diminution de la disponibilité en substrats énergétiques et O<sub>2</sub>. Lorsque le réapprovisionnement en O<sub>2</sub> ne répond plus à la demande, l'activité de la voie aérobie n'est plus maintenue et le métabolisme anaérobie devient alors prédominant, conduisant à une accumulation de lactate. La lactatémie constitue donc un bon indicateur pronostique, surtout dans le CCC [181]. La dette en O<sub>2</sub>, l'augmentation du CO<sub>2</sub> et l'acidose stimulent les centres respiratoires, conduisant à une hyperventilation et une alcalose respiratoire qui ne compensent que partiellement l'acidose métabolique. Le bilan général est une acidose métabolique qu'il faut tamponner avec des solutions de bicarbonates [40].

##### *b. Les troubles neurologiques*

Tous les patients présentent des symptômes neurologiques allant de la somnolence jusqu'au coma en passant par des états de confusion, délires et hallucinations [16, 455]. On note également des pertes de réflexes cérébraux profonds (altération des mouvements pupillaires, absence de réflexes cornéens et oculo-céphaliques), des signes végétatifs (frissons au cours du refroidissement ainsi que des convulsions après refroidissement et une absence de sudation) reflétant des lésions du système nerveux autonome

[537-539], des troubles de coordination des mouvements [543] témoignant d'une atteinte pancérébelleuse [304], des signes Parkinsonniens [31] apanage de lésions striatales [304], des troubles psychophysiologiques témoignant d'atteinte du cortex frontal [304] et des dysplégies témoignant de l'atteinte du tissu myélinisé [536, 537].

Ces atteintes systématiques du système nerveux central (SNC) ainsi que l'existence de facteurs favorisants neurologiques, *i.e.* la consommation de médicaments à visée centrale et les pathologies du SNC, placent le cerveau au centre de la physiopathologie du CC. En amont du CCE, c'est l'émergence de dysfonctions cérébrales (réduction de l'activité cérébrale, température cérébrale excessive) qui est à l'origine de diminution de la performance ou d'apparition de fatigue. Ceci entre donc dans la théorie plus générale de la fatigue centrale selon laquelle ce sont les facteurs centraux plutôt que les facteurs périphériques qui conduisent à l'arrêt de l'exercice [356, 362]. Le rôle ambigu joué par le cerveau, à savoir une simple cible vulnérable à l'agression thermique ou un élément déterminant dans la genèse du CC pose le problème des pistes thérapeutiques vers lesquelles s'orienter : celles à visées périphériques ou celles à visées centrales.

### *c. Les troubles du système cardio-vasculaire*

#### ➤ L'état de choc cardio-vasculaire

La faillite cardio-vasculaire n'est pas systématique dans le CCE, mais elle est très souvent observée dans le CCC [47]. Lors de l'exposition à la contrainte chaude, les mécanismes de thermolyse sont activés et se traduisent par la séquestration cutanée d'une fraction de la volémie. Cette redistribution vasculaire nécessite une activation cardiaque caractérisée par une augmentation de la fréquence cardiaque (FC), du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque (état hyperdynamique). Le dépassement des mécanismes d'adaptation se traduit par l'apparition d'une compétition entre les perfusions cérébrale, mésentérique, musculaire et cutanée. Il s'en suit une redistribution des débits sanguins excluant par vasoconstriction le territoire mésentérique, précipitant l'apparition d'une ischémie intestinale [416]. Le dernier stade correspond à un syndrome hypodynamique dont l'évolution est très défavorable. Les débits cardiaque et locaux s'effondrent et les résistances périphériques augmentent, une cyanose périphérique et un pouls filant sont alors observés [336].

#### ➤ La déshydratation

Les mécanismes de thermolyse (sudation, vasodilatation cutanée) mis en place pour lutter contre l'hyperthermie conduisent à une déshydratation extracellulaire expliquant : une augmentation de l'hématocrite, de l'osmolalité plasmatique et des protéines plasmatiques, une insuffisance rénale fonctionnelle avec une élévation de l'urée et de la créatinine [41]. La déshydratation et l'hypovolémie qui en résultent sont des facteurs aggravants de la dysfonction cardiovasculaire.

### ➤ Les perturbations de la coagulation

L'hyperthermie induit des altérations des cellules endothéliales activant les mécanismes de la coagulation particulièrement au niveau hépatique [184] et rénal [231], produisant une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). Les lésions tissulaires conduisent aussi à la libération d'activateurs plasminogènes responsables de phénomènes de fibrinolyse. L'insuffisance hépato-cellulaire découlant directement de l'agression thermique et de l'hypoxie [230] participe aussi à l'installation de la CIVD par son incapacité à renouveler le fibrinogène [480]. L'acidose, l'hypoxie et la déshydratation sont aussi des facteurs connus pour abaisser le seuil d'apparition de la CIVD [153]. Il en résulte des phénomènes ischémiques rénaux et hépatiques et des manifestations hémorragiques [416].

#### *d. L'inflammation systémique*

L'ischémie intestinale conduit à une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, ce qui facilite l'endotoxémie porte et la libération de cytokines inflammatoires par le foie [342, 543]. On observe donc au décours du CC une élévation des concentrations plasmatiques d'interleukines (IL)  $1\alpha$  et  $\beta$ , du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), de l'interféron- $\gamma$  et de l'IL-6 [39, 43, 85, 177]. Cette cascade de réactions correspond au syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) [111] et fait du CC une forme d'entrée dans le SRIS [46].

#### *e. La rhabdomyolyse*

Dans le CCE, l'hyperthermie couplée à la contrainte mécanique induit une atteinte des cellules musculaires, la rhabdomyolyse, avec libération de myoglobine et d'enzymes du métabolisme (lactate déshydrogénase, LDH et créatine phosphokinase, CPK). Cependant, l'élévation de la CPK dans le plasma traduit la nécrose musculaire, mais n'a pas de valeur pronostique [47, 57].

## **5. Les séquelles**

Hormis l'insuffisance hépatique aiguë pouvant nécessiter une greffe [480], les séquelles à moyen et long termes touchent plus particulièrement le SNC renforçant l'idée d'une vulnérabilité importante du cerveau à la chaleur. Elles demeurent cependant assez rares (2 à 14% [181, 537]). Les altérations anatomiques ou fonctionnelles, associées ou non à des syndromes cliniques, sont largement distribuées.

Dans le cervelet, on note une atrophie massive [539] avec dégénérescence des cellules de Purkinje [149, 183, 304] se traduisant par un syndrome cérébelleux avec ataxie, altération du mouvement et dysarthrie [31, 149, 181, 539]. Ce syndrome est la plus fréquente des séquelles, plaçant le cervelet comme une cible privilégiée de l'agression thermique [220]. Dans le striatum, on observe une nécrose neuronale avec réaction gliale [87, 304] et réduction des taux de dopamine [238]. Le syndrome parkinsonien séquentaire qui en résulte est cependant rare [31]. Les mêmes lésions histologiques notées dans le cortex frontal sont associées à des hémiplésies et des altérations neuro-psychologiques : troubles de la personnalité [16, 454], de l'humeur [328], du fonctionnement cognitif dans les tâches simples [181] ou

complexes [16], des facultés de concentration et mnésiques [454]. Les pétéchies observées dans l'hypothalamus [304] ne s'accompagnent pas de troubles majeurs de la thermorégulation [397] quoique des syndromes poïkilothermiques aient pu être observés [249]. L'atteinte moins systématique des fibres nerveuses longues myélinisées explique des dysplégies après CC [537]. La normalité des potentiels somato-sensoriels [220] et les anomalies électrophysiologiques périphériques [18] plaident en faveur de neuropathies périphériques, même si elles peuvent être à l'origine des différences de tonalité cérébrale entre matière grise et blanche en IRM [475].

Cependant, le SNC possède des mécanismes de plasticité lui fournissant une telle capacité de récupération que peu de syndromes persistants sont observés. Il est en revanche surprenant de ne pas trouver de séquelles bulbaires. Ceci est expliqué par le fait que les atteintes bulbaires provoquent la mort par un état de choc cardio-vasculaire.

## **B. Le CC et l'expérimentation animale**

### ***1. Pourquoi utiliser le modèle animal ?***

Les travaux cliniques relatifs au CC ou les travaux menés sur le fonctionnement du système nerveux en environnement contraignant (chaleur [212, 530], exercice exhaustif [362]), ne permettent pas de comprendre les mécanismes conduisant au CC. Leur limitation impose donc le recours à l'expérimentation animale sur organe isolé [108] ou plus souvent *in toto* dans un cadre de physiologie intégrée. Ces travaux ne sont cependant pas sans soulever des problèmes éthiques du fait de la souffrance provoquée [89]. Ces considérations imposent la définition d'un point limite à ne pas franchir entre le niveau de souffrance de l'animal imposé par l'expérimentation et l'apport des informations pertinentes. De nombreuses espèces ont été sollicitées. Le babouin paraît le plus approprié en raison de sa proximité phylogénétique avec l'homme [38, 108] y compris en termes de réponses cardio-vasculaires et thermorégulatrices [44, 175] et de manifestations cliniques [158, 159]. Ce modèle reste peu utilisé en raison de difficultés d'éthique et de coût expérimental. Si l'utilisation de la chèvre et du chien [60, 108, 233, 443], de la souris [267], voire du lapin [278, 286, 287] reste anecdotique, le rat constitue l'animal de référence du fait de (i) sa mauvaise réputation (« rat d'égout », transmetteur de maladies), qui pose moins de problèmes éthiques ; (ii) sa disponibilité, sa facilité d'hébergement et de manipulation ; (iii) ses ressemblances physiologiques avec l'homme.

### ***2. Deux types de modèles animaux***

Le CC est majoritairement étudié sur des rats vigiles ou anesthésiés. Le rat vigile est étudié lors d'exercices en environnement modérément chaud, allant de 26 à 34°C de température ambiante ( $T_a$ ) [48, 203] et lors d'expositions au repos à des  $T_a$  plus chaudes ( $T_a=38-40^\circ\text{C}$ ) [135, 449]. Ces modèles vigiles se rapprochent étroitement des conditions de survenue du CC chez l'homme mais ils suscitent en revanche une discussion éthique [89] ne permettant pas d'aller au bout de la pathologie. Le modèle alternatif, rat

anesthésié, prend le relais puisque l'animal est exposé à la chaleur ( $T_a=42^\circ\text{C}$ ) jusqu'à son décès [223, 280, 282, 288]. L'animal anesthésié est instrumenté plus largement que l'animal vigile, donnant accès aux mécanismes physiopathologiques par l'enregistrement de variables hémodynamiques (FC ; pression artérielle moyenne, PAM ; flux sanguin cérébral, FSC) et fonctionnelles cérébrales (flux de transmission et de métabolisme par microdialyse, quantité de neurotransmetteurs par voltamétrie). Cependant, l'anesthésie perturbe de nombreux mécanismes : la thermorégulation [305, 512], l'élévation des « Heat shock proteins » (Hsp), moindre chez les animaux anesthésiés *vs* vigiles exposés au chaud [520]. Ainsi, le modèle vigile focalise sur les phases initiales d'exposition à la chaleur alors que le modèle anesthésié renseigne sur les mécanismes physiopathologiques de la mort thermo-induite.

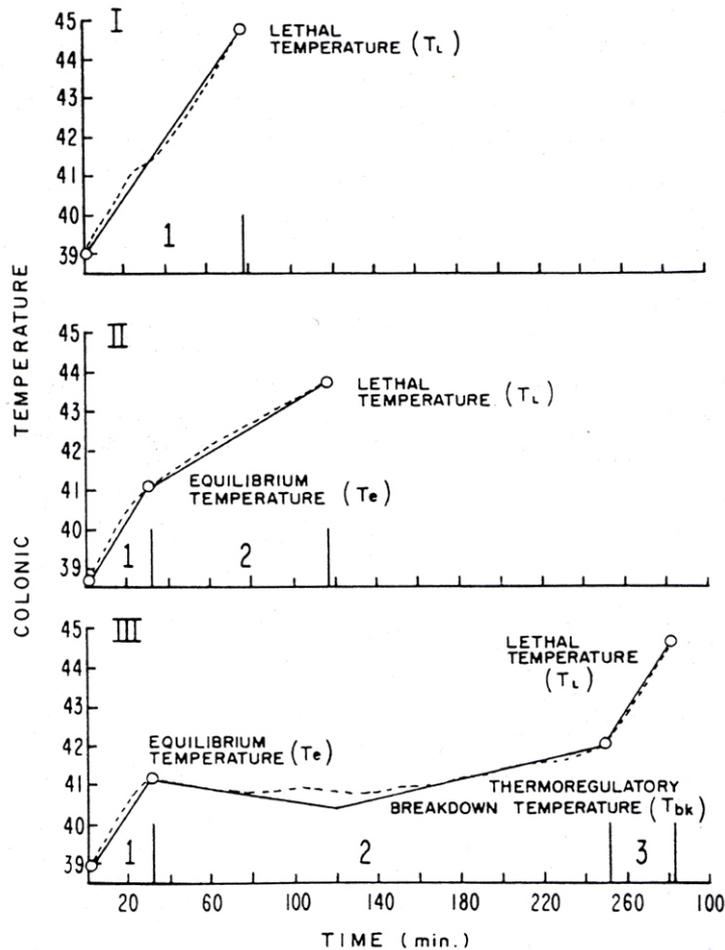
### ***3. Les signes cliniques lors de l'exposition vigile à la chaleur***

#### *a. Définition du CC chez le rat*

Le CC se définit cliniquement par (i) l'augmentation finale et brutale de la température corporelle ( $T_{co}$ ) témoignant de la perte de la fonction de thermorégulation [525], (ii) l'apparition de signes neurologiques tels que l'incapacité à arrêter son effort [48], un syndrome cérébelleux [67], puis un coma aréactif [203].

#### *b. Evolution de la température corporelle*

Le rat vigile exposé passivement à la chaleur développe 3 types d'évolutions de  $T_{co}$  jusqu'à la température de décès [525] (**Figure 1**). Le type I (4%) correspond à une phase unique d'augmentation de  $T_{co}$ , induisant un temps de survie plus faible et suggérant une fonction thermorégulatrice peu efficace. Les animaux du type II (7%) dont le temps de survie est intermédiaire, présentent une première vitesse d'augmentation de  $T_{co}$  rapide suivie d'un ralentissement jusqu'à l'atteinte de la température létale. Enfin, entre 70 et 90% des animaux appartiennent au type III dont l'évolution de  $T_{co}$  est en trois phases. La première correspond à une augmentation rapide de la  $T_{co}$  jusqu'à l'atteinte d'une  $T_{co}$  d'équilibre signant la mise en place de processus thermorégulateurs. La deuxième se réfère à la phase de plateau, qui est de durée et de niveau de  $T_{co}$  variables. La troisième correspond à la brusque augmentation de la  $T_{co}$  jusqu'à la température létale ou « critical thermal maximum » (CTM, [135]). Ainsi, pour une contrainte environnementale donnée, il existe une grande hétérogénéité de réponses thermophysiques à la chaleur, laissant suggérer l'implication de nombreux facteurs intrinsèques dans la tolérance à la chaleur.



**Figure 1 :** Les trois types d'évolutions (I, II et III) de la température colonique chez le rat exposé à la chaleur [525]. Les courbes en pointillés représentent l'évolution de la température des animaux et les segments de droites entre chaque point d'inflexion de la courbe montrent la vitesse de variation de la température. Les chiffres 1, 2 et 3 au-dessus de l'axe des abscisses indiquent les différentes phases de l'évolution de la  $T_{co}$ .

Afin de mieux rendre compte de l'agression thermique, l'expression de l'hyperthermie doit se faire non seulement en terme de  $T_{co}$ , mais aussi en terme de durée d'exposition à des  $T_{co}$  élevées. Cette notion a été développée par Bynum [61] dans une formule mathématique permettant de calculer le temps d'exposition équivalent à  $T_{co}=42^{\circ}\text{C}$  ( $T_{eq} 42^{\circ}\text{C}$ ), température considérée comme délétère. Dans le modèle rat, Hubbard introduit le concept de charge thermique, qui correspond à l'aire sous la courbe de  $T_{co}$  (AUC, Area Under Curve) exprimée en  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$  [203]. L'AUC est calculée au-delà d'un seuil de  $T_{co}$  ( $AUC_{seuil}$ ) correspondant à l'émergence du risque léthal lors d'un exercice (course sur tapis roulant) au chaud. Chez ces animaux, le premier décès survenant dans les 24 heures qui suivent l'arrêt de l'exercice apparaît pour des animaux ayant eu une  $T_{co}$  supérieure à  $40,4^{\circ}\text{C}$ , faisant choisir cette  $T_{co}$  comme seuil pour le calcul de l' $AUC_{40,4}$ . Le risque de mortalité apparaît donc pour une AUC positive chez les animaux exposés à la chaleur à l'exercice. Chez l'animal exposé passivement à la chaleur, le premier mort apparaît pour une  $AUC_{40,4}$  supérieure à  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ .

### *c. Les signes neurologiques*

A des niveaux de charges thermiques élevées apparaissent les premiers signes neurologiques caractérisés par des anomalies comportementales : prostration, aréactivité à de légères bousculades, mais conservation des réflexes [444, 450]. Le point final serait l'incapacité de l'animal à se redresser lorsqu'on le retourne sur le dos (coma aréactif) [203]. Ces signes cliniques sont sous-tendus par des altérations cérébrales : effraction de la barrière hémato-encéphalique, oedème cérébral et lésions cellulaires, qui ne sont observées que chez les animaux exposés 4 heures à  $T_a=38^\circ\text{C}$ . Les quelques animaux décédant de cette exposition sont caractérisés par une forte diminution de PAM, indiquant un état de choc et donc une ischémie cérébrale [447, 448, 450].

## **4. Les mécanismes physio-pathologiques de la mort thermo-induite**

### *a. Définition*

Chez le rat anesthésié, le CC est défini par la chute de la PAM et du FSC [535] car il est difficile de juger de l'émergence du CC sur la courbe d'évolution de  $T_{co}$  monophasique augmentant de façon linéaire avec une brusque accélération juste avant le CC [223].

### *b. L'ischémie cérébrale*

L'ischémie cérébrale est au coeur de la phase finale du CC, anesthésié [280, 281] ou vigile [450]. Elle est caractérisée par une réduction du FSC, accompagnée d'une augmentation de la pression intracrânienne et d'une chute de la pression artérielle systémique [280, 281].

### *c. Les dysfonctions cardio-vasculaires*

Comme chez l'homme, l'exposition à la chaleur de rats anesthésiés induit une variation biphasique du fonctionnement cardio-vasculaire. Dans un premier temps, la PAM et la FC augmentent alors que les intervalles P-R (temps de conduction auriculo-ventriculaire) et du complexe QRS (dépolarisation des ventricules) se réduisent [285]. Dans un second temps, la PAM s'effondre, définissant le CC [285, 545], et la FC décroît alors que la durée de l'intervalle P-R reste stable [545]. Parallèlement à ces modifications, il existe une redistribution des flux sanguins dans l'organisme. Le FSC augmente au cours de la phase initiale d'hyperthermie puis chute lors du CC [535]. L'inverse est observé au niveau digestif où l'augmentation des résistances durant la phase d'hyperthermie conduit à une diminution du flux sanguin mésentérique. L'effondrement des résistances lors du CC s'accompagne d'une reprise violente du flux local, précipitant la survenue de l'état de choc [246]. Cette évolution est aggravée par (i) l'incapacité des mécanismes de compensation vasomoteurs puisque l'hyperthermie atténue le baroréflexe [315] et désensibilise les vaisseaux aux agents vasoconstricteurs [314, 315, 411] ; (ii) la déshydratation qui ne peut être compensée par l'activation sympathique que pour de faibles niveaux [313]. Toutefois, la fonction cardio-vasculaire

prime sur la thermorégulation puisque les seuils et l'amplitude de thermolyse sont augmentés chez les rats vigiles déshydratés par rapport aux rats normohydratés [353].

Cette faillite cardio-vasculaire peut être expliquée par (i) une dysfonction du baroréflexe [80, 273], dont la fonction est de faire face à toute baisse de pression par une activation sympathique rétablissant l'équilibre [70], (ii) une inhibition des centres bulbaires de contrôle sympathique comme observé dans le choc septique [121], (iii) la combinaison de ces deux dysfonctions.

#### *d. Les altérations du métabolisme énergétique*

Au cours de l'exposition à la chaleur, le métabolisme cérébral augmente initialement pour s'effondrer lors du CC. Ainsi, le FSC [83], la pression en O<sub>2</sub> tissulaire [83], la consommation de glucose [86] et d'O<sub>2</sub> (+5-6% par degré) [76] augmentent en hyperthermie avec une relation linéaire entre les augmentations du métabolisme et du FSC [76]. Lors du CC, toutes ces variables s'effondrent, particulièrement pour la consommation d'O<sub>2</sub> au-delà de T<sub>co</sub>=42°C [76]. L'activation du métabolisme du SNC conduit à une élévation du lactate dans le liquide céphalo-rachidien et dans le tissu cérébral [76, 83], laquelle est accompagnée d'une augmentation du *ratio* lactate/pyruvate et du glycérol [83]. Si le lactate cérébral est un carburant essentiel des neurones [300], son accumulation par excès de production est la marque de la transition d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie. Son accumulation pourrait s'accompagner d'une acidose cérébrale délétère comme cela est observé en périphérie avec l'association des réductions des pressions partielles en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub> et PCO<sub>2</sub>), de l'acidose et de l'hyperlactémie [517].

Malgré cette forte activation énergétique, les besoins locaux ne sont pas satisfaits. Dans l'hippocampe, les composés à haute énergie (ATP et créatine phosphate) baissent et les concentrations d'ADP augmentent [296, 507]. L'altération du rapport ATP/ADP suggère que le fonctionnement mitochondrial soit altéré. De fait, les mitochondries présentent un débit de production de radicaux libres dérivés de l'O<sub>2</sub> accru lors du CC [83], contribuant à l'agression radicalaire signalée par l'élévation des concentrations de « 2,3 et 2,5-dihydroxybenzoic acid » et de la peroxydation lipidique [83, 532]. Ces radicaux libres participent aux dérégulations physiologiques et à l'installation des lésions car l'administration d'agents anti-radicalaires ( $\alpha$ -tocophérol, magnolol) (i) atténue l'effondrement de la PA et de la FSC et l'augmentation des cytokines plasmatiques TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 [84, 358], (ii) se montre neuroprotectrice [358].

#### *e. Les altérations de la neurotransmission*

L'exposition à la chaleur de l'animal anesthésié conduit à une lente augmentation (i) des concentrations extracellulaires de dopamine dans le striatum [282] et l'hypothalamus [222], (ii) des concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hypothalamus [223], (iii) des concentrations extracellulaires de glutamate dans le striatum [535] et (iv) de la production de monoxyde d'azote (NO) [71]. Lors de la survenue de l'ischémie cérébrale, ces variations culminent conférant à la courbe de cinétique un

aspect biphasique et faisant suspecter un mécanisme excito-toxique [68]. L'excès de libération de ces neurotransmetteurs semble généralement aggraver l'ischémie, les lésions neuronales et réduire la survie puisque la déplétion en dopamine [282], sérotonine [223] ou glutamate [535] limite leurs effets délétères. Ainsi l'exposition à la chaleur induit des dysfonctions de la neurotransmission qui sont en elles-mêmes nocives, engageant un cercle vicieux.

### *f. L'inflammation*

Lors du CC, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  est notée chez le lapin dans l'hypothalamus et le plasma [284] et, chez le rat, dans le diencéphale, le tronc cérébral et le cortex [283] ainsi que dans le plasma [522]. L'amélioration de la survie et la limitation des lésions neuronales consécutives à l'injection intra-veineuse (i.v.) d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) témoignent de l'implication néfaste des protéines IL-1 $\beta$  dans le CC [283, 284]. Cette action passe par la réduction de libération de sérotonine dans l'hypothalamus [92] et, surtout, par le maintien du FSC [288]. Cependant, des souris knock-out à l'IL-6 et au récepteur TNF- $\alpha$ , exposées vigiles à la chaleur, présentent un temps de survie réduit, suggérant que ces cytokines soient nécessaires à la survie [265].

## **C. Théorisation de la genèse du CC**

### ***1. Hypothèse de la thermorégulation***

La première hypothèse repose sur l'idée que la charge thermique, d'origine endogène et exogène, à laquelle est soumis l'organisme dépasse les capacités de thermolyse et ne peut être évacuée. Le CC devient la marque du débordement des capacités. Cette hypothèse pourrait se discuter que chez le rat anesthésié chez qui  $T_{co}$  augmente de façon linéaire en raison de la perturbation des fonctions thermorégulatrices par l'anesthésie. Chez le rat vigile, le plateau de stabilité de  $T_{co}$  dément cette hypothèse. Pourtant, la brutale augmentation de  $T_{co}$  qui termine le plateau suggère qu'une dysfonction de la thermorégulation soit à son origine.

### ***2. Hypothèse musculaire***

Cette hypothèse découle de la précédente en suggérant que la charge thermique provienne d'un dysfonctionnement musculaire, caractérisé par une production de chaleur démesurée en regard de la production mécanique. Cette dysfonction musculaire est observée dans l'hyperthermie maligne per-anesthésique, myopathie caractérisée par une anomalie du contrôle des mouvements de calcium due à une mutation du récepteur à la ryanodine de type 1 [440]. Il en découle une production énorme de chaleur suite à des contractures musculaires induites par l'exposition à des anesthésiants halogénés. L'hypothèse s'appuie sur l'existence d'une relation entre le CCE et l'hyperthermie maligne per-anesthésique [27], mais ne concernerait qu'un nombre limité d'individus [45].

### ***3. Hypothèse cardio-vasculaire***

Le conflit entre les nécessités de thermorégulation et de perfusion cérébrale dans un contexte d'hypovolémie est à l'origine d'une théorie cardiovasculaire du CC. Durant l'exposition à la chaleur, le conflit est géré par la redistribution vasculaire aboutissant à une vasoconstriction splanchnique à l'origine de lésions hépato-coliques [336]. Le brutal changement fonctionnel précédant le CC (vasodilatation splanchnique paradoxale [246], vasoconstriction cutanée [336], réduction du FSC [362]) suggèrent qu'une bascule catastrophique de l'équilibre cardio-vasculaire survient. Ce constat a conduit à la mise en évidence du rôle des dysfonctions cérébrales dans la survenue de l'état de choc.

### ***4. Hypothèse immuno-inflammatoire***

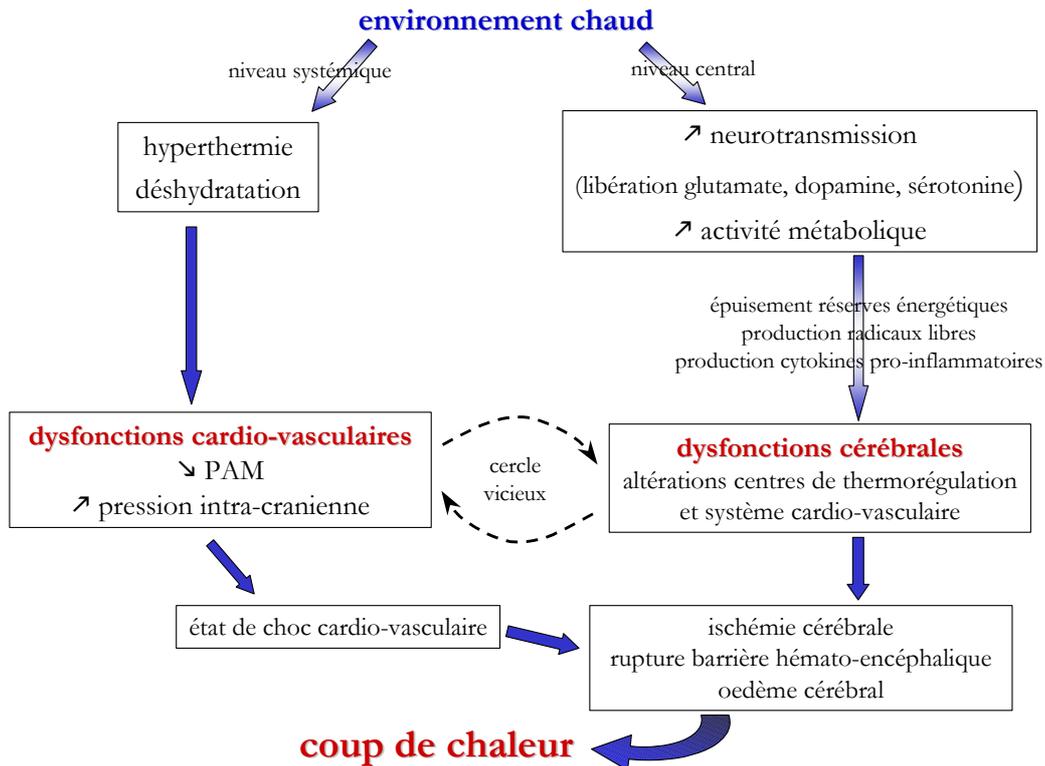
L'ischémie mésentérique qui découle de la redistribution vasculaire facilite la translocation d'endotoxines dans la circulation portale, conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules hépatiques [127, 342]. De telles synthèses sont également le fait de cellules sanguines humaines en culture [127] et du tube digestif [302, 355]. Ces cytokines pourraient faciliter la survenue du choc circulatoire [283, 284], et du CC [342]. Elles agiraient sur le cerveau par différents modes de transfert : *(i)* le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau des zones de perméabilité comme l'organe vasculaire de la lamina terminalis (OVLT) [474] ; *(ii)* la traversée de la BHE par un transport actif [474] ; *(iii)* une action indirecte sur le SNC par la libération de NO et prostanoïdes au niveau des cellules endothéliales [251, 396, 474] ; *(iv)* une action cérébrale par voie nerveuse vague [34, 146, 164, 224]. On ne peut sans doute pas exclure une néosynthèse endogène cérébrale de cytokines, affirmée dans l'ischémie cérébrale [58, 59, 141], mais pas dans le CC.

### ***5. Hypothèse métabolique***

Cette hypothèse relie le CC à un déséquilibre métabolique conduisant à la diminution de l'activité des pompes ioniques cellulaires et donc à une altération fonctionnelle de tous les organes [202, 204]. Cette hypothèse, développée initialement pour le muscle, s'intègre dans une hypothèse centrale plus vaste.

### ***6. Hypothèse centrale***

Cette dernière hypothèse place le cerveau au centre du CC du fait que le tissu cérébral est le tissu le plus vulnérable, en raison de sa tendance à stocker la chaleur [55] et de sa faible tolérance à l'hypoxie, environ trois minutes, par rapport aux autres tissus tels que le tissu musculaire, hépatique ou digestif. Elle intègre l'inflammation, le déséquilibre métabolique et le désordre de neurotransmission comme mécanismes délétères, le déséquilibre cardio-vasculaire et l'altération de la thermorégulation comme conséquences.



**Figure 2 :** schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du coup de chaleur.

Brièvement, l'excès d'hyperthermie se traduit dans le cerveau par l'apparition d'un déséquilibre énergétique et d'une production de radicaux libres [83]. Il se génère un état excito-toxique dont la marque est une libération non régulée de neurotransmetteurs [222, 223, 282, 535] et en particulier de NO [71]. Ce mécanisme est amplifié par la rupture de BHE [450], l'apparition d'une inflammation cérébrale [283, 284] et l'induction d'un cercle vicieux de déshydratation-hypovolémie, hypoperfusion centrale. La condensation du NO avec les radicaux  $H_2O_2$  produit des peroxy-nitrites bloquant la neurotransmission glutamatergique [82]. Ce mécanisme est à l'origine de la dérégulation cardio-vasculaire (noyau dorsal du bulbe) et sans doute thermique (hypothalamus). Ce mécanisme pathogène peut également jouer pour d'autres zones cérébrales comme le cortex frontal ou le thalamus, conduisant à l'adoption de comportements inadéquats comme la poursuite de la course alors que des signaux de danger sont censés conduire à l'arrêt de l'exercice [48]. L'apport des données de la littérature chez l'homme et dans le modèle animal permet de reconstruire un schéma théorique des mécanismes délétères se produisant lors de l'exposition à un environnement chaud et aboutissant au CC (**Figure 2**).

## ***II. Le stress systémique et les glucocorticoïdes***

### **A. Qu'est-ce que le stress ?**

#### ***1. Définitions***

Etymologiquement, le mot « stress » provient du latin « stringere » qui signifie « mettre en tension ». Mais se réfère-t-il à ce qui met en tension ou ce qui est mis en tension ? Cette ambiguïté de la définition du stress entre agent inducteur et l'état induit est retrouvée dans les définitions habituelles.

D'un côté le mot stress décrit la réaction de l'organisme à une situation :

+ *Stress : réaction de l'organisme à un agent d'agression ou à un traumatisme quelconque.* (Encyclopaedia Universalis) ou *réponse de l'organisme aux facteurs d'agressions physiologiques et psychologiques ainsi qu'aux émotions (agréables ou désagréables) qui nécessitent une adaptation.* (Larousse)

D'un autre côté, il signifie plutôt la situation subie par l'organisme :

+ *Stress : agent ou processus physique, chimique ou émotionnel qui s'exerce sur l'organisme et provoque une agression ou une tension pouvant devenir pathologique.* (Encyclopédie encarta) ou *agression contre un organisme vivant, par extension : réactions biologiques et psychologiques d'un organisme face à une situation nouvelle de quelque origine qu'elle soit, dangereuse ou agréable.* (Flammarion médecine)

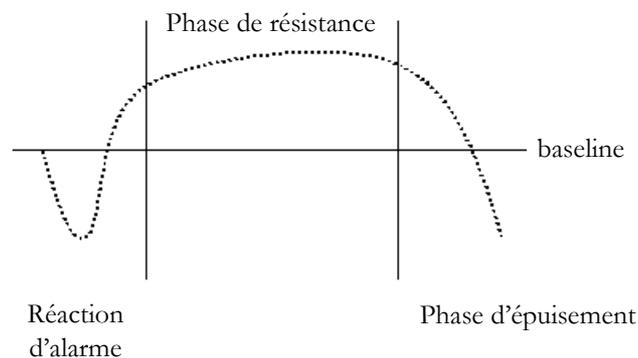
Dans ce travail, nous entendons le stress comme étant la réaction biologique de l'organisme, indépendamment de sa valeur. La situation déclenchant cette réaction correspond au « stressueur » ou « agent stressant », ou encore « agresseur ».

#### ***2. Histoire***

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le physiologiste Claude Bernard souligne que l'une des propriétés essentielles des êtres vivants est la faculté de maintenir la stabilité du milieu intérieur, condition indispensable à la survie dans un environnement toujours changeant. Ce concept sera nommé « homéostasie » au début du 20<sup>ème</sup> siècle par Cannon [73]. La préservation de l'environnement interne est faite par des ajustements compensatoires et anticipatoires grâce au système sympathico-adrénal homéostatique augmentant les chances de survie par le maintien de l'homéostasie [165]. Les paramètres physiologiques essentiels pour la vie, maintenus dans les limites de la normalité par ces ajustements sont la  $T_{co}$ , le pH, la  $PO_2$ , la  $PCO_2$  et l'osmolarité [322]. Cette théorie présente l'inconvénient de concevoir l'organisme dans un état trop statique, non flexible.

Le terme de stress fut réellement introduit par Selye comme la réaction apécifique de l'organisme à des agresseurs différents [436]. « *Le stress est indispensable à la vie et l'absence totale de stress, c'est la mort* » [433]. On entrevoit dans cette phrase les connotations négatives du stress (les conséquences délétères du stress inadapté ou « distress ») mais aussi positive (la réponse adaptée de l'organisme ou « eustress »). Le stress a

donc été associé au concept de « syndrome général d'adaptation » [435, 436] (**Figure 3**). Face à divers agents nocifs, ce syndrome se développe en trois phases : (i) L'alarme correspond à la réaction biologique initiale de courte durée (catabolisme, hypoglycémie, hémococoncentration, sécrétion catécholaminergique surrénalienne). (ii) La phase de résistance correspond à la mobilisation de processus physiologiques donnant les moyens de résister (anabolisme, hémomodilution, sécrétion de glucocorticoïdes). (iii) Si le stress persiste trop longtemps, l'organisme entre dans la phase d'épuisement correspondant au débordement des capacités adaptatives de l'organisme avec la réapparition des manifestations de la réaction d'alarme et l'apparition des premiers signes lésionnels [435].



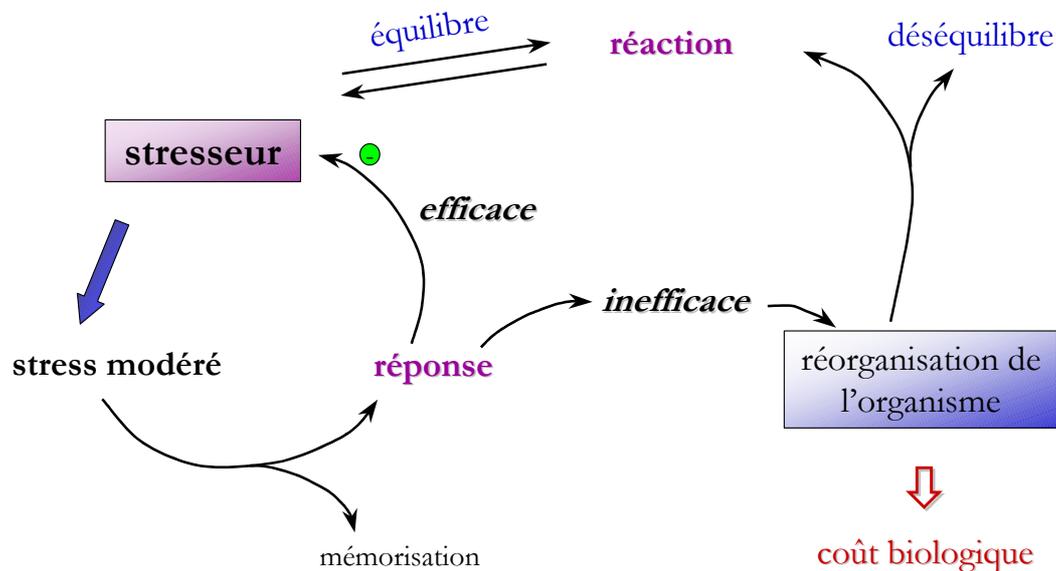
**Figure 3 : Evolution de la résistance de l'organisme au cours des trois phases du « Syndrome général d'adaptation » de Selye** (d'après [434]). La première réaction à un agent stressant est marquée par une diminution de la résistance. Si l'organisme s'adapte, le niveau de résistance augmente et la réaction d'alarme disparaît. Une exposition au stress trop prolongée conduit à un épuisement des ressources et une réapparition des signes de la réaction d'alarme. L'axe des abscisses représente le temps et en ordonnées est représenté le niveau de résistance.

Les notions d'homéostasie et les aspects que recouvre le « syndrome général d'adaptation » ont été repris et complétés par Sterling [468] à travers les termes d'allostasie et de charge allostasique. L'allostasie est l'ensemble des mécanismes permettant à l'organisme de fonctionner en dehors des zones homéostasiques de repos mais au prix d'un coût biologique (charge allostasique). L'organisme se trouve alors dans un état d'équilibre dynamique non économique qui peut être maintenu durant une période limitée du fait de la charge allostasique. Les médiateurs de l'allostasie, incluent les hormones de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA), les catécholamines et les cytokines. Un état allostasique s'accompagne donc de modifications d'activité de ces médiateurs primaires en réponse à un changement environnemental. Lorsque la charge allostasique dépasse les mécanismes adaptatifs, on parle de surcharge allostasique avec l'apparition des premiers signes pathologiques [319].

### ***3. Intégration temporelle***

De ces théories ressort l'idée d'un continuum allant d'une phase d'alarme à une phase de résistance (d'adaptation, « d'eustress », d'état allostasique) où l'organisme reste en bonne santé au prix d'un coût qu'il

peut assumer sans dommage pour sa structure, vers une phase d'épuisement (« distress », surcharge allostasique) où l'organisme devient malade. L'optimum est donc une phase de résistance à coût minimal et non une absence totale de stress. La transition d'un état physiologique vers un état pathologique se déroule lorsque le stress trop intense, prolongé trop longtemps ou répété trop souvent finit par induire une charge allostasique excédant les capacités de l'organisme.



**Figure 4 :** Représentation schématique du stress : le stressueur déclenche une réponse de l'organisme qui sera mémorisée et qui conduit (i) soit à l'atténuation du stressueur si elle est efficace (état allostasique maintenant l'homéostasie), (ii) soit à une réorganisation de l'organisme si elle est inefficace. Cette réorganisation présente un coût biologique aboutissant (i) soit à un état d'équilibre dynamique (charge allostasique) avec le stressueur (ii) soit à un déséquilibre si l'organisme ne parvient pas à s'adapter (surcharge allostasique).

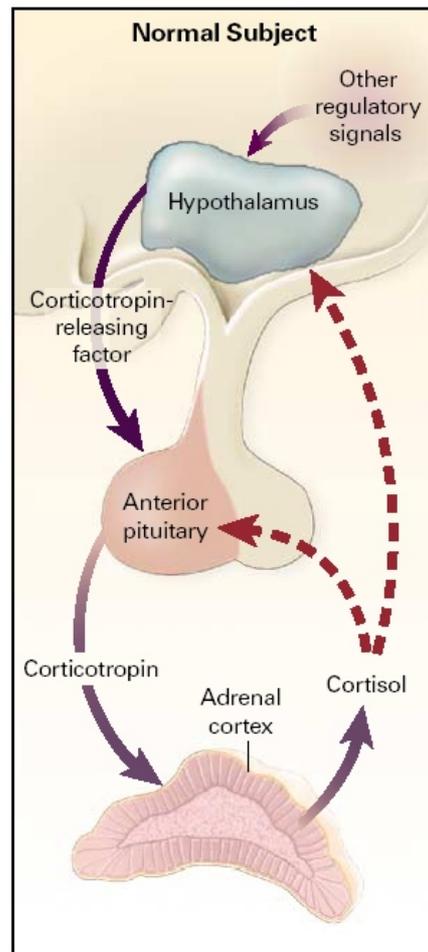
Il existe donc une dynamique de la réaction de l'organisme en relation avec la dynamique de présence du stressueur, le couplage étant défini par l'efficacité avec laquelle l'organisme éteint ou non le stressueur. Le schéma ci-dessus représente les différents types de réponses à un stressueur aboutissant soit à l'extinction du stressueur, soit à l'établissement d'un équilibre entre le stressueur et l'organisme, soit à un déséquilibre entre l'organisme et le stressueur.

Cependant, les connaissances actuelles ne fournissent que peu d'idées concernant les mécanismes sous-jacents de cette transition. Ceci peut être expliqué par l'existence de différences inter-individuelles dans la mise en place des mécanismes de lutte contre un agresseur, conduisant à une grande variabilité de profil de résistance.

## B. L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA)

### 1. Généralités

L'HPA s'articule autour de trois structures : l'hypothalamus, le lobe antérieur de l'hypophyse (adénohypophyse) et le cortex surrénalien (**Figure 6**).

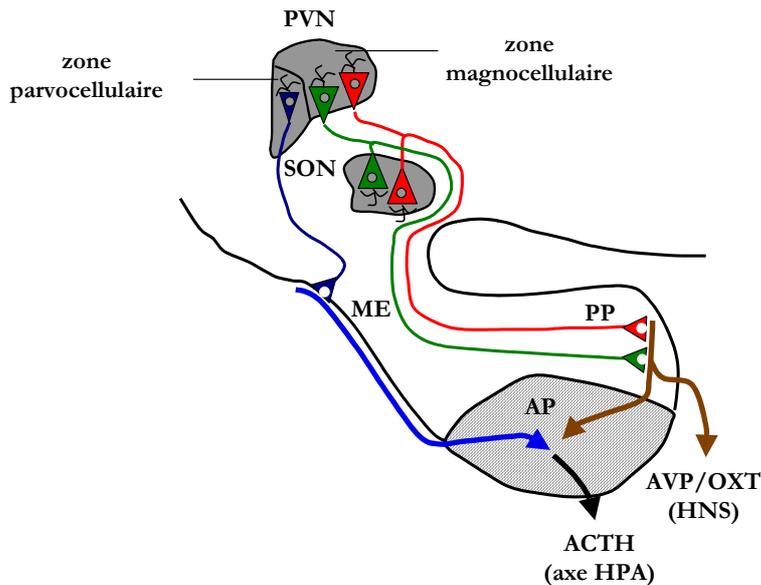


**Figure 5** : Les trois structures de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien [540].

### 2. Les systèmes hypothalamo-hypophysaires

#### a. Introduction

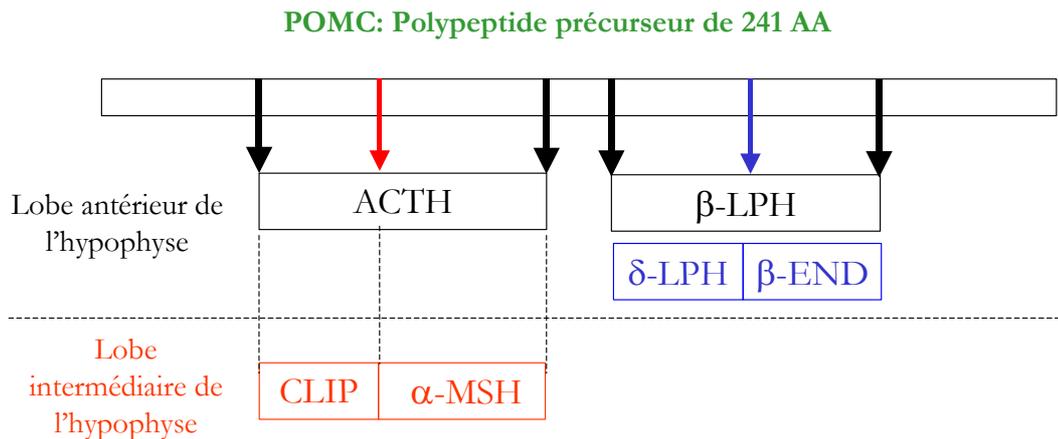
Les systèmes hypothalamo-hypophysaires s'articulent autour de deux portions : (i) une portion hypothalamo-antéhypophysaire associant la zone parvocellulaire du noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN) et le lobe antérieur de l'hypophyse et (ii) une portion hypothalamo-neurohypophysaire (HNS) composée de la zone magnocellulaire du PVN, du noyau supra-optique (SON) et du lobe postérieur de l'hypophyse (ou posthypophyse) (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Les deux systèmes hypothalamo-hypophysaires avec (i) la communication zone parvocellulaire/hypophyse antérieure en bleu (neurones à CRF et AVP) et (ii) la communication zone magnocellulaire/hypophyse postérieure en vert (neurones à AVP) et rouge (neurones à OXT) (d'après [133]). PVN, noyau paraventriculaire ; SON, noyau supra-optique ; ME, éminence médiane ; AP, hypophyse antérieure ; PP, hypophyse postérieure ; ACTH, hormone adrénocorticotrope ; AVP, vasopressine ; CRF, corticolibérine ; OXT, ocytocine ; HNS, système hypothalamo-neurohypophysaire.

### *b. Le système zone parvocellulaire/hypophyse antérieure*

Les neurones de la zone parvocellulaire du PVN projettent au niveau de l'éminence médiane et relient l'hypophyse antérieure par la circulation portale hypothalamo-hypophysaire (**Figure 6**, tracé bleu). Lors du stress, ces neurones synthétisent et libèrent la corticolibérine (CRF) et l'arginine vasopressine (AVP) dans la circulation portale [462]. Le CRF stimule les cellules corticotropes (soit 3 à 10% de la quantité totale des cellules) de l'hypophyse antérieure par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques au CRF de type 1 (CRF-R1). L'AVP potentialise l'effet du CRF par l'intermédiaire des récepteurs à vasopressine  $V_{1b}$  [133, 190, 462, 514]. Les cellules corticotropes synthétisent en réponse la pro-opiomélanocortine (POMC), polypeptide de 241 AA. Celle-ci est ensuite clivée en hormone adrénocorticotrope (ACTH), peptide de 39 AA, endorphines et lipotropines (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Clivages du précurseur POMC selon la région de l'hypophyse considérée. LPH, lipotropine ; END, endorphine, CLIP, corticotropin-like intermediate lobe peptide; MSH, mélanocyte-stimulating hormone

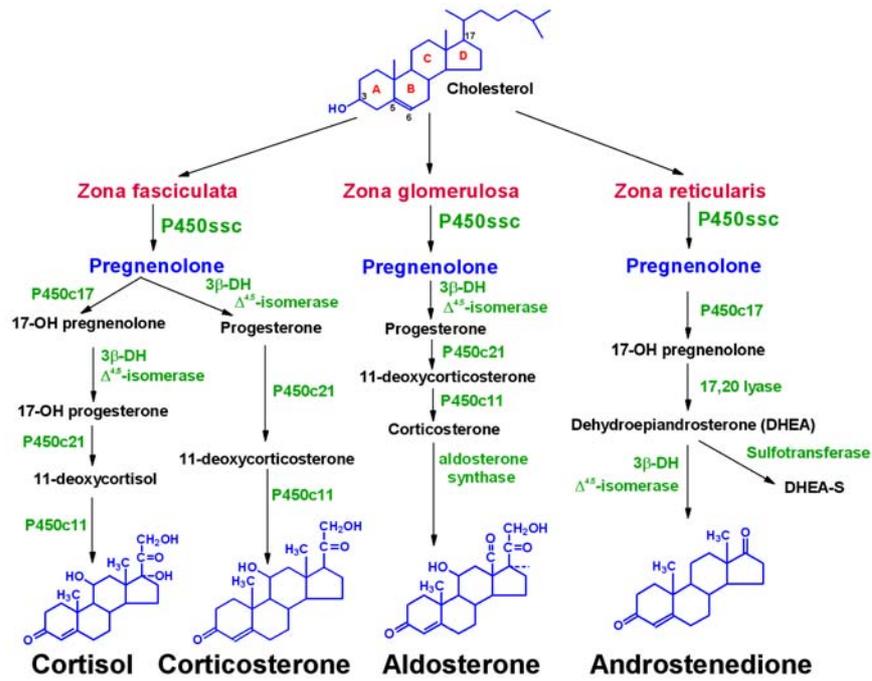
### *c. Le système hypothalamo-neurohypophysaire (HNS)*

Ce système est composé de la zone magnocellulaire du PVN et du noyau supra-optique (SON) dont les neurones se projettent au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse *via* la zone interne de l'éminence médiane (**Figure 6**, tracés vert et rouge). L'AVP et l'ocytocine (OXT), synthétisées par ces neurones, peuvent stimuler ou inhiber la sécrétion d'ACTH selon le mécanisme considéré. L'AVP et l'OXT atteignent l'hypophyse antérieure par deux voies circulantes : (i) l'éminence médiane, voie commune au transport du CRF et de l'AVP sécrétés par les neurones parvocellulaires et (ii) une voie portale plus courte entre hypophyse postérieure et hypophyse antérieure. La sécrétion d'ACTH est alors stimulée par l'intermédiaire des récepteurs  $V_{1b}$ . L'AVP et de l'OXT libérées au sein des noyaux hypothalamiques inhibent les neurones parvocellulaires et magnocellulaires du PVN et du SON [133].

### **3. Le système hypophyso-corticosurrénalien**

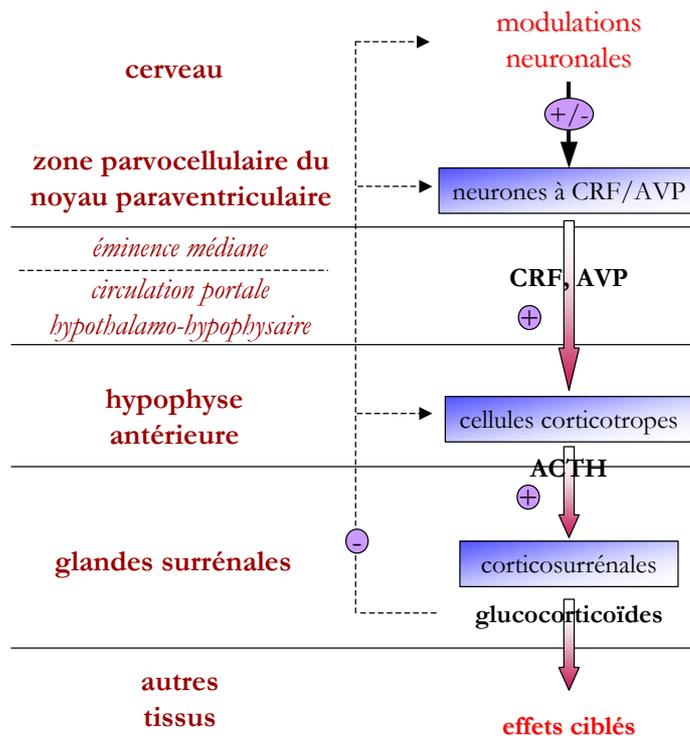
Les glandes surrénales sont composées de deux parties : (i) la médullo-surrénale sécrète l'adrénaline et la noradrénaline, composante vasculaire de l'activation sympathique, (ii) la corticosurrénale sécrète les hormones stéroïdiennes selon la zone stimulée : la zone fasciculée synthétise les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez le rat), la zone glomérulée les hormones minéralocorticoïdes (aldostérone) et la zone réticulée les hormones androgènes (déhydroépiandrostérone) et sexuelles (testostérone chez l'homme et œstrogène et progestérone chez la femme). La voie de synthèse est commune (**Figure 8**), dérivant du cholestérol, substance synthétisée dans le foie et dans les glandes endocrines à partir de l'acétyl-Coenzyme A (acétyl CoA).

L'ACTH véhiculée par la circulation sanguine périphérique jusqu'aux glandes surrénales se lie aux récepteurs mélanocortines de type 2 (MC2-R) dans la corticosurrénale, stimulant la stéroïdogénèse par la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [462].



**Figure 8 :** Schéma de synthèse des hormones dérivant du cholestérol. P450c11 correspond à l'enzyme 11β-hydroxylase. Le rat est dépourvu d'aldostérone synthase.

#### 4. Conclusion



**Figure 9 :** Représentation schématique de la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien (d'après [514]).

L'axe HPA représente une chaîne d'amplification avec un facteur mille à chaque étage (pmole de CRF,  $\mu$ mole d'ACTH et mmole de glucocorticoïdes). Les glucocorticoïdes sont les effecteurs terminaux de l'axe HPA. Ils régulent les fonctions métabolique, cardio-vasculaire, immunitaire, reproductrice, comportementale et cognitive [294]. Ils exercent également un rétrocontrôle inhibiteur à tous les étages de l'axe HPA (**Figure 9**).

## C. Les glucocorticoïdes

### 1. Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes se lient à deux types de récepteurs aux glucocorticoïdes, les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR, type I) et les récepteurs aux glucocorticoïdes *per se* (GR, type II). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs hormonaux nucléaires incluant les récepteurs aux minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, aux hormones sexuelles et thyroïdes, *etc.* Ces récepteurs partagent une structure composée de trois domaines : (i) un domaine N-terminal activant les gènes cibles et en interaction avec d'autres facteurs de transcription ; (ii) un domaine central en « doigts de zinc » constituant le domaine de liaison à l'ADN et participant à la dimérisation des récepteurs, la translocation nucléaire grâce à la séquence de localisation nucléaire (NLS) et la transactivation ; (iii) un domaine C-terminal de liaison au ligand contenant aussi des séquences de liaison aux Hsp, de translocation nucléaire, de dimérisation et de transactivation [19].

Les GR sont fortement exprimés dans les neurones des régions suivantes : cortex, amygdale, hippocampe, septum, thalamus, hypothalamus, cervelet, locus coeruleus, noyau dorsal du raphé. Les MR sont plutôt exprimés dans l'hippocampe, le septum latéral et l'hypothalamus (PVN) [178]. Les deux récepteurs sont donc colocalisés dans l'hippocampe (régions CA1 et CA2 et gyrus denté) et l'hypothalamus (région parvocellulaire du PVN et du noyau arqué) [178]. L'affinité des récepteurs à leur ligand est différente. Les GR montrent une faible affinité pour la corticostérone, mais une forte affinité pour les glucocorticoïdes de synthèse (dexaméthasone, RU28362). Inversement, les MR ont une forte affinité pour la corticostérone (10 fois plus que les GR) et l'aldostérone, et une affinité beaucoup plus faible pour la dexaméthasone (pour revue [114, 389]). Ces différences de localisations et d'affinités entre les deux types de récepteurs leur confèrent un rôle distinct. En phase de repos (environ  $1,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de corticostérone chez le rat), seuls les MR sont occupés, à 90%. En phase d'activité ou après un stress de contention (environ  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de corticostérone), les MR sont saturés et les GR sont occupés à 50%. Ainsi, les MR réguleraient le tonus basal de l'activité de l'axe HPA avec une efficacité fonction de la quantité de récepteurs MR. Les GR sont les médiateurs du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes avec une intensité fonction des quantités de glucocorticoïdes et de récepteurs GR [389].

## 2. Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes

### a. La transcortine ou CBG

La disponibilité des glucocorticoïdes aux tissus est régulée par la transcortine ou corticostéroïd-binding globuline (CBG). Cette glycoprotéine monomérique de 55-kDa de la famille des inhibiteurs de protéases sérines (serpine) est sécrétée par le foie. Dans la circulation sanguine, elle se lie à la corticostérone, la maintenant sous forme inactive et jouant un rôle de réservoir. La capacité de liaison de la CBG est modifiée par divers facteurs : (i) les stress de contention, sociaux, de privation de nourriture, des chocs électriques réduisent la capacité de liaison de la CBG ([52, 145] pour revue, [51]), (ii) l'inflammation localisée, provoquant une libération de protéases sérines par les neutrophiles activés, augmente la portion de corticostérone libre seulement au niveau du site inflammatoire et non dans la circulation générale [52]. En revanche, les modifications de la CBG sont moins évidentes à la chaleur [189, 194].

La CBG joue également un rôle de modulation fine des concentrations locales de corticostérone. L'internalisation cellulaire du couple CBG-corticostérone augmente la quantité de corticostérone libre intracellulaire susceptible d'activer les récepteurs intracellulaires. En revanche, la synthèse locale de CBG intracellulaire observée dans les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus, l'éminence médiane du rat [339] et les cellules corticotropes de l'hypophyse [52] limite l'accessibilité de la corticostérone aux récepteurs intracellulaires [52]. Ces mécanismes permettent une régulation beaucoup plus fine et spécifique que la simple diffusion de la corticostérone du compartiment sanguin vers le compartiment cellulaire.

### b. Les 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases type 1 et type 2

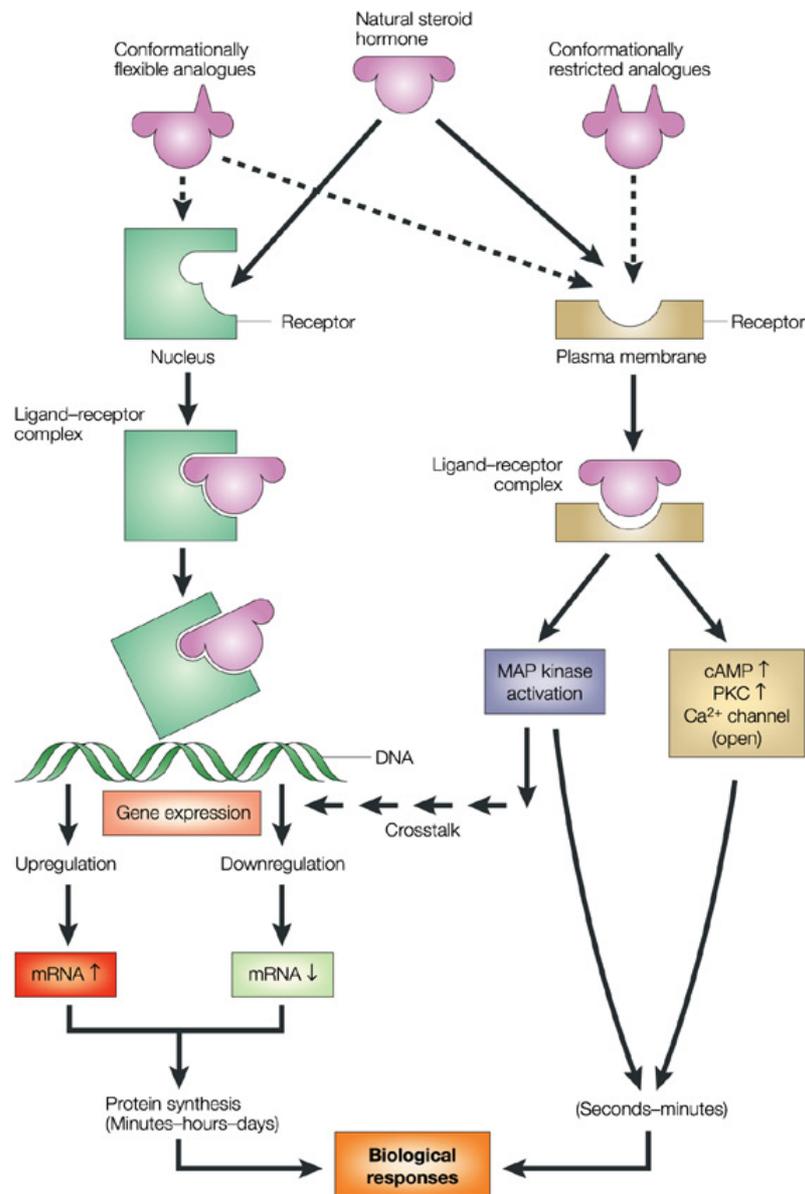
L'action des glucocorticoïdes est régulée au niveau intracellulaire par les deux iso-enzymes 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases (11 $\beta$ -HSD) type 1 (11 $\beta$ -HSD1) et 11 $\beta$ -HSD de type 2 (11 $\beta$ -HSD2).

La 11 $\beta$ -HSD2 est une déshydrogénase unidirectionnelle détruisant la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone. Localisée dans certaines régions du cerveau (organe subcommissural, noyau du tractus solitaire, noyau central de l'amygdale, hypothalamus latéral), elle orienterait plutôt le signal corticoïde vers les récepteurs MR [199]. Inversement, la 11 $\beta$ -HSD1 est une réductase, transformant la 11-déhydrocorticostérone inactive en corticostérone active, quoiqu'elle puisse être bidirectionnelle *in vitro*. Elle joue donc un rôle dans la régulation de l'axe HPA du fait de sa présence au niveau des sites clés du rétrocontrôle des glucocorticoïdes (hypothalamus, hypophyse, hippocampe et cortex cérébral) [199]. Ainsi, les souris déficientes en 11 $\beta$ -HSD1 (11 $\beta$ -HSD<sup>-/-</sup>) présentent des niveaux de base de corticostérone et d'ACTH élevés ainsi qu'une sécrétion accrue de corticostérone et d'ACTH lors d'un stress, suggérant une atténuation du rétrocontrôle inhibiteur [180]. La 11 $\beta$ -HSD1 semble donc être indispensable à l'efficacité du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes. Les niveaux enzymatiques sont modulés par le stress : le

stress aigu induit une augmentation de l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 dans l'hippocampe alors que le stress chronique entraîne une diminution [199].

### 3. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes agissent à moyen et long terme *via* les effets génomiques et à plus court terme *via* les effets non génomiques (**Figure 10**).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 10 :** Mécanismes d'action des glucocorticoïdes par la voie classique génomique (partie gauche) et par action rapide non génomique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (partie droite) [360].

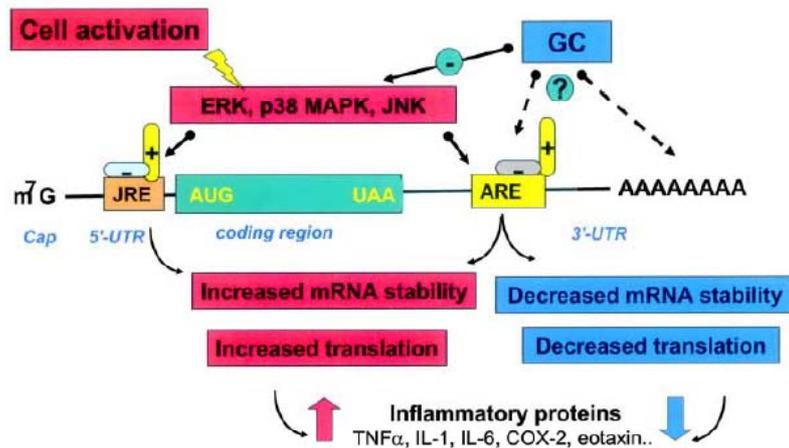
### a. Les effets génomiques

#### ➤ Modulation de la transcription des gènes

Les glucocorticoïdes, lipophiles, diffusent librement à travers la membrane cellulaire et se lient à leurs récepteurs GR solubilisés dans le cytoplasme par liaison aux protéines Hsp (voir III.B.2, page 62). Après libération des Hsp, le couple GR-corticostérone est transloqué dans le noyau où il agit sur l'expression du génome en activant ou inhibant la transcription. Le mécanisme classique d'action des GR (**Figure 10**) passe par la formation d'un homodimère (deux molécules de GR) qui se lie aux séquences d'ADN spécifiques (« glucocorticoid response elements », GREs) et active la transcription. Il nécessite le recrutement de co-activateurs activant l'acétylation des histones, indispensable au recrutement de l'ARN polymérase II [3]. Une répression de la transcription peut advenir par une interaction avec la séquence d'ADN « negative GRE » (nGRE). Peu de gènes possèdent cette séquence parmi lesquels la POMC, le CRF, l'ostéocalcine et la kératine [21]. Un deuxième mécanisme implique l'interaction des GR avec des facteurs de transcription comme « activator protein-1 » (AP-1, dimères Fos-Jun ou Jun-Jun), le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), la « cAMP response element-binding protein » (CREB), le peptide STAT [274]. Les GR liés à AP-1, NF- $\kappa$ B et CREB par interaction protéine-protéine préviennent la transcription des gènes activés par ces mêmes facteurs de transcription, sauf pour STAT dont la liaison GR-STAT potentialiserait l'activation des gènes activés par ce facteur de transcription, comme l'IL-4 [463].

#### ➤ Modulation post-transcriptionnelle

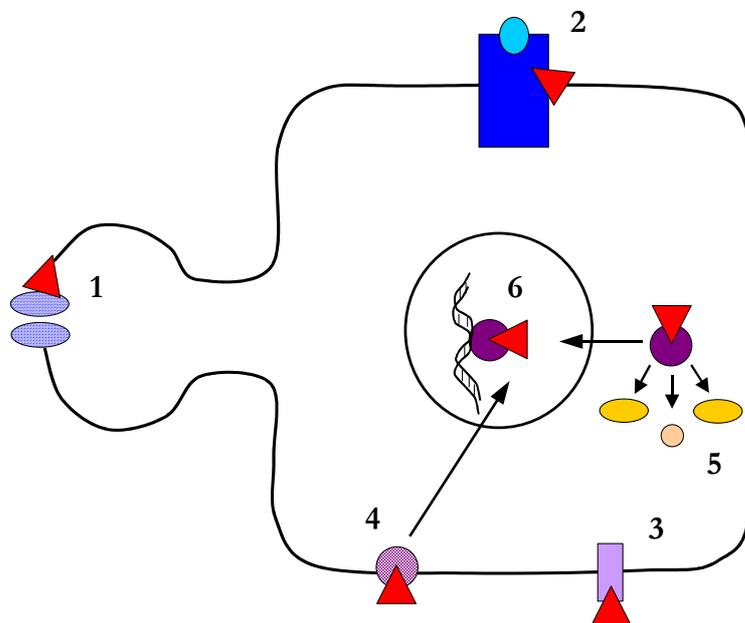
Les glucocorticoïdes agissent aussi sur la stabilité des ARNm, leur traduction en protéines [262, 467], la dégradation et la libération des protéines [29, 229, 504]. L'activation de cascades de signalisation de diverses kinases favorise la stabilité et la traduction des ARNm *via* leurs séquences « JNK responsive element » (JRE) et « adenine/uridine-rich element » (ARE). Les glucocorticoïdes diminuent la stabilité des ARNm par une inhibition de ces cascades de signalisation de kinases (**Figure 11**), passant probablement par des interactions protéine-protéine entre le complexe glucocorticoïdes-GR et la protéine de liaison aux ARNm responsable de la cascade de signalisation stabilisant les ARNm [259, 467]. Les glucocorticoïdes pourraient aussi diminuer la stabilité des ARNm de leurs propres récepteurs [211].



**Figure 11** : Régulation post-transcriptionnelle des gènes par les glucocorticoïdes [467]. JRE est un élément de réponse des c-Jun N-terminal Kinase (JNK).

### b. Les effets non génomiques

Le délai d'action des glucocorticoïdes par voie génomique est long : 10-30 min de translocation nucléaire, 5 à 120 min de transcription et traduction aboutissant à un délai théorique minimum de 15 min souvent plus long [303]. Des effets plus rapides que 15 min sont toutefois observés, faisant suspecter des mécanismes non génomiques (**Figure 12**).



**Figure 12** : Représentation schématique des différents sites de liaison non génomiques des glucocorticoïdes (d'après [303]). (1) canaux ioniques (*i.e.*, canaux calciques voltage-dépendant synaptiques) ; (2) récepteurs à neurotransmetteurs (*i.e.*, récepteurs à acétylcholine, récepteurs kappa opioïdes, récepteurs GABA<sub>A</sub>) ; (3) récepteurs membranaires non génomiques spécifiques ; (4) GR membranaires ; (5), protéines actives libérées du complexe GR-ligand ; (6) voie génomique classique par les GR intracellulaires. Les triangles rouges représentent les molécules de glucocorticoïdes.

➤ Action rapide médiée par les GR

Certains effets des glucocorticoïdes médiés par les GR ne passent pas par une action transcriptionnelle [173, 303], mais par la libération de protéines du complexe GR-protéines suite à la liaison de l'agoniste. Par exemple, les Hsp libérées stimulent l'activité de la calcineurine [303] (**Figure 13**).

➤ Action rapide sans implication de récepteurs

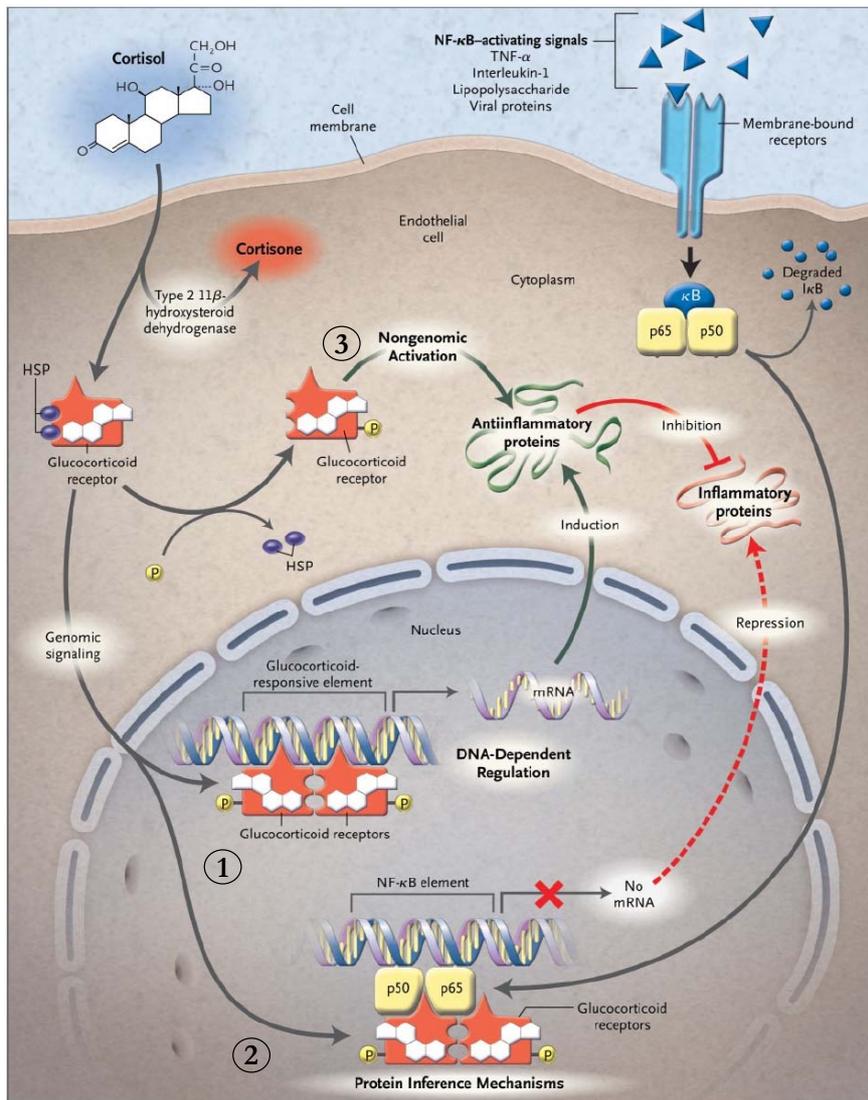
Les glucocorticoïdes se lient aux membranes synaptiques et (i) modulent la liaison de la calmoduline aux membranes en augmentant leur présence dans les vésicules synaptiques et (ii) activent la fonction des canaux calciques voltage-dépendants (**Figure 12**). Etant donné le nombre important de processus biochimiques régulés par la calmoduline et les canaux calciques, ce mode d'action des glucocorticoïdes est non négligeable [303]. Un autre mécanisme d'action des glucocorticoïdes passe par l'altération des propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire sans intervention de récepteur [137, 467]. Ces effets, surtout observés *in vitro*, nécessiteraient des concentrations très élevées de glucocorticoïdes. Ainsi, la dexaméthasone à forte concentration déstabiliserait les membranes lysosomales, un effet impliqué dans l'action anti-anaphylactique rapide (< à 10 min) des glucocorticoïdes [195].

➤ Action rapide médiée par des récepteurs membranaires

En fait, la majorité des effets rapides des glucocorticoïdes passerait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, soit spécifiques aux glucocorticoïdes, soit par des récepteurs à neurotransmetteurs. Les récepteurs spécifiques se distinguent nettement des GR par leurs propriétés de liaison aux glucocorticoïdes [3]. Les protéines Hsp70 et 90 interagissent avec ces récepteurs probablement de la même manière qu'avec les GR [384]. Les actions rapides sont liées à des voies de signalisation intracellulaires telles que le couplage des protéines G et des kinases incluant la mitogen-activated protein kinase (MAPK) et la phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) [3] (**Figure 10** et **Figure 12**). Ce mode d'action semble être impliqué dans le contrôle du comportement (*i.e.*, augmentation de l'évaluation du risque par les glucocorticoïdes [303, 332]), dans l'apprentissage et la mémoire [479], dans les maladies inflammatoires [3].

Les glucocorticoïdes modulent aussi les récepteurs à neurotransmetteurs [303] de manière complexe et mal systématisée : les récepteurs kappa opiacés ont un site de liaison des glucocorticoïdes, les récepteurs acide  $\gamma$ -amino-butérique (GABA) seraient modulés en synthèse par voie génomique et en fonction par voie non génomique, les effets de l'acétylcholine seraient inhibés par les glucocorticoïdes alors que les effets de la noradrénaline, la sérotonine, l'AVP, le CRF et le glutamate seraient modulés *via* une action sur les protéines G et les protéines kinases C. Des actions par le biais des libérations de transmetteurs pourraient être évoquées : régulation de la synthèse de sérotonine par l'augmentation de la capture du tryptophane par les terminaisons nerveuses [303], augmentation des concentrations de glutamate dans les synapses [338], *etc.*

#### 4. Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes



**Figure 13 :** Mécanismes d'action des glucocorticoïdes et des GR sur l'inhibition de l'inflammation (d'après [391]). Régulation génomique dépendant de la liaison du GR à sa séquence d'ADN spécifique GRE, conduisant à l'activation de la synthèse de protéines anti-inflammatoires (DNA-dépendent regulation) ①. Régulation par interaction GR-facteurs de transcription (*i.e.*, NF- $\kappa$ B), conduisant à l'inhibition de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (protein interference mechanisms) ②. Régulation non génomique médiée par les GR (*i.e.*, libération Hsp du GR, conduisant à l'activation dans le cytosol de protéines anti-inflammatoires, nongenomic activation) ③.

L'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes passe par des mécanismes de la voie génomique et non génomique. Par voie génomique, ils activent la synthèse de protéines anti-inflammatoires dont les gènes possèdent une séquence GRE comme l'I $\kappa$ B- $\alpha$ , la lipocortine-1 (ou annexine I), l'inhibiteur de leukoprotéase sérique, la MAPK phosphatase-1, l'IL-1ra, l'IL-10, l'endopeptidase neurale [20, 21, 463] (**Figure 13**, ①). Ils interagissent également avec des facteurs de transcription, inhibant la transcription de nombreuses cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, TNF- $\alpha$ , « granulocyte macrophage-

colony stimulating factor » (GM-CSF), chémokines, des enzymes inflammatoires telles que la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS), la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), des récepteurs inflammatoires tels que les NK-receptor [20, 21, 463] (**Figure 13, ②**). Enfin, ils diminuent la stabilité et la traduction des ARNm d'un grand nombre de gènes inflammatoires possédant une séquence ARE : IL-1, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, COX-2, iNOS [467]. Par voie non génomique et médiée par les GR, les glucocorticoïdes induisent la libération des protéines Hsp du complexe cytosolique GR-glucocorticoïdes-Hsp, ce qui entraîne l'activation de protéines anti-inflammatoires au niveau du cytosol (**Figure 13, ③**).

### ***5. Le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes***

Un premier mécanisme de rétrocontrôle négatif se déroule lentement de manière génomique. Au niveau de l'hypophyse antérieure, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de la POMC, des récepteurs à CRF et à AVP des cellules corticotropes, influençant ainsi la quantité d'ACTH déversée dans la circulation [479]. Au niveau de l'hypothalamus (PVN), les glucocorticoïdes inhibent l'expression du CRF et de l'AVP [95]. Les effets combinés de la réduction de la quantité d'ACTH, d'expression de CRF et AVP et de leurs récepteurs contribuent à la suppression de la réponse hormonale de stress de l'axe HPA. Ces effets passent principalement par les GR, mais probablement aussi par les MR [8]. L'hippocampe et le cortex médian pré-frontal seraient aussi impliqués dans le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes. En effet, lors d'un stress chronique, la quantité de GR diminue dans ces zones et le rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes est atténué [123, 337].

Une suppression rapide non génomique de l'activation de l'axe HPA est également décrite, s'exerçant pour une moitié par une inhibition de la libération de l'ACTH dans l'hypophyse, et pour l'autre dans le cerveau [195, 479]. Au niveau du PVN, les glucocorticoïdes réduisent l'excitabilité des neurones projetant sur l'éminence médiane [479], inhibent la libération d'AVP des neurones [90] et facilitent la libération GABA des neurones magnocellulaires [479]. Ils stimuleraient aussi la libération d'endocannabinoïdes, conduisant à la suppression de la libération de glutamate [120]. L'intervention de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (protéine kinase A et C, PKA et PKC dépendant) serait impliquée dans cette action rapide des glucocorticoïdes [90, 120, 479]. Les glucocorticoïdes agiraient aussi au niveau de l'hippocampe en augmentant la libération de glutamate, excitant au niveau de l'hypothalamus des interneurons GABAergiques. Les MR seraient impliqués dans cette signalisation rapide, de manière indépendante des mécanismes transcriptionnels [479].

## D. Stress et glucocorticoïdes

### 1. *Approche physiologique classique*

La complexité des mécanismes d'action des glucocorticoïdes et la finesse de leur régulation suggèrent que ces hormones jouent un rôle capital dans la régulation de l'activation de l'organisme face à un agresseur. Pour autant, cela ne permet pas de déterminer leur rôle physiologique intégré. Le premier regard, le plus ancien, est celui de la physiologie intégrée mettant les glucocorticoïdes au centre de l'activation physiologique (pour revue, [56]).

- Le métabolisme : les glucocorticoïdes facilitent la mobilisation des ressources de l'organisme afin de fournir le combustible cellulaire. Ils augmentent la glycémie par la mobilisation des réserves énergétiques en : (i) stimulant la néoglucogenèse et la glycogénolyse ; (ii) inhibant le transport du glucose, sa capture et son utilisation dans les tissus périphériques ; (iii) stimulant la lipolyse dans les cellules adipeuses et la protéolyse dans les cellules musculaires.

- Le système cardio-vasculaire : les glucocorticoïdes améliorent la circulation de l'énergie en activant la convection sanguine. Ils augmentent la force de contraction cardiaque par une augmentation de l'expression des récepteurs adrénérgiques  $\beta_1$  et favorisent la vasoconstriction périphérique par une augmentation de l'expression des récepteurs adrénérgiques  $\alpha_1$ . Ils jouent donc un rôle amplificateur de l'effet des catécholamines. De plus, ils favorisent la production d'angiotensinogène et augmentent la sensibilité des vaisseaux sanguins aux actions de vasoconstriction de l'angiotensine II.

- Le système immunitaire et inflammatoire : Les glucocorticoïdes aident à un fonctionnement allostasique en réprimant l'expression d'un des médiateurs de la charge allostasique : les cytokines. Ainsi, ils ont des actions anti-inflammatoires et immunosuppressives. Ces actions passent par une inhibition de la synthèse, la libération, et l'activité des cytokines impliquées dans la réponse pro-inflammatoire et des médiateurs de la réponse immunitaire (II.C.4., page 54).

### 2. *Approche intégrée moderne*

#### a. *La dépendance temporelle*

Cette approche intégrée permet de comprendre leurs actions dans les premières phases de stress, celles de la réaction d'alarme. Pour autant, elle n'explique pas la complexité de leur régulation. Ainsi, Munck considère les glucocorticoïdes comme jouant un rôle indispensable à la survie face à un agent stressant en agissant à la fois sur la réaction à l'agresseur et la récupération lorsque l'agresseur disparaît [345] :

*« We proposed that : (a) the physiological function of stress-induced increases in GC levels is to protect not against the source of stress itself, but against the normal defense reactions that are activated by*

*stress; and (b) the GCs accomplish this function by turning off those defense reactions, thus preventing them from overshooting and themselves threatening homeostasis. » [345]*

Cette vision biphasique est reprise par Sapolsky [423] à travers une classification des actions des glucocorticoïdes en deux classes (i) les actions préparatrices, modifiant les réponses de l'organisme à un stress ultérieur ou contribuant à l'adaptation au stress chronique. (ii) les actions modulatrices, ajustant les réponses de l'organisme à un agent stressant. Ces actions se déclinent en trois types selon le moment où elles surviennent et la concentration de glucocorticoïdes cellulaires :

- Les actions permissives : elles sont accomplies par les glucocorticoïdes présents avant le stress. Leurs conséquences (activation cardio-vasculaire, immunitaire et métabolique) se manifestent donc dans la phase d'alarme.

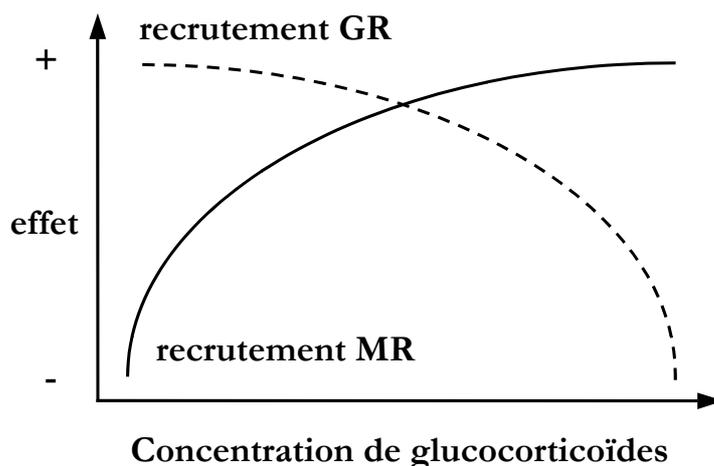
- Les actions suppressives : elles sont réalisées par l'augmentation de concentration de glucocorticoïdes induite par le stress, et se manifestent généralement une heure après le début du stress. Elles préviennent le dépassement des réactions de défense en inhibant les réponses immunitaires et inflammatoires.

- Les actions stimulatrices : elles sont aussi accomplies par l'augmentation de concentration de glucocorticoïdes induite par le stress, et se manifestent une heure après le début du stress. Elles augmentent la première vague de réponses hormonales, reversant ainsi les effets suppressifs. Par exemple, les glucocorticoïdes prolongent l'action permissive de la stimulation de la néoglucogénèse et l'inhibition de l'utilisation du glucose en périphérie.

Les actions permissives et stimulatrices sont donc impliquées dans la médiation des réactions de stress, alors que les actions suppressives sont impliquées dans la limitation des réactions de stress [423].

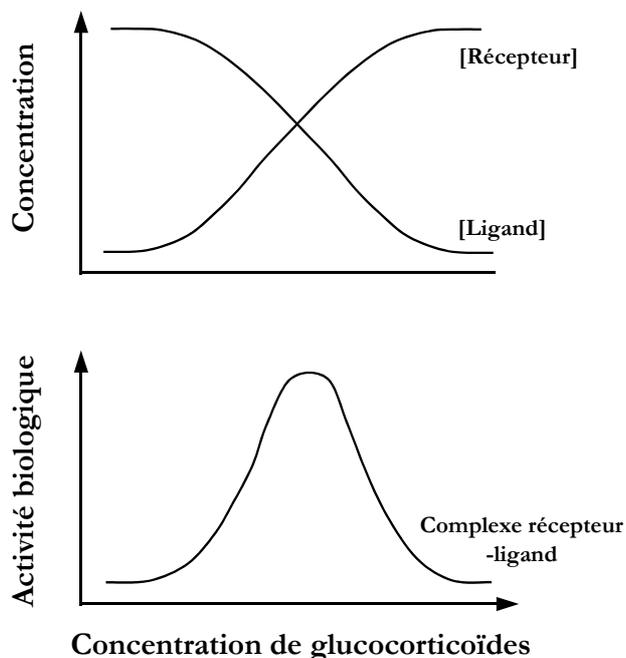
### *b. La relation concentration-fonction*

Il a donc émergé l'idée selon laquelle la concentration optimale de glucocorticoïdes à la survie de l'organisme dépend du moment où elle est considérée [422]. Cette relation de la concentration à l'effet est médiée par les différences d'affinité entre les deux récepteurs aux glucocorticoïdes (**Figure 14**). Ainsi, à des niveaux bas de glucocorticoïdes, la signalisation passe par les MR du fait de la forte affinité. L'action est donc plutôt activatrice. Lorsque la concentration de glucocorticoïdes atteint des niveaux de stress, la signalisation passe par les GR et l'action est plutôt inhibitrice. Ainsi, une augmentation de l'occupation des MR provoque une augmentation de l'excitabilité hippocampique, alors qu'une augmentation de l'occupation des GR entraîne un effet opposé. Ce caractère biphasique n'est cependant observé que dans les structures cérébrales où les deux récepteurs cohabitent.



**Figure 14 :** Mécanisme générant la courbe en « U » inversé en présence des deux récepteurs MR et GR (d'après [422]).

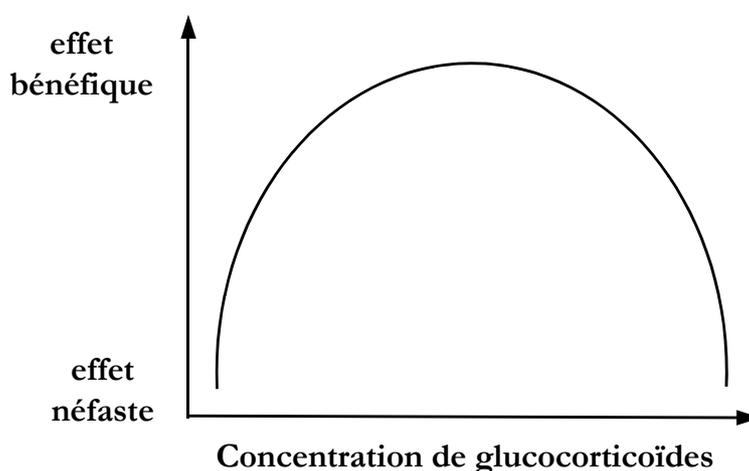
Dans le cas de tissus ne comportant qu'un type de récepteur, le récepteur GR, comme les régions cérébrales distinctes de l'hippocampe et de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes exercent un effet sur un ligand et un effet opposé sur les récepteurs de ce ligand (**Figure 15**). Ainsi, l'augmentation de la concentration de glucocorticoïdes diminue la concentration d'IL-1 mais augmente celle du récepteur aboutissant à un optimum fonctionnel au croisement des deux courbes.



**Figure 15 :** Mécanisme générant la courbe en « U » inversé en présence d'un récepteur GR (d'après [346]).

### c. La notion d'adéquation

Pourtant, les sécrétions en glucocorticoïdes ne sont pas toujours aussi optimales. La qualité de leurs actions pour la survie peut être modélisée par une courbe en « U » inversé (**Figure 16**). Des concentrations tissulaires insuffisantes en glucocorticoïdes lors de la confrontation à l'agresseur sont aussi néfastes que des concentrations excessives.



**Figure 16** : Effet des glucocorticoïdes selon leur concentration (adaptée d'après [422]).

Si les pathologies induites par les excès en glucocorticoïdes ont été largement décrites dans le cadre de l'allostase (immuno-suppression, athérosclérose, obésité, dépression et anxiété) [317-319], les pathologies secondaires à un hypofonctionnement de l'axe HPA commencent seulement à être isolées. Ces situations sont observées chez les patients en soins intensifs présentant une Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency (CIRCI, définie lors de la conférence de consensus de septembre 2005 à Paris) en plus de leur pathologie (chirurgie lourde ou sepsis) [426]. Il s'ensuit une augmentation du risque d'état de stress post-traumatique (PTSD) [426]. De la même manière, les sujets porteurs de PTSD, et présentant des symptômes psychosomatiques (nervosité, faible tolérance au stress, pertes mnésiques, hypersensibilité, irritabilité, hostilité, alexithymie, douleurs chroniques, conduites addictives), [187, 431, 541] présentent une moindre sécrétion en glucocorticoïdes. Tout se passe comme si la réaction corticotrope exigée par la pathologie dépassait les capacités de lutte du sujet. Cette rupture d'équilibre entre le nécessaire et l'existant à un moment donné appelle la notion de stress dépassé. Cette notion correspond à l'épuisement, ou troisième phase de Selye, quoique cela se fasse dans des conditions d'apparition différentes.

### ***III. Le stress cellulaire et les Heat Shock Proteins (Hsp)***

#### **A. Généralités**

La dénomination de protéines de choc thermique provient de leur première observation sur des cellules de glandes salivaires de drosophiles exposées à  $T_a=37^\circ\text{C}$  durant 30 min [395]. Depuis, de nombreuses autres conditions d'induction d'Hsp ont été découvertes, incluant des conditions physiologiques, pathologiques, environnementales [236] et même des conditions de stress psychologique [144, 151, 152, 213, 219, 381] (**Tableau 1**). Cet élargissement des stimuli d'induction conduit parfois à les qualifier de protéines de stress, terme plus général, amenant à les considérer comme une composante principale du stress cellulaire. Elles sont retrouvées dans la plupart des cellules, de la bactérie aux cellules de mammifères et abondent dans tous les compartiments subcellulaires. Leur structure hautement conservée dans la phylogénie leur confère un rôle fondamental dans les processus et la survie cellulaires.

De par la communauté de situations d'induction, la concomitance d'induction et la finalité de leur fonction, les protéines de stress représentent le pendant cellulaire de la réaction systémique à un agresseur.

**Tableau 1** : Conditions entraînant l'induction de l'expression des Hsp (adapté d'après [236]).

<i>Physiologiques</i>	<i>Pathologiques</i>	<i>Environnementales</i>	<i>Psychologiques</i>
Cycle et division cellulaires	Infection virale	Chaleur	Stress d'immersion dans l'eau
Facteurs de croissance	Infection bactérienne	Métaux lourds	Exposition à une situation
Différenciation cellulaire	Infection parasitaire	Inhibiteurs métaboliques	émotionnelle (prédateur...)
Développement tissulaire	Fièvre	Analogues des acides	Tâches d'apprentissage
Stimulation hormonale	Inflammation	aminés	
	Ischémie	Ethanol	
	Hypertrophie	Antibiotiques	
	Agents oxydants	radiation	

#### **B. Les différentes familles d'HSP**

Il existe différentes familles d'Hsp se différenciant par leur taille, leur localisation, leur fonction et leurs conditions d'expression (constitutives ou inductibles) [236, 244, 382].

**Tableau 2:** Les différentes familles d'Hsp et leur localisation cellulaire, fonction et conditions d'expression.

<i>Famille Hsp</i>	<i>Localisation</i>	<i>Fonction</i>	<i>Expression</i>
Hsp110/104	Cytosol, noyau	Conformation des protéines Thermotolérance Non ATP-dépendante	Constitutive et induite par le stress
Grp170	Réticulum endoplasmique	Chaperon moléculaire Importation des peptides du cytosol dans le RE	Induite par la déplétion en glucose et tout stress perturbant le RE
Hsp90	Cytosol, noyau, (GRP94)	Conformation transport des protéines Régulation de la transduction du signal (récepteurs aux glucocorticoïdes) Rôle anti- ou pro-apoptotique	Taux basal élevé Forte expression après stress
Grp94	Réticulum endoplasmique	Chaperon moléculaire Importation des peptides du cytosol dans le RE	Induite par la déplétion en glucose
Hsp70-1	Cytosol, noyau	Conformation des protéines Cytoprotection	Forme inductible
Hsp70-2	Cytosol, noyau	Conformation des protéines Cytoprotection	Forme inductible
Hsc70	Cytosol, noyau	Chaperon moléculaire	Forme constitutive
Grp78 ou BiP	Réticulum endoplasmique	Cytoprotection Chaperon moléculaire Importation des peptides du cytosol dans le RE	Constitutive et induite par la déplétion en glucose
Grp75	Mitochondrie	Translocation des protéines	Constitutive et induite par la déplétion en glucose
Hsp60	Mitochondrie Cytosol	Conformation des protéines Prévention de l'agrégation et de la dénaturation des protéines Pro- ou anti-apoptotique	Constitutive et induite par le stress
Hsp47	Réticulum endoplasmique	Translation et translocation du collagène	Constitutive et induite par le stress thermique
Hsp27	Cytosol, noyau lors du stress	Chaperon moléculaire Stabilisation du cytosquelette Anti-apoptotique Survie de la cellule après stress Non ATP-dépendante	Taux basal faible Forte expression après stress
Hsp10	Mitochondrie Cytosol	Co-facteur de HSP60 Conformation des protéines Transduction du signal anti-apoptotique	Synthétisée en réponse à l'ischémie
Ubiquitine	Cytosol, noyau	Dégradation des protéines	Synthétisée en réponse à l'ischémie

## ***1. La famille des Hsp110***

La famille des Hsp110, les plus largement exprimées après les Hsp70 et 90 [130], existe de manière constitutive principalement dans le cerveau et le foie. Ces protéines cytosoliques et nucléaires sont fortement induites lors du choc thermique (**Tableau 2**). Leurs fonctions sont complexes : (i) protection des ribosomes par leur association avec le site de chromatine nucléolaire (rDNA) ; (ii) maintien de la conformation des protéines en collaboration avec les Hsp70 [130, 529] ; (iii) maintien de la fonction cellulaire en hyperthermie et donc apparition d'une thermotolérance [364, 420]. De fait, cette famille est assez proche de la famille des Hsp70, par ses fonctions et par sa structure [130, 365, 529], même si elle s'en distingue par le caractère non indispensable de la liaison à l'ATP [365]. La « glucose-regulated protein » (Grp) 170 est une protéine homologue aux Hsp110, localisée dans le réticulum endoplasmique, et induite par des conditions de déséquilibre métabolique (déficit de glucose, d'O<sub>2</sub>, ionophores calciques, acidose) et la dénaturation des protéines [130]. Elle joue un rôle de « chaperon moléculaire » en interaction avec Grp78 et 94 [130].

## ***2. La famille des Hsp90***

La famille des Hsp90, abondamment exprimée de manière constitutive dans le cytosol (**Tableau 2**), inclut trois protéines, deux isoformes Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$  et la Grp94 [452, 547]. L'isoforme Hsp90 $\alpha$  est très inductible lors du stress thermique, alors que l'isoforme  $\beta$ , moins sensible à la chaleur, représente un composant constitutif majeur de la cellule, induit par la stimulation mitogénique [526]. La Grp94, induite lors d'un déficit cellulaire en glucose, joue un rôle de « chaperon moléculaire ».

En conditions physiologiques, les Hsp90 s'associent aux protéines impliquées dans la transduction du signal, notamment aux récepteurs nucléaires des stéroïdes GR [544]. Le complexe regroupant GR, Hsp70, Hsp90 et Hsp90/Hsp70-organizing protein (Hop) représente la forme inactive du GR en l'absence d'hormone agoniste. Lors de l'interaction ligand-récepteur, Hsp90 favorise l'affinité du récepteur à son agoniste [160, 544]. En condition de stress, les Hsp90 jouent un rôle de protection cellulaire puisque des niveaux élevés de protéines Hsp90 $\beta$  sont associés à une meilleure survie lors d'un stress thermique [185], mais également d'inhibiteur d'apoptose [154, 156, 272, 370, 424]. Les Hsp90 interviennent donc dans la signalisation des glucocorticoïdes lors du stress (inductible), mais également au repos (constitutif).

## ***3. La famille des Hsp70***

La famille des Hsp70, la plus largement exprimée, est composée de protéines constitutives (Hsc70 cytoplasmique, Grp78 réticulaire et Grp75 mitochondriale) et/ou inductibles (Hsp70 nucléaires) (**Tableau 2**). Ces protéines possèdent une structure à deux domaines fonctionnellement liés, une extrémité amino-terminale avec une activité ATPase et une extrémité carboxy-terminale se liant aux peptides [118]. Les Hsp70 inductibles sont codées par deux gènes (Hsp70-1 et Hsp70-2) localisés dans le complexe majeur d'histocompatibilité et leur homologie est telle que leurs produits ne sont pas distinguables [201]. Une

expression différentielle a toutefois été observée après une ischémie-reperfusion rénale chez le rat avec un seuil d'activation plus bas pour la Hsp70-2 et une induction prépondérante de la Hsp70-1 lors d'une ischémie sévère [4]. Un troisième gène inductible hsp70B' serait activé seulement à des températures extrêmes [270].

Les Hsp70 inductibles possèdent de nombreuses fonctions : (i) elles se lient aux protéines immatures ou dénaturées assurant un rôle de « chaperon moléculaire », les préservant d'une mauvaise conformation, agrégation ou perte de fonction. Cette activité ATP-dépendante est réversible puisque l'hydrolyse de l'ATP couple peptide et Hsp70 et la phosphorylation de l'ADP après 15 à 30 min de liaison libre à nouveau le peptide [316] ; (ii) elles limitent la production de radicaux libres en stimulant l'activité de la manganèse superoxide-dismutase (Mn-SOD) mitochondriale [473] ; (iii) elles inhibent l'apoptose par leur interaction avec « apoptosis-inducing factor » (AIF) [386, 407], « apoptotic protease-activating factor-1 » (apaf-1) [24, 25, 419] et c-Jun N-terminal Kinase (JNK1) [24, 374] ; (iv) elles jouent un rôle de transmetteur immunitaire du fait de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, passive par les cellules nécrosées [23] ou active par contraction musculaire [140, 144, 505] ou exocytose [252]. Ces Hsp circulantes se lient à des récepteurs spécifiques, incluant les Toll-like receptors (TLR) 2 et 4 [11]. Il en découle l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par laquelle la transcription des cytokines est stimulée [11]. Ainsi, les Hsp70 intracellulaires constituent un rempart énergétiquement coûteux pour maintenir les cellules fonctionnelles alors que les Hsp70 extracellulaires constituent des signaux de danger [382].

#### ***4. La famille des Hsp60***

Les protéines de la famille Hsp60, synthétisées dans le cytoplasme de manière constitutive sont transloquées dans la mitochondrie où elles favorisent le repliement des protéines monomériques et catalysent l'assemblage de complexes oligomériques (**Tableau 2**) [515]. Cette activité nécessite l'hydrolyse de l'ATP et d'autres co-facteurs (Hsp10 ou GroES et Grp75). Leur synthèse est induite par le stress spécifique de la mitochondrie (mitochondrial-specific stress response, MSR [549]), mais aussi par le stress thermique. Dans ce cas, elles jouent un rôle de « chaperon moléculaire » et modulateur de l'apoptose en association avec Hsp10 [118, 371].

#### ***5. La famille des Hsp47***

Les Hsp47, glycoprotéines se liant au collagène dans les fibroblastes [351], sont induites par le choc thermique [350]. Elles sont également exprimées de manière constitutive toujours en corrélation avec l'expression du collagène dont elles favorisent la formation de leur structure rigide en triple hélice [349] (**Tableau 2**). La stabilité de cette structure étant très sensible aux élévations de température, il n'est donc pas surprenant que Hsp47 soit induite par le stress thermique et qu'elle se lie à la structure pour prévenir sa déstructuration [348].

## ***6. La famille des Hsp27***

La famille des « small heat shock proteins » regroupe les protéines Hsp27 et l' $\alpha$ -crystalline, cytosoliques en conditions basales et nucléaires lors du stress [521] (**Tableau 2**). Ces « chaperons moléculaires » protègent les cellules de l'agrégation protéique sans recours à l'ATP, diminuent la quantité d'espèces radicalaires [325], stabilisent le cytosquelette [260] et préviennent l'activation des caspases [155]. Elles sont faiblement exprimées dans les conditions basales, mais leur synthèse, stimulée par les hormones stéroïdes [515], est fortement induite lors du choc thermique, du stress oxydatif et du contact avec les cytokines [371]. L'activation de ces Hsp27 représente donc une alternative énergétiquement peu coûteuse par rapport à l'expression d'Hsp70 en cas de stress chaud.

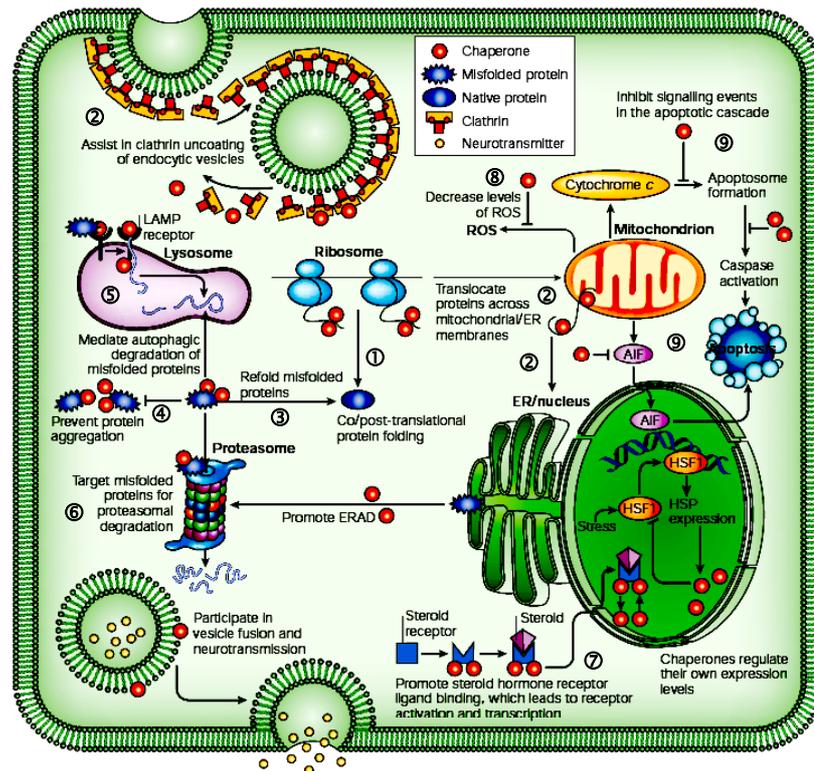
## ***7. La famille des Hsp10***

Les Hsp10 agissent comme co-facteur de Hsp60 en réponse à l'ischémie pour protéger les fonctions mitochondriales [103, 237]). Une action cytosolique pourrait être impliquée dans le repliement des protéines, les voies de signalisation et l'inhibition de l'apoptose [103] (**Tableau 2**).

# **C. Rôles des Hsp**

## ***1. Dans des conditions basales***

Les Hsp présentent une activité commune de « chaperon moléculaire » (**Figure 17**) : (i) conformation des polypeptides nouvellement synthétisés et assemblage des complexes de protéines ① ; (ii) transport des protéines entre les différents organites et à travers les membranes cellulaires ② ; (iii) reconformation des protéines dénaturées ③ ; (iv) prévention de l'agrégation des protéines lésées ④ ; (v) élimination des protéines se trouvant dans un état de dégradation irréversible par des mécanismes protéolytiques d'autophagie lysosomale ⑤ et de dégradation protéosomale ⑥ ; (vi) facilitation de la liaison des glucocorticoïdes aux GR ⑦ ; (vii) participation à la réduction des radicaux libres ⑧ ; (viii) implication dans les signaux apoptotiques ⑨.



**Figure 17** : Schéma de synthèse des effets régulateurs des chaperons moléculaires (Hsp) sur les principaux processus cellulaires (d'après [343]). AIF, apoptosis-inducing factor ; ER, endoplasmic reticulum ; ERAD, endoplasmic reticulum-associated degradation ; HSF-1, heat shock factor 1 ; HSP, heat shock protein ; LAMP, lysosomal-associated membrane protein ; ROS, reactive oxygen species.

## 2. Dans des conditions de stress

Dans des conditions de stress, la néosynthèse d'Hsp permet de faire face à l'augmentation des protéines dénaturées, ce qui implique un fort recrutement pour la prévention de l'aggrégation et la dégradation des protéines endommagées, ainsi que la lutte anti-radicalaire (**Figure 17**). Cette réponse de « stress cellulaire » peut être considérée comme une réponse de survie visant au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la cellule [139] dans des conditions de fonctionnement défavorables comme une température de 46°C [392, 486]. Le caractère énergétiquement coûteux place les Hsp dans la logique de l'allostase cellulaire avec la charge que cela suppose.

## 3. Dans le pré-conditionnement

L'accumulation de protéines Hsp après une première agression améliore la survie lors d'une agression ultérieure. Ce phénomène, appelé pré-conditionnement, survient suite aux agressions thermiques, locales ou systémiques [379] et chimiques [533, 534], aux traitements par antibiotiques [379] ou par herbimycine A [413] et même à l'exercice [66, 207, 359]. L'effet protecteur est observé vis-à-vis de l'hyperthermie, l'ischémie, le stress oxydant, les endotoxines, les cytokines (pour revue, [26, 215, 244]). L'efficacité de la

protection, corrélée à la sévérité de la pré-exposition, est transitoire : elle s'acquiert en quelques heures et ne dure que trois à cinq jours, cinétique correspondant aux cinétiques d'induction et de dégradation des protéines Hsp [253, 341].

#### ***4. Rôle de marqueur de lésions cellulaires***

Pour le chercheur, les Hsp peuvent être considérées comme des marqueurs de lésions cellulaires puisqu'il existe une relation étroite entre l'induction d'Hsp et l'étendue des lésions cérébrales dans des modèles d'ischémie cérébrale ou d'injection intra-cérébrale d'acide kaïnique [166]. Un niveau d'Hsp70 plus élevé est observé dans les organes présentant les lésions et dysfonctionnements les plus marqués [143]. Les deux points de vue de « protection cellulaire » *versus* « signe d'agression cellulaire », en apparence opposés, ne sont en réalité pas contradictoires mais peuvent conditionner l'interprétation du niveau d'expression d'Hsp.

### **D. L'induction des Hsp70**

Hsp70 est la forme inductible majeure des Hsp dont la synthèse est augmentée lors du stress jusqu'à devenir la protéine prépondérante dans la cellule. Cette induction requiert des facteurs de transcription et se produit en réponse à toute agression provoquant la dénaturation des protéines, stimulus principal d'induction (**Figure 18**).

#### ***1. Les facteurs de transcription du choc thermique : HSF***

L'induction des Hsp est médiée par quatre types de « heat shock factor » (HSF) régulés par divers signaux environnementaux et développementaux [421]. Les quatre HSF sont exprimés de manière constitutive et fonctionnent en coopération [340] : (i) HSF1 est un monomère possédant une longue demi-vie, inactif dans les conditions basales, et activé par différentes agressions ; (ii) HSF2 est une protéine de courte durée de vie, activée lors du développement embryonnaire et de la différenciation [421] ; (iii) HSF3 est un co-régulateur de HSF1 dont l'activation se fait à des seuils plus élevés que HSF1, la liaison à l'ADN est plus longue et la capacité d'activation de la transcription analogue à celle de HSF1 [421, 477]. Il affine donc la régulation de la réponse au choc thermique ; (iv) HSF4 est constitutivement lié à l'ADN [352, 421]. Son absence de propriétés d'activation de la transcription lui confère un rôle de modulateur négatif de la réponse de stress.

#### ***2. Mécanisme d'induction des Hsp70***

Dans les conditions normales, les Hsp90 et les Hsp70 sont liées aux HSF, les maintenant ainsi sous une forme inactive (**Figure 18**, ①). Les protéines dénaturées consécutives de l'agression tissulaire mobilisent les molécules chaperones Hsp70 et Hsp90, qui se détachent des HSF ②. Le clivage Hsp90-70/HSF conduit à la phosphorylation des HSF par une protéine kinase C, formant ainsi des trimères HSF ③. Cette forme active est ensuite transloquée dans le noyau et se lie au promoteur « Heat Shock Element »

(HSE) du gène Hsp70 stimulant ainsi la transcription. Une augmentation massive d'ARNm de Hsp70 et de protéines Hsp70 se produit alors dans les cellules agressées ④. Les Hsp70 se lient aux protéines dénaturées pour restaurer leur structure tertiaire ⑤.

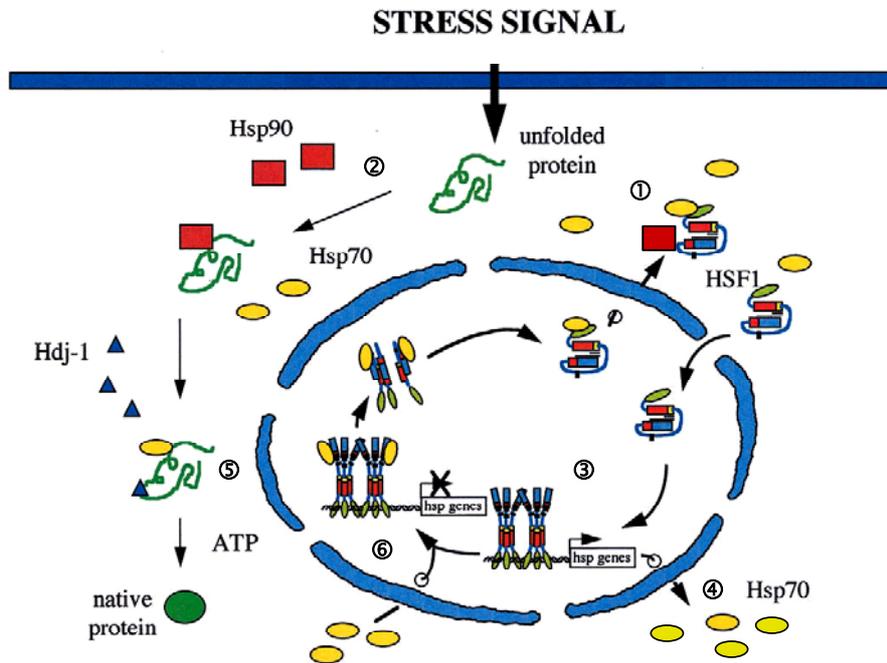


Figure 18 : Schéma simplifié de la régulation de l'induction des Hsp70 (d'après [421]).

### 3. Les signaux intracellulaires d'activation

Les signaux déclenchant l'augmentation de la protéine Hsp70 active, c'est-à-dire dans un état lui permettant d'agir contre les lésions créées par l'agression, peuvent intervenir à différents niveaux : HSF, gène Hsp70 et son promoteur HSE, transcription en ARNm, traduction en protéine, activation de la protéine, traduction à partir d'ARNm stabilisés pré-existants. Il existerait donc différentes voies d'activation selon l'étape concernée, le type d'agression appliquée, la région de l'organisme et le type de cellule concernée. Parmi ces voies d'activation, on peut citer : (i) les protéines kinases A et C [81], qui seraient la voie qu'emprunte le NO pour induire les Hsp [235] ; (ii) l'augmentation du calcium intracellulaire [234], même s'il a été montré que le calcium intracellulaire n'était pas essentiel à l'induction des Hsp [125] ; (iii) les protéines G favorisent l'induction des Hsp72 mais le mécanisme ne passerait pas par l'augmentation de la concentration en AMPc [234] ; (iv) la diminution du pH, mais qui ne serait pas indispensable à l'induction des Hsp [125, 234] ; (v) enfin, les prostaglandines de type A et J induiraient la synthèse d'Hsp70 en absence de stress [421].

#### **4. L'atténuation de la réponse des Hsp70**

L'atténuation de l'expression des Hsp70 se produit lorsque la synthèse des Hsp70 excède les besoins générés par les protéines dénaturées, les Hsp70 et d'autres « chaperons moléculaires » retournent dans le noyau pour se lier au domaine de transactivation transcriptionnelle des HSF1 et ainsi réduire la transcription des gènes hsp [501] (**Figure 18**, ©). L'atténuation de la réponse de choc thermique dépend également d'une protéine 1 de liaison au HSF1 (HSBP1), qui provoque la dissociation des trimères de HSF1 [421]. La trimérisation et la transactivation des HSF peuvent aussi être affectées par le pH, l'état du statut redox, la température et la phosphorylation [550, 551]. Les HSF4 sont considérés comme des régulateurs négatifs de la réponse de stress [352]. La dégradation des ARNm Hsp et des protéines Hsp constitue un autre moyen d'atténuation de la réponse : les ARNm Hsp70 contiennent au niveau de la partie non codante 3' une région riche en bases A et U (ARE), sensible au turnover rapide des ARNm. La liaison de protéines sur cette séquence ARE protège les ARNm durant la phase de réponse aiguë. Puis, dans une phase plus tardive, la dégradation de ces protéines favorise le déclin des ARNm [258].

### **E. Les interactions glucocorticoïdes-Hsp**

Le stress cellulaire induisant les Hsp s'inscrit dans un contexte de stress systémique impliquant la sécrétion de glucocorticoïdes, posant la question d'une interaction entre glucocorticoïdes et Hsp.

#### **1. L'effet potentialisateur des glucocorticoïdes**

En cas de stress aigu, les glucocorticoïdes facilitent l'induction des Hsp. Lors d'une ischémie, un pré-traitement en glucocorticoïdes augmente la quantité de protéines Hsp72 dans le cœur [488]. La dexaméthasone stimule la réponse Hsp72 dans les cellules épithéliales intestinales de rat lors d'un stress oxydant [487] et dans les cardiomyocytes [472]. La synthèse d'Hsp27 dans le cervelet est induite par l'injection de glucocorticoïdes et pourrait ainsi contribuer à la résistance du cerveau au choc thermique [22]. Lors de l'exposition d'un poisson à son prédateur, l'ajout de glucocorticoïdes augmente l'expression des ARNm Hsp70 dans le cerveau [219]. L'exposition de rat à un chat s'accompagne d'une élévation concomitante de la corticostérone plasmatique et des protéines Hsp72 dans le cerveau. L'adrénalectomie réduit l'augmentation d'Hsp72 [144]. Cette induction des Hsp par les glucocorticoïdes se ferait à deux niveaux : (i) au niveau transcriptionnel par l'activation des HSF [472] conduisant à l'augmentation des ARNm et, (ii) au niveau post-transcriptionnel par une augmentation de la stabilité des ARNm, mais aussi par la libération de protéines Hsp72 du complexe GR-Hsp90-Hsp72, se dissociant lors de l'arrivée de glucocorticoïdes [488].

En cas de stress chronique, les glucocorticoïdes atténuent l'induction des Hsp selon deux mécanismes potentiels. Deux semaines de traitement par dexaméthasone, agoniste GR, réduisent l'induction d'ARNm Hsp70 dans le cortex surrénal en réponse à un stress de contention mais aussi les niveaux d'ACTH et de corticostérone plasmatiques [484]. Des niveaux élevés chroniques de

glucocorticoïdes atténuent la synthèse de Hsp70 dans les hépatocytes de truite lors d'un choc thermique [36] selon un mécanisme de dégradation des GR par les protéasomes. Ceci sous-entend que les GR stimulent la réponse Hsp70 et que la réponse inhibitrice en chronique n'est que le fait d'artéfacts.

## ***2. L'effet inhibiteur des glucocorticoïdes***

Pourtant, un effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur l'expression des Hsp a été suggéré. La dexaméthasone inhibe l'activité de liaison de HSF1 sur le promoteur Hsp70 en réponse à un choc thermique ou chimique [503]. Ce mécanisme passerait par les GR car il est bloqué par l'antagoniste RU486 [502, 503]. Cet effet inhibiteur pourrait ne pas être contradictoire avec l'effet potentialisateur si l'on considère la concentration en glucocorticoïdes : l'effet différentiel des glucocorticoïdes se ferait entre l'état de base et le stress hyperthermique. Ainsi, les glucocorticoïdes stimuleraient la synthèse basale d'Hsp70 hépatique et l'inhiberaient lors d'un stress hyperthermique [101].



# **Hypothèses de recherche**



## I. Hypothèse du stress dans le CC

L'hypothèse d'une relation entre la genèse du CC et celle d'un syndrome de stress dépassé n'a jamais été clairement étudiée, ni même théoriquement posée. Nous faisons l'hypothèse d'une relation étroite entre le stress et la tolérance à la chaleur et, plus précisément entre l'émergence d'une intensité insuffisante de stress et du CC. Ce caractère dépassé adresse soit une insuffisance de protection par les Hsp70 (niveau cellulaire), soit une insuffisance de sécrétion en glucocorticoïdes (niveau systémique). Cette hypothèse s'appuie sur (i) l'analogie entre les deux situations physiopathologiques, (ii) le rôle des glucocorticoïdes et des Hsp70 dans la tolérance à la chaleur et plus précisément la survenue du CC.

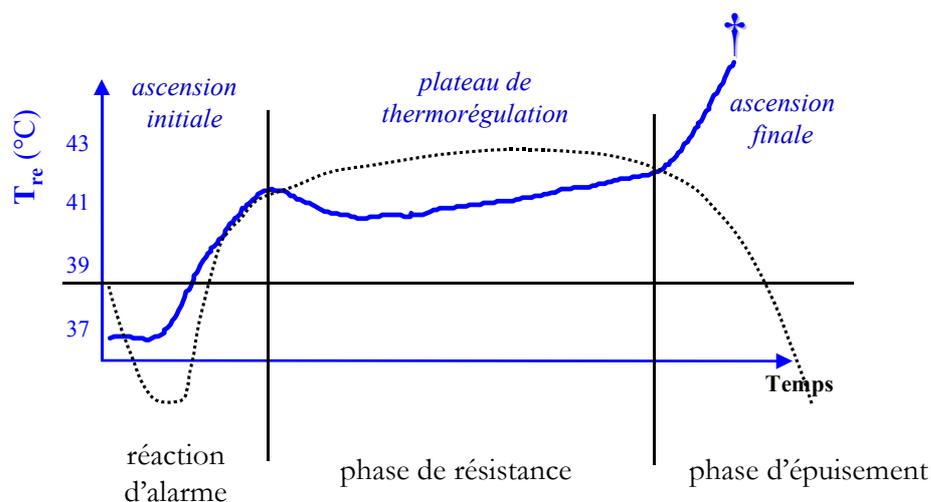
Nous avons donc regroupé dans ce chapitre (i) les hypothèses de recherches, (ii) les arguments liant au CC, le stress, les glucocorticoïdes et les Hsp, (iii) les objectifs du travail expérimental.

## II. Etude bibliographique des interactions entre stress et chaleur

### A. Relation clinique entre stress et CC

#### 1. L'analogie des décours temporels

Il existe une analogie frappante entre le décours d'évolution de  $T_{co}$  lors d'une exposition à la chaleur et celui du « syndrome général d'adaptation » décrit par Selye [434]. Pour la majorité des animaux, l'évolution de la  $T_{co}$  lors d'une exposition à la chaleur se fait en trois phases (**Figure 1**), comme l'évolution de la résistance de l'organisme face à un stresser selon le « syndrome général d'adaptation » (**Figure 3**).



**Figure 19 :** Comparaison de l'évolution de la résistance à un stresser selon le « syndrome général d'adaptation » de Selye (en noir) et de l'évolution de la  $T_{co}$  de type III à la chaleur (en bleu). †, décès.

La phase initiale d'élévation de  $T_{co}$  pourrait correspondre à la réaction d'alarme. La phase de plateau de  $T_{co}$  pourrait être assimilée à la phase de résistance, régulée. Puis la phase finale de brusque augmentation non régulée de la  $T_{co}$  pourrait coïncider avec la phase d'épuisement dans laquelle la charge thermique, trop importante, déborde les capacités de thermorégulation de l'organisme (**Figure 19**). Ainsi, il est particulièrement frappant d'observer une telle concordance entre l'évolution de la  $T_{co}$  lors d'une exposition à la chaleur et le modèle de stress développé par Selye.

## ***2. L'analogie de variabilité inter-individuelle***

Au-delà de cette coïncidence temporelle entre stress et CC, il existe une coïncidence frappante, celle de l'extrême variabilité inter-individuelle de la réponse. Celle-ci s'exprime par la grande variabilité des temps de tolérance à la chaleur [135, 366, 525]. Cette réponse correspond à ce qui est observé dans le stress. Il existe en effet d'énormes différences inter-individuelles dans les réponses aux situations stressantes, en raison (i) des différences de perception et d'interprétation de la situation et (ii) des différences de conditions physique et physiologique de l'organisme. Par exemple, une perception accrue du caractère stressant d'une situation peut se caractériser par une forte sécrétion de glucocorticoïdes. Un état de déséquilibre métabolique rend plus vulnérable aux agressions avec une augmentation du risque de développement de pathologies [319].

## ***3. La valeur du coup de chaleur***

La comparaison entre les courbes d'évolution thermique et d'adaptation laisse entrevoir une analogie entre exposition au chaud et stress, mais aussi CC et épuisement. Cette caractérisation soulignée par l'évolution thermique peut être systématisée. L'exposition à la chaleur s'inscrit dans un contexte de stress avec mobilisation de l'axe HPA et activation du stress cellulaire par la synthèse d'Hsp70. Il semble donc exister un véritable fonctionnement allostasique de l'organisme au chaud dont le coût apparaît par le biais de la durée du plateau de thermorégulation. Par ailleurs, le CC se traduit par la perte des régulations cardiovasculaire, thermique et l'apparition d'un déséquilibre métabolique, culminant dans des lésions. Ce tableau suggère qu'il existe une perte du mode de fonctionnement allostasique induit par la chaleur lors du CC.

# **B. Relations entre glucocorticoïdes et chaleur**

## ***1. La sécrétion de glucocorticoïdes dans le CC***

Très peu d'études rapportent les variations de corticostérone plasmatique au cours d'une exposition à la chaleur.

Chez l'homme, une étude prospective clinique menée sur 172 patients admis dans les 6 heures après le début du CC révèle que le niveau de cortisol dans les 24 heures suivant le CC est corrélé à la sévérité des déficits neurologiques évaluée par la Scandinavian Stroke Scale [93].

Chez le chien exposé à  $T_a=45^\circ\text{C}$  durant 4 heures ou jusqu'au CC ( $T_{re\ max}=43^\circ\text{C}$ ), l'augmentation du cortisol n'est significative qu'après 1 heure d'exposition mais se prolonge durant 5 heures. Les niveaux de base ne sont retrouvés que 24 heures après la fin de l'exposition [12]. Les niveaux de cortisol sont alors corrélés à la sévérité de l'agression thermique. Un état de stress est également observé chez le rat exposé passivement au chaud ( $T_a=40^\circ\text{C}$ ). La corticostérone plasmatique s'élève dès 30 min après le début de l'exposition ( $163\ \text{ng.mL}^{-1}$ ) et se poursuit à 60 min d'exposition ( $312\ \text{ng.mL}^{-1}$ ) [99]. La même augmentation de corticostéronémie est observée chez des rats exposés à  $T_a=38^\circ\text{C}$  durant 20 min ( $550\ \text{ng.mL}^{-1}$ , [124] et 60 min ( $775\ \text{ng.mL}^{-1}$  [240], et  $780\ \text{ng.mL}^{-1}$  [124]). Chez la souris exposée à  $T_a=39,5^\circ\text{C}$  jusqu'à l'atteinte d'une  $T_{co}=42,7^\circ\text{C}$ , la corticostérone plasmatique est augmentée et le reste après 2 heures de récupération, alors que l'hypothermie succédant à l'hyperthermie est maximale [266].

Il émerge donc que la corticostérone augmente après une exposition prolongée à la chaleur. Cette élévation est rapide, probablement dans les 10 min. Elle dure sous le maintien de la contrainte, et de hauts niveaux de corticostérone sont souvent encore retrouvés après la fin de l'exposition à la contrainte. Cette cinétique d'évolution de la corticostérone au cours de l'exposition à la chaleur est en accord avec celles observées lors d'un stress de contention prolongé (3 heures) [453]. En revanche, elle diffère de celle rencontrée lors d'un stress aigu de très courte durée (15 min au maximum) lors duquel on observe un pic d'augmentation de la corticostérone dès 10 min après stress suivi d'un retour à des taux de base 30 à 60 min après stress [64, 112, 329, 494].

## ***2. Les effets physiologiques des glucocorticoïdes dans le CC***

Les glucocorticoïdes témoignent d'un effet protecteur dans le CC en dépit de discordances qui tiennent souvent à une méconnaissance de la complexité de l'action des glucocorticoïdes.

Chez l'homme, l'administration de corticostéroïdes n'améliore pas la survie des patients atteints de CC, quoique cette absence d'effet bénéfique puisse être expliquée par une administration trop tardive du traitement [13].

Chez le primate, un traitement avec un corticostéroïde, MPSS (methylprednisolone sodium succinate), effectué avant exposition à la chaleur réduit la translocation digestive des lipopolysaccharides (LPS) et les taux de LPS plasmatiques, améliore les paramètres cardio-vasculaires [159] et *in fine*, augmente la survie [157] lors du CC. Cependant, la dexaméthasone administrée juste avant l'exposition à la chaleur et au cours de la récupération ne prévient pas l'apparition du CC chez le babouin et aggrave même les lésions tissulaires et la défaillance multi-organique [42]. Ceci s'explique par l'effet complexe de la dexaméthasone, jouant un rôle synchronique d'agoniste GR et inhibant l'axe HPA de manière diachronique.

Chez le rat, un traitement avec la dexaméthasone, un agoniste GR, avant exposition à la chaleur améliore la survie après un stress thermique sévère et limite l'augmentation des enzymes hépatiques, de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et du LPS plasmatiques [276, 291]. Il contribue à la protection du cerveau grâce à une

réduction de l'hypotension artérielle et de l'ischémie cérébrale. Il en ressort une réduction des lésions neuronales et une amélioration de la survie [291].

## C. Relations entre expression d'Hsp et chaleur

### 1. *L'induction de la réponse*

#### a. *Les inducteurs potentiels*

A la différence des glucocorticoïdes, une masse importante de littérature existe sur les relations entre Hsp et chaleur. Cependant, rien ne permet d'affirmer que la chaleur agit par elle-même. L'agression thermique induit dans les cellules une acidose, une diminution de la quantité d'ATP et une augmentation du calcium cytosolique, une augmentation de l'AMPc intracellulaire, une activation des protéines kinases. Cependant, tous ces changements ne semblent pas être nécessaires ni suffisants d'eux-mêmes pour activer la réponse de stress cellulaire [515]. La variation de pH et de concentration d'AMPc ne seraient pas nécessaires à l'induction des Hsp [234]. De plus, l'abaissement du pH intracellulaire ou l'augmentation de calcium cytosolique ne conduisent pas nécessairement à des variations significatives d'expression des protéines Hsp [125]. En revanche, l'accumulation intracellulaire de protéines dénaturées apparaît être le mécanisme essentiel de la réponse de choc thermique [515].

#### b. *Spécificités de l'induction*

##### ➤ Spécificité selon le tissu et le type cellulaire

##### • *Dans l'organisme*

Le seuil d'induction et la cinétique d'expression des ARNm Hsp à la chaleur est dépendante du tissu considéré. Dans le cerveau, les poumons et la peau, l'induction des ARNm Hsp70 apparaît après seulement 35 min d'exposition à  $T_a=40^\circ\text{C}$ , mais elle est transitoire puisque les niveaux de base sont retrouvés dans les 3 à 6 heures après la fin de l'exposition [32]. Dans le foie, la cinétique d'expression des ARNm Hsp70 est différente : les ARNm ne sont observés que lors d'une exposition à  $T_a=37,5^\circ\text{C}$  pendant 90 min. Lors d'une exposition à  $T_a=40^\circ\text{C}$ , une augmentation significative des ARNm Hsp70 n'est observée qu'après 6 heures de récupération et non à 1 et 3 heures [32]. L'expression des ARNm Hsp dépend sans doute du tissu considéré, mais les différences de conditions d'exposition au chaud (durée et  $T_a$ ) biaisent l'interprétation.

Une augmentation des protéines Hsp72 est observée dans le foie, l'intestin grêle et les reins et non dans le quadriceps et le cerveau chez des rats exposés passivement à la chaleur [143]. Là encore, les conditions d'exposition influencent l'expression des protéines. Une élévation plus rapide de la température entraîne une expression plus importante des protéines Hsp72 dans le foie, alors même que la charge thermique est plus faible [143]. Lors d'une pré-induction de protéines Hsp72 par choc thermique ( $T_{co}=42^\circ\text{C}$  pendant 15 min), leur expression est augmentée après 4 heures, est maximale entre 8 et 16

heures et retrouve des valeurs de base après 48 heures, dans toutes les régions de l'organisme analysées (striatum, cortex, hypothalamus, cœur, foie, reins) [534].

Les différences de seuil d'induction et de cinétique d'expression des ARNm et protéines Hsp peuvent refléter une différence de susceptibilité des organes à la chaleur, mais aussi une différence de conditions d'exposition. L'étude de la différence de vulnérabilité d'organes à la chaleur impose donc une exposition finement calibrée.

- **Dans le cerveau**

Cette spécificité tissulaire d'induction existe également au sein du SNC selon la région cérébrale. Des niveaux plus élevés d'ARNm et de protéines Hsp70 sont observés dans le cervelet en comparaison à l'hippocampe chez le rat [312]. Cette spécificité est même retrouvée selon le type cellulaire, et voire au sein d'un même type cellulaire [377]. Les cellules gliales expriment des ARNm Hsp70 après une heure d'hyperthermie, alors que les cellules neuronales ne présentent une élévation des ARNm Hsp70 qu'après 10 heures dans le cervelet de lapin [307]. Ce délai d'expression des neurones serait dû à la présence de protéines Hsc70, réduisant l'activation des HSF [307]. Parmi les cellules gliales, les oligodendrocytes sont plus réactifs que la microglie et les astrocytes ne répondent pas à l'hyperthermie [148]. Parmi les cellules neuronales, certaines seraient régulées au niveau de la transcription alors que d'autres répondraient à une agression thermique seulement au niveau post-transcriptionnel [218]. Enfin, il faut prendre en compte les interactions entre cellules gliales et neuronales : *in vitro*, les cellules gliales peuvent libérer des protéines Hsp70 dans le milieu extracellulaire qui peuvent être capturées par les neurones et ainsi contribuer à leur protection [172].

- Spécificité due à l'état de conscience : animal vigile *vs* anesthésié

Après 4 heures d'exposition de rats vigiles à la chaleur ( $T_a=38^\circ\text{C}$ ), les protéines Hsp70 sont fortement augmentées dans toutes les régions du cerveau. Cette expression n'est en revanche pas observée chez l'animal anesthésié [520], suggérant que la conscience de la situation stressante joue un rôle important dans l'induction des Hsp. La chaleur *per se* n'est pas le seul facteur responsable des dommages cellulaires dans le SNC.

- Spécificité due à l'activité physique

La différence de vulnérabilité reflète à la fois la contrainte thermique et la contrainte fonctionnelle locale. Ainsi, l'accumulation de protéines Hsp70 dans les muscles locomoteurs et le tissu cardiaque est plus importante lorsque l'exposition à la chaleur est couplée à une activité physique, pour de même niveau de  $T_{co}$  [459]. Cet effet serait attribuable à des changements physiologiques propres à l'exercice tels que la déplétion en ATP et en glycogène, l'acidose, la production de radicaux libres, potentiels inducteurs des Hsp70 [459].

### ➤ Spécificité due à l'âge

L'âge est un facteur influençant l'induction des Hsp puisque la synthèse des Hsp en réponse à diverses agressions est réduite chez les animaux âgés. L'induction d'ARNm Hsp70 dans le cortex surrénalien en réponse à un stress de contention décline avec l'âge [33]. L'induction d'ARNm Hsp70 dans l'hippocampe de rats âgés en réponse à l'hyperthermie est atténuée dans les neurones, mais pas dans les cellules gliales en comparaison à des rats adultes [372]. La variabilité de réponse selon type cellulaire se retrouve ici amplifiée par le vieillissement.

## ***2. Les effets physiologiques des Hsp à la chaleur***

### *a. Pré-induction d'Hsp et chaleur*

Le pré-conditionnement par pré-induction d'Hsp est en étroite relation avec la chaleur. La chaleur peut être utilisée comme stimulus de pré-induction et représente aussi l'agresseur potentiel ultérieur contre lequel le pré-conditionnement est destiné à lutter. Dans ce dernier cas, la pré-induction d'Hsp participe à l'acquisition de la thermotolérance.

Voici quelques exemples de pré-conditionnement impliquant la chaleur : une pré-induction par stress thermique ou chimique atténue l'hypotension artérielle, l'ischémie cérébrale, l'accumulation de dopamine et sérotonine et les dommages cellulaires provoqués par le CC [534]. Cet effet protecteur serait médié par la limitation du stress oxydant et de la déplétion énergétique [508]. Dans les cellules épithéliales, une pré-exposition à la chaleur induit des Hsp70. Lors d'une exposition ultérieure (48 h) à la chaleur, cette induction est associée à l'atténuation de la perméabilité des cellules épithéliales et l'amélioration de la survie cellulaire [341]. La pré-induction de protéines Hsp72 par l'exercice (course de durée et d'intensité croissante pendant 1 à 3 semaines) est associée à une protection contre le CC, caractérisée par une atténuation de l'hyperthermie, du choc cardio-vasculaire et de la production de TNF- $\alpha$  sérique et tissulaire [207]. Une hyperthermie locale modérée réalisée 24 heures avant une ischémie-reperfusion sur un membre postérieur induit l'expression d'Hsp70 et améliore la survie du muscle squelettique [268]. Une hyperthermie globale s'avère aussi protectrice contre les dommages créés par une ischémie reperfusion au niveau du muscle cardiaque [100, 269]. Des cellules cardiaques en culture (myoblastes et myocytes H9c2) sont capables d'acquérir une résistance à un stress oxydant modéré (peroxyde d'hydrogène) après pré-conditionnement par stress thermique. L'induction d'Hsp70 contribuerait largement à la mise en place des défenses cellulaires anti-oxydantes [470, 471].

### *b. Rôle des Hsp dans la tolérance à la chaleur*

Toutes ces études de pré-induction montrent clairement que la surexpression d'Hsp est protectrice face à la chaleur, ce qui n'est pas surprenant compte-tenu du rôle précédemment décrit des Hsp (III.C., page 64). Chez des sujets naïfs, les niveaux d'expression de base des protéines Hsp jouent-ils le même rôle protecteur ? On peut penser que des niveaux d'Hsp constitutifs élevés soient favorables à la lutte contre

l'hyperthermie. Ceci est soutenu par la présence d'anticorps anti-Hsp70 en relation avec la sévérité du CC chez l'homme [511, 527]. Mais très peu d'études existent dans ce domaine.

### ***III. Objectifs de la thèse***

#### **A. Objectifs généraux**

L'hypothèse d'une relation entre stress et risque de CC suppose une démarche expérimentale en deux temps. Dans un premier temps, le rôle différentiel du stress cellulaire (Hsp) et du stress systémique (glucocorticoïdes) doit être évalué dans l'émergence de l'intolérance à la chaleur et donc du risque de CC. Les questions qui se posent sont donc : Existe-t-il une relation entre la qualité de la réaction systémique (sécrétion glucocorticoïdes) et l'intensité de la réaction cellulaire (expression Hsp) ? Quelle valeur accorder aux variations d'expression d'Hsp lors d'une exposition à la chaleur ? S'agit-il d'une marque de bonne tolérance ou au contraire de lésions ?

Dans un second temps, il convient d'évaluer les relations entre la tolérance à la chaleur et qualité du stress. En d'autres termes, quel est le statut de stress des animaux dont la tolérance à la chaleur est la plus mauvaise ? Les animaux les moins tolérants sont-ils les plus stressés ? Ceux dont l'activation de l'axe HPA est la plus forte ou la plus faible ?

#### **B. Présupposés théoriques**

Ces objectifs imposent un certain nombre de contraintes théoriques sous-jacentes à l'évaluation du rôle du stress dans la tolérance à la chaleur.

##### ***1. La naïveté des individus***

Pour juger du rôle du stress dans la tolérance à la chaleur, nous nous sommes placés dans des conditions naturelles, utilisant l'exposition thermique comme un stressor aigu. Ceci exclut tout pré-conditionnement ou toute plasticité de la sécrétion des glucocorticoïdes.

##### ***2. La dynamique de la réponse***

Lors de l'exposition au stressor thermique, nous devons considérer qu'il existe une cinétique d'évolution de la charge allostasique qui augmente avec le temps. Cette charge est l'intégration de l'émergence de facteurs délétères (hyperthermie, coût énergétique, inflammation) induits par l'exposition au stressor thermique et de facteurs protecteurs réactifs de l'organisme (Hsp, glucocorticoïdes). Cette charge allostasique est le coût biologique de la balance s'établissant entre les facteurs délétères et les facteurs protecteurs et permettant à l'individu, et à ses cellules constitutives, de fonctionner loin des zones de fonctionnement économique.

### ***3. La tolérance à la chaleur comme marqueur de la charge allostasique***

La tolérance à la chaleur peut être définie comme la capacité de survivre en environnement chaud au prix d'une charge allostasique faible. Inversement, l'intolérance à la chaleur se définit comme l'incapacité de survivre longtemps à un environnement chaud du fait de l'importance de la charge allostasique. Exprimée en terme de contrainte, l'intolérance à la chaleur se traduit par un niveau élevé des pressions physiologiques induit par les facteurs délétères, en pratique des niveaux de  $T_{co}$  élevée. Il existe donc une étroite relation entre tolérance à la chaleur, forte pression des facteurs délétères et charge allostasique. Le sujet intolérant est alors celui dont la balance se déséquilibre rapidement en faveur des facteurs délétères, soit par une apparition trop rapide des facteurs délétères, soit par des réponses protectrices insuffisantes. Un individu intolérant est donc celui qui développera le plus rapidement les signes cliniques pathologiques (hyperthermie, déshydratation, activation de la neurotransmission et métabolique) préfigurant la symptomatologie du CC.

### ***4. La variabilité inter-individuelle***

Cette variabilité individuelle de la tolérance à la chaleur nécessite de recourir à l'exposition au stress pour déterminer *a posteriori* les animaux tolérants et les animaux intolérants. L'exposition au stress doit donc être calibrée afin que la différence de réponse puisse être reliée à une différence inter-individuelle de gestion de la charge allostasique. Sous cette condition, il devient possible de répondre à la question : Pourquoi pour un même niveau de contrainte un individu va développer un CC et d'autres non ?

## **C. Critères de jugement d'intolérance**

La nécessité de déterminer une intolérance face à la chaleur suppose des critères de jugement fiables. Les critères suivants peuvent être ainsi proposés.

### ***1. Les critères du risque léthal***

La présence d'un risque léthal peut être déterminée par l'évaluation de la sévérité de l'hyperthermie, laquelle est représentée par la charge thermique ou aire sous la courbe de  $T_{co}$  (AUC) calculée en °C.min [203]. Les animaux dont la charge thermique dépasse un certain seuil calculé par Hubbard présentent un risque léthal. L'AUC est calculée au dessus d'une valeur de  $T_{co}$  de 40,4°C ( $AUC_{40,4}$ ) car cette  $T_{co}$  correspond à l'apparition d'un risque de mortalité dans les 24 heures qui suivent l'exposition de rats actifs à la chaleur. Les animaux à l'exercice dont l' $AUC_{40,4}$  est positive présentent donc un risque léthal. Sur cette base de calcul d'AUC, un autre point de rupture a été défini par Hubbard chez les rats exposés passivement à la chaleur : le risque de mortalité apparaît chez eux lorsque l' $AUC_{40,4}$  excède les 20°C.min. Ainsi, dans nos

conditions expérimentales (exposition passive à la chaleur), la valeur d'AUC<sub>40,4</sub> de 20°C.min peut être considérée comme le seuil au delà duquel un risque léthal apparaît.

## ***2. Les critères du CC avéré***

Les critères de CC avéré sont définis par (i) le coma, caractérisé par l'incapacité de l'animal à se redresser lorsqu'on le retourne sur le dos [203] et (ii) l'augmentation brutale et terminale de la T<sub>co</sub>, se terminant par un niveau de T<sub>co</sub> final ou CTM de 44,2°C chez le rat [135]. En regard de la considération éthique, nous fixons un point limite d'arrêt d'exposition à la chaleur lors de (i) l'observation d'un état inconscient de l'animal ou (ii) l'atteinte d'une T<sub>co</sub> de 43°C.

## ***3. Les critères de l'émergence pathologique***

L'apparition de signes pathologiques cohérents avec ceux observés dans le CC représente un facteur d'intolérance à la chaleur en dépit de l'absence de critère majeur de CC. Parmi ces signes, il faut citer : (i) T<sub>co</sub> et charge thermique élevées, (ii) déshydratation (hématocrite élevé, concentration plasmatique de protéines élevée), (iii) altérations métaboliques (lactatémie élevée, recrutement des triglycérides), (iv) syndrome inflammatoire (élévation des IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), (v) comportement aberrant (forte activité locomotrice).

## **D. Démarche expérimentale**

La démarche expérimentale s'est effectuée en deux temps.

Le premier temps a débuté par une analyse théorique des conditions techniques d'expérimentation, définissant (i) les variables rendant compte de l'activité cérébrale, de la charge calcique cérébrale et de l'inflammation cérébrale, (ii) les conditions de détermination d'un déficit de sécrétion en glucocorticoïdes. Une pré-expérimentation a été pratiquée afin de préciser les conditions expérimentales : efficacité de la méthode pharmacologique de déplétion en glucocorticoïdes, validité de la durée d'exposition à la chaleur, validité des critères de jugement, la réalité de la réaction Hsp et glucocorticoïdes dans notre modèle.

Dans un deuxième temps, deux modèles expérimentaux d'exposition de rats naïfs et vigiles à un environnement chaud sont mis en place. Le premier utilise conjointement la métyrapone et des durées d'exposition à la chaleur croissantes afin d'obtenir à la fois le pied de courbe d'induction des ARNm Hsp70 et une grande étendue de charges thermiques (expérimentation 1 : « métyrapone et tolérance à la chaleur »). Le deuxième place tous les animaux dans une situation similaire (même durée d'exposition à la chaleur) en s'affranchissant de toute autre contrainte potentiellement stressante afin de mettre en évidence les variabilités inter-individuelles (expérimentation 2 : « stress et tolérance à la chaleur »). C'est sur le second modèle que seront plus particulièrement analysés les éventuels mécanismes activés dans le cerveau.



# **Pré-requis scientifiques, techniques et expérimentaux**

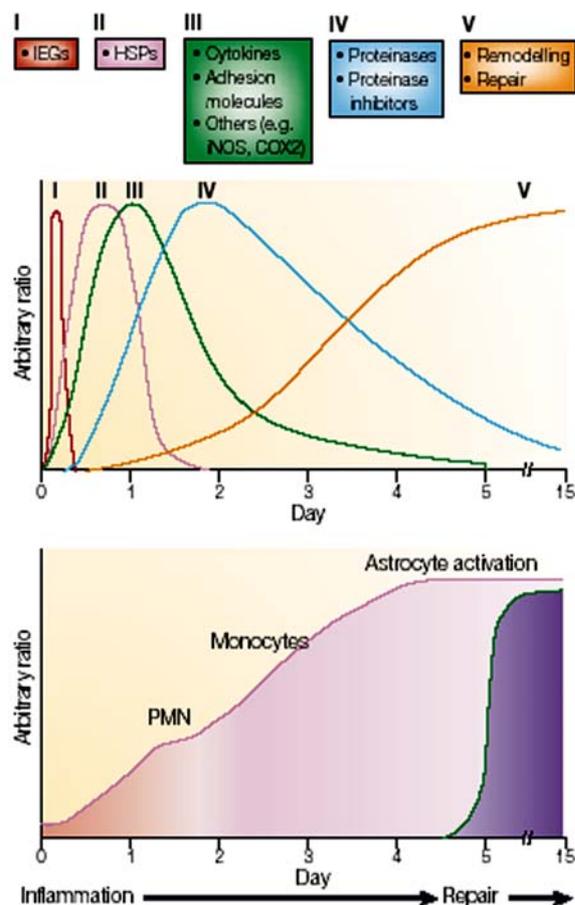


# I. Pré-requis scientifiques et techniques

## A. Introduction

L'objectif étant d'approfondir les caractéristiques de la vulnérabilité à la chaleur au niveau cérébral, nous avons besoin de marqueurs pertinents concernant les signes précoces d'activation cellulaire, de stress cellulaire et de l'activation des processus inflammatoires.

Pourtant, cette recherche de marqueurs se heurte à de sérieuses difficultés de cinétique. Le schéma ci-dessous (**Figure 20**) décrit le déroulé temporel de l'induction des médiateurs impliqués dans l'ischémie cérébrale, avec dans l'ordre d'apparition les protéines IEGs, les protéines Hsp et les protéines cytokines. On peut supposer que les ARNm suivent ce même ordre d'apparition avec un déroulé temporel plus court et plus précoce. Ceci suggère que pour un moment de dosage précis, il est difficile d'avoir les pics d'expression des trois ARNm IEGs, Hsp et cytokines.



**Figure 20 :** Patron d'expression des cytokines et autres médiateurs impliqués dans l'ischémie cérébrale (d'après [6]).

## B. Les premiers signes d'activation cellulaire

C-fos, c-jun et EGR1 font partie du groupe de proto-oncogènes nommés « immediate early genes » (IEGs). Leur activation répond aux signaux externes de manière directe et ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines. L'induction est donc rapide et transitoire. Ils représentent ainsi de bon marqueurs de l'activation cellulaire.

### 1. Les marqueurs utilisés

#### a. *c-fos*

L'expression de c-fos est induite par : (i) les neurotransmetteurs (glutamate, dopamine, sérotonine), (ii) la dépolarisation membranaire et l'augmentation des flux calciques [205, 243, 519], (iii) l'activation de protéines kinases [14, 243].

L'expression constitutive des protéines et des ARNm c-fos dans le cerveau de rat est très faible [98, 192, 205]. En condition de stress psychologique, les ARNm c-fos sont induits en quelques minutes, présentent un pic entre 30 et 60 minutes et retournent à des valeurs de base 120 min après le stress [98, 369]. En condition de stress métabolique (ischémie cérébrale transitoire), l'expression des ARNm c-fos dans le cortex est multipliée par 62 une heure après ischémie et retrouve des valeurs de base 6 heures après [510]. L'absence d'expression basale, la grande réactivité à la stimulation cellulaire, la courte demi-vie (10-15 min) des ARNm c-fos et le contrôle précis de l'expression des IEGs [243] en font un marqueur réactif dépendant de la durée de la contrainte.

#### b. *c-jun*

Les mécanismes d'induction de c-jun ressemblent étroitement à ceux de c-fos, quoiqu'ils ne soient pas couplés [14]. Les deux gènes sont induits par le facteur de croissance, alors que c-jun est peu activé par les protéines kinases et pas du tout par la dépolarisation membranaire [14]. Enfin, contrairement à c-fos, la protéine c-jun auto-régule positivement la transcription de son gène, prolongeant les signaux transitoires générés par l'activation de PKC [7].

Contrairement à celle de c-fos, la protéine c-jun et les ARNm de c-jun sont présents à des niveaux élevés dans l'hippocampe et le cortex de rat [98, 192, 205]. Lors d'une exposition au stress, il semble que les patrons d'expression de c-fos et c-jun soient très ressemblants [98].

#### c. *Early growth response-1 (EGR1)*

Le gène EGR1 fait partie des IEGs. Il est induit par des modifications de l'environnement cellulaire (variations de la pression osmotique, choc thermique, hypoxie, agents dénaturants de l'ADN), l'activation de la neurotransmission (récepteurs muscariniques cholinergiques [225],  $\alpha_2$ -adrénergiques [225], bradykininergiques [225], dopaminergiques [30] et sérotoninergiques [30]), les cytokines et les hormones

[126]. L'induction d'EGR1 implique les voies de signalisation de diverses kinases comme PKC/ERK [126, 432].

Les ARNm EGR1 présentent une forte expression constitutive dans le cerveau [98, 200, 369, 510], causée par les influx de noradrénaline et sérotonine [30]. Lors d'un stress psychologique l'expression des ARNm EGR1 augmente dans le PVN, le cortex et l'hippocampe 15 à 30 min après le début du stress (nouveau [369]). Lors d'un stress métabolique (ischémie cérébrale transitoire), l'expression des ARNm EGR1 culmine une heure après la reperfusion et retourne aux valeurs de base 6 heures après. Le patron d'expression des ARNm d'EGR1 ressemble donc à celui de c-fos [200, 369].

## ***2. Relation glucocorticoïdes-IEGs***

Lors d'un stress, il se produit de manière concomitante une activation de l'axe HPA et une activation cellulaire avec production d'IEGs. Ces deux activations peuvent entrer en interaction, obscurcissant la valeur de marqueur d'activation cérébrale jouée par les IEGs. Des niveaux élevés de glucocorticoïdes circulants inhibent l'expression de c-fos induite par le stress dans le PVN [243]. L'implantation de « pellet » de corticostérone pendant 7 jours conduit à un résultat similaire : l'expression des IEGs est inhibée de façon dose dépendante, sauf pour EGR1 [485]. L'adrénalectomie supprime l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes en cas de stress d'immobilisation pour c-fos et c-jun, mais pas pour EGR1 [439]. La dexaméthasone réduit l'expression de c-fos induite par le stress dans le cortex [323]. Ceci suggère que l'inhibition des glucocorticoïdes sur les IEGs passe par l'activation GR, en particulier par les interactions protéine-protéine entre les facteurs de transcription AP-1 et les GR, comme les promoteurs des gènes c-fos et c-jun possèdent un site AP-1 (II.C.3.a, page 51). La différence entre c-fos, c-jun et EGR1 s'explique sans doute par un double mécanisme dépendant indirectement des glucocorticoïdes *via* d'autres facteurs de transcription (Stat5, Fos, Jun, CREB et NF- $\kappa$ B), mais aussi des MAPK [390]. En conclusion, l'effet inhibiteur dominant des glucocorticoïdes sur l'activation cellulaire n'est pas surprenant compte-tenu de son rôle global d'inhibiteur dans la régulation du stress. La différence d'impact des variations de glucocorticoïdes sur l'expression des trois IEGs impose l'analyse concomitante des trois IEGs, dont la signification est différente.

## ***3. Valeur des IEGs comme marqueurs d'activation cellulaire***

L'utilisation des IEGs comme marqueurs d'activation cellulaire comporte certaines limites. Une absence d'augmentation des IEGs ne signifie pas nécessairement une absence d'activation et inversement, une activation cellulaire ne se traduit pas systématiquement par une augmentation détectable des IEGs [196]. L'évaluation systématique de plusieurs IEGs permet cependant d'avoir une vision plus complète de l'état d'activation des cellules, d'autant plus que leur patron d'expression diffère légèrement. En effet, c-fos est très faiblement présent à l'état basal dans la plupart des régions cérébrales, alors que son induction après stress est la plus prononcée. EGR1 est en revanche exprimé à un plus haut niveau de manière constitutive. Il est aussi fortement induit par le stress mais avec une localisation cérébrale parfois

différente de celle de c-fos. Enfin, une expression faible à modérée d'ARNm c-jun est retrouvée dans la plupart des régions cérébrales. Son induction après stress reste limitée à quelques régions exprimant toujours de manière concomitante soit c-fos, soit EGR1 [98].

## C. Les marqueurs d'activation calcique

### 1. Intérêt de l'exploration calcique au chaud

Lors de l'exposition à la chaleur, il existe des modifications importantes de flux calciques dans les cellules endothéliales humaines avec une chute initiale de la concentration intracellulaire de calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) suivie d'une première élévation très rapide, puis d'une deuxième plus lente [242]. Plus généralement, l'hyperthermie cytotoxique entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans de nombreux types cellulaires [241] (cellules de souris NIH 3T3 et C3H 10T1/2 [497, 498], cellules cancéreuses coliques humaines [333] et cellules de glandes salivaires de drosophiles [125]). *In vitro*, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  semble être impliquée dans la mort cellulaire et dans l'acquisition de la thermotolérance [469], mais son rôle global dans la tolérance à la chaleur reste ambigu.

### 2. Marqueur de l'activation calcique

Bien que l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  stimule de nombreux processus métaboliques, tels que l'activation des protéines de liaison au  $Ca^{2+}$  (*i.e.*, MCIP1), elle reste peu étudiée à la chaleur *in vivo*. Identifiée à l'origine dans les muscles squelettiques et cardiaque, MCIP1 (« myocyte-calcineurin-interacting proteins » ou « modulatory-calcineurin-interacting proteins ») possède une activité biologique plus étendue [403], en particulier dans les neurones [134]. L'ARNm MCIP1 est induit en moins de 90 min par l'augmentation de l'oxydation cellulaire et de  $[Ca^{2+}]_i$  [97] *via* des mécanismes impliquant la calcineurine [403]. MCIP1 possède des propriétés cytoprotectives lors de son induction par son rétrocontrôle inhibiteur de la calcineurine [278, 403], limitant l'activité de facteurs de transcription comme le « nuclear factor of activated T cells » (NFAT) [354]. En conclusion, l'expression des ARNm MCIP1 représente un marqueur de l'activation de la calcineurine et du stress oxydant, complétant les informations sur le stress cellulaire donné par l'expression des ARNm Hsp70.

## D. Les marqueurs d'activation inflammatoire

### 1. Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$

Les cytokines sont produites par les cellules du système immunitaire en périphérie mais aussi par les cellules neuronales et gliales du SNC [430, 474, 500]. Elles ont donc valeur de modulateurs de la réponse immunitaire et de neuromodulateurs.

### *a. L'IL-1 $\beta$ et le cerveau*

#### ➤ Mécanismes d'induction de l'IL-1 $\beta$

La cytokine IL-1 $\beta$  est induite par différentes voies agissant sur les séquences régulatrices du gène. La liaison de molécules extracellulaires (hormones, transmetteurs, cytokines) à leur récepteurs membranaires induit un signal intracellulaire (augmentation des seconds messagers : AMPc ; phosphorylation de kinases : PKC ; activation ou production de facteurs de transcription : NF- $\kappa$ B, AP-1) conduisant à l'activation de la transcription par la liaison des facteurs de transcription sur la séquence régulatrice du gène IL-1 $\beta$ . L'ARNm IL-1 $\beta$  est ensuite traduit en protéine pro-IL-1 $\beta$ , laquelle est convertie en une protéine IL-1 $\beta$  mature par l'IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE). La protéine IL-1 $\beta$  mature se fixe à trois types de récepteurs : IL-1RI, IL-1RII et IL-1ra. La transduction du signal est seulement assurée par l'IL-1RI. La stimulation de l'induction d'IL-1 est contrebalancée par des facteurs répresseurs comme les glucocorticoïdes en agissant sur les facteurs de transcription AP-1, CREB, NF-IL-6 et NF- $\kappa$ B [20] et en réduisant la stabilité des ARNm IL-1 [513].

#### ➤ L'expression cérébrale d'IL-1 $\beta$

Les ARNm IL-1 $\beta$  ont été détectés de manière constitutive dans le cerveau. Cette présence dans le cerveau à l'état basal n'a pas été confirmée par d'autres équipes, indiquant qu'ils sont soit en limite de détection, soit réellement absents (pour revue [500]). Pourtant, la protéine IL-1 $\beta$  est présente dans le cerveau à l'état basal, tout comme les récepteurs IL-1RI et IL-1ra, mais non IL-1RII (pour revue [375, 500]). Les variations circadiennes d'ARNm IL-1 $\beta$  [79] et l'augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$  après apprentissage [109, 429] suggèrent qu'IL-1 $\beta$  joue un rôle physiologique.

L'expression des ARNm IL-1 $\beta$  augmente après une agression cérébrale, qu'elle soit de nature ischémique [10, 481], excitotoxique (injection d'acide kaïnique [335]), inflammatoire (injection de LPS [10, 385]), neurodégénérative [293, 457] ou fonctionnelle (fatigue chronique [77, 109]). Son induction, survenant en une heure et persistant plusieurs jours [481], serait le fait des cellules endothéliales et microgliales, des macrophages et des monocytes [59, 110, 548], voire plus tardivement, des astrocytes et des neurones [110, 415]. L'IL-1 $\beta$  serait alors impliquée dans la genèse des dommages cérébraux ischémiques [481].

#### ➤ Régulateurs potentiels de l'expression d'IL-1 $\beta$ à la chaleur

Lors de l'exposition à la chaleur, la production d'IL-1 $\beta$  peut être stimulée par le complexe AP-1 (c-Fos/c-Jun) puisque les ARNm et protéines c-fos augmentent après seulement 20 min d'exposition à la chaleur [290, 482]. L'augmentation des PKC, de l'AMPc, du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [234, 242], des radicaux libres [532] peut aussi contribuer à l'augmentation de l'expression d'IL-1 $\beta$ . Cette stimulation de la transcription peut être contrebalancée par des facteurs répresseurs comme l'augmentation des glucocorticoïdes ou l'activation de HSF1 [63, 513].

Au niveau post-transcriptionnel, la stabilité des ARNm peut être réduite par les glucocorticoïdes [513], mais allongée par l'AMPc, les PKC, le  $[Ca^{2+}]_i$  [513]. La relation ARNm-protéine est obscurcie par l'existence de pools de pro-IL-1 $\beta$  pré-existants [513] ou d'une activation de la conversion de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature par le  $Ca^{2+}$  et l'ATP *via* la stimulation de ICE [513]. Au total, l'émergence d'ARNm d'IL-1 $\beta$  est la marque d'un mécanisme pathogène susceptible d'amplifier le signal IL-1 $\beta$  à tous les niveaux.

### *b. Le TNF- $\alpha$ et le cerveau*

#### ➤ Mécanismes d'induction du TNF- $\alpha$

L'induction du TNF- $\alpha$  ressemble à celle de l'IL-1 $\beta$  car leurs séquences régulatrices sont très similaires. Les voies de signalisation impliquent les voies tyrosines kinases (TR) et PKC comme activateurs, et la voie AMPc comme inhibiteur [28]. A la source de ces voies, l'activation glutamatergique semble impliquée *via* le récepteur NMDA [297, 298]. Les glucocorticoïdes joueraient un rôle répressur comme sur l'IL-1 par leur interaction avec les facteurs de transcription et la stabilité et la translation des ARNm TNF- $\alpha$  [467].

#### ➤ L'expression cérébrale du TNF- $\alpha$

De la même manière que pour l'IL-1 $\beta$ , des ARNm TNF- $\alpha$  ont été détectés dans le cerveau à l'état basal sans confirmation par d'autres études, suggérant que les ARNm TNF- $\alpha$  soient présents à un faible niveau ou absents du tissu cérébral normal [500]. Pourtant les protéines TNF- $\alpha$  sont détectées [500] tout comme la protéine TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme ou ADAM17) d'activation du TNF- $\alpha$  [208, 209, 460] et les deux types de récepteurs du TNF- $\alpha$ , TNFR1 (ou p55) et TNFR2 (ou p75). Il existe donc une véritable signalisation cérébrale constitutive basée sur le TNF- $\alpha$ . Les variations circadiennes d'ARNm TNF- $\alpha$  [500] plaident pour un rôle physiologique.

L'agression du SNC se traduit par une augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  que ce soit après injection de LPS (ARNm [335] et protéine [10]) et d'acide kaïnique (ARNm [335] et protéine [10]), traumatisme crânien [10], ischémie cérébrale (ARNm et protéines [58, 509] de manière concomitante à l'IL-1 $\beta$  [10, 418]) et même stress psychologique [298, 347], ce dernier pouvant ainsi aggraver les lésions induites par une ischémie cérébrale [78]. L'expression de TACE augmentée lors d'ischémie cérébrale [75, 400] et après un stress d'immobilisation [297, 298] suggère que l'expression du TNF- $\alpha$  s'intègre dans une up-régulation de l'ensemble de sa voie de signalisation.

Le glutamate semble jouer un rôle central dans l'initiation de la réponse inflammatoire liée au TNF- $\alpha$  puisque le blocage du récepteur NMDA réduit l'activité et l'expression de TACE induites par le stress, son expression constitutive, ainsi que les niveaux de TNF- $\alpha$  [297, 298]. Pour autant, l'augmentation du TNF- $\alpha$  par la régulation positive de TACE pourrait augmenter l'expression des transporteurs de glutamate, réduisant les concentrations extracellulaires de glutamate, potentiellement neurotoxiques [400].

### ➤ Régulateurs potentiels de l'expression du TNF- $\alpha$ à la chaleur

Lors de l'exposition à la chaleur, la transcription du gène TNF- $\alpha$  peut être activée par les mêmes stimuli, au moins en partie, que ceux responsables de l'activation de l'IL-1 $\beta$ , puisque leurs gènes possèdent des régions régulatrices similaires. Les mécanismes d'inhibition de l'expression du TNF- $\alpha$  sont également analogues : (i) glucocorticoïdes par leur interaction avec les facteurs de transcription et la stabilité et la translation des ARNm TNF- $\alpha$  [467], (ii) activation d'HSF réduisant la transcription du TNF- $\alpha$  par la liaison HSF/HRE partielle [458].

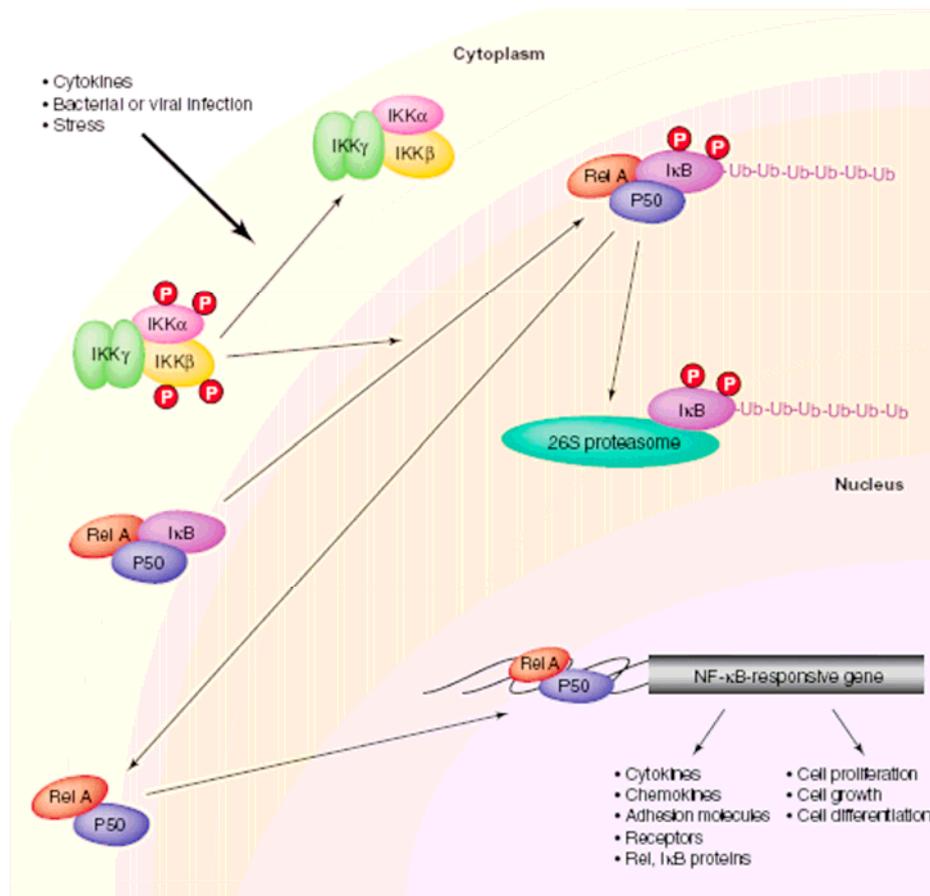
## ***2. La voie du facteur de transcription Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)***

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription activé lors de nombreuses situations : stress systémique physique et psychologique (Madrigal, 2002, Bierhaus, 2003) et stress cellulaire (LPS, cytokines, virus, radicaux libres) [49, 438, 531]. L'activation de cette voie tient un rôle central dans la réponse inflammatoire et immunitaire par ses actions modulatrices de l'expression génique. Il importe donc de bien cerner les mécanismes d'ouverture de cette voie de signalisation.

### *a. Mécanisme d'activation de NF- $\kappa$ B*

NF- $\kappa$ B/Rel est une famille de facteurs de transcription comprenant 5 membres (p65 ou RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) et NF- $\kappa$ B2 (p52/p100)) dont la dimérisation est nécessaire pour les propriétés de liaison à l'ADN. De multiples combinaisons peuvent se lier aux séquences  $\kappa$ B consensus sur le promoteur des gènes régulés par NF- $\kappa$ B, conduisant à l'activation transcriptionnelle. La forme de liaison classique et active est l'hétérodimère p65-p50 [531].

En l'absence de stimulation, les protéines NF- $\kappa$ B sont principalement localisées dans le cytoplasme, associées à une famille de protéines inhibitrices I $\kappa$ B [113]. Elles masquent le signal de translocation nucléaire des protéines NF- $\kappa$ B les maintenant ainsi sous forme cytoplasmique inactive. La première étape d'activation de NF- $\kappa$ B est la phosphorylation de I $\kappa$ B par leurs kinases (IKKs). Cette phosphorylation conduit à la liaison d'un complexe entraînant la polyubiquitination de I $\kappa$ B et sa dégradation par le protéasome 26S. La protéine NF- $\kappa$ B libérée peut ainsi migrer dans le noyau [531].



**Figure 21 :** Mécanisme d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (d'après [531])

### *b. Les gènes cibles de NF- $\kappa$ B*

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B constitue un des processus régulant le système immuno-inflammatoire. Parmi les gènes activés par cette voie, on peut citer les cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, GM-CSF, interféron- $\gamma$ ), chémokines (IL-8, macrophages), les molécules d'adhésion, des enzymes inductibles (COX-2 et iNOS) et certains récepteurs impliqués dans la reconnaissance immunitaire (MHC, complexe d'histocompatibilité majeur) [531]. Le promoteur du gène I $\kappa$ B $\alpha$  contient aussi des sites de liaison NF- $\kappa$ B [214].

### *c. Les médiateurs de l'activation de NF- $\kappa$ B*

#### ➤ Les activateurs

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B est déclenchée par de nombreux stimuli : (i) les LPS [438], (ii) les virus comme le « human immunodeficiency virus » (HIV), l'hépatite B, l'« Epstein Barr virus » (EBV) [49], (iii) les séquences d'ADN bactériens, (iv) les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  formant une boucle d'auto-régulation positive amplifiant l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire [368, 531], (v) les radiations UV et les

radicaux libres [221, 531], (ii) la dépolarisation membranaire et la stimulation des récepteurs NMDA [171, 221, 516].

#### ➤ Les inhibiteurs

L'inhibition de l'activité NF- $\kappa$ B représente un mécanisme important par lequel les glucocorticoïdes exercent leur effet anti-inflammatoire (pour revue [105, 115]). Cet effet passe par plusieurs mécanismes. (i) L'interaction cytosolique protéines-protéines entre les GR et p65 prévient la formation de dimères p65-p50 actifs [186, 425]. (ii) Les glucocorticoïdes stimulent l'expression des ARNm I $\kappa$ B $\alpha$ , entraînant une augmentation de la séquestration de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme [186, 425]. (iii) Le couple glucocorticoïdes-GR réprime la transcription médiée par NF- $\kappa$ B en (a) interférant avec la phosphorylation de l'ARN polymérase II, (b) entrant en compétition avec p65 pour la sous-unité catalytique de PKA, (c) inhibant l'activité de l'acétyltransférase associée au NF- $\kappa$ B. Ainsi la dexaméthasone inhibe la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN induite par le TNF ou le LPS [105, 264].

#### ➤ Modulation de NF- $\kappa$ B à la chaleur

L'activation de NF- $\kappa$ B à la chaleur reste controversée. *In vitro*, une inhibition de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est observée lors du choc thermique [261]. Elle pourrait être induite par une insolubilisation des kinases I $\kappa$ B suite à la dissociation de Hsp90 [380], mais aussi par une augmentation de l'expression et de la stabilisation des ARNm I $\kappa$ B $\alpha$  [129, 524], une inhibition de la phosphorylation et une augmentation de la stabilisation de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  [442, 483]. En raison de la forte induction de I $\kappa$ B $\alpha$  à la suite de stress thermique, cette protéine est considérée comme une véritable protéine de réponse au choc thermique [129, 380, 523, 524]. *In vivo*, l'hyperthermie (41-41,5°C de T<sub>co</sub> pendant 50 min) provoque l'activation de la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN dans le cervelet mais pas dans l'hippocampe [312].

## E. Moyens de déplétion en glucocorticoïdes

L'impact des glucocorticoïdes dans les mécanismes de stress est évalué par diverses méthodes de suppression de la sécrétion de glucocorticoïdes endogènes. L'ablation des glandes surrénales (adrénalectomie) présente l'inconvénient de retirer la médullo- et comme la cortico-surrénale, supprimant la sécrétion de corticostérone mais aussi de toutes les autres hormones (adrénaline, noradrénaline et hormones sexuelles). De plus, la présence d'un niveau de base de corticostérone ainsi que les variations circadiennes sont indispensables au fonctionnement physiologique normal. Ce dernier inconvénient peut toutefois être pallié par une supplémentation en corticostérone, mais sans variation circadienne.

Une des alternatives à l'adrénalectomie est la modulation des actions des glucocorticoïdes sur leurs récepteurs MR et GR par l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes comme le RU 28362 et le RU 38486 (agonistes sélectifs des GR), le RU 486 (antagoniste sélectif des GR) et le RU 28318 (antagoniste sélectif des MR) [114]. L'usage d'un agoniste comme la dexaméthasone exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe

HPA par sa forte affinité pour les GR [147], mais mime également les effets des récepteurs GR aboutissant à des effets parfois complexes à analyser.

Une autre possibilité est l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des glucocorticoïdes comme la métyrapone (2-Méthyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone), inhibiteur de l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxylase, enzyme transformant de la 11-désoxycorticostérone (11-DOC) en corticostérone. Elle permet de maintenir des taux de corticostérone de base et de supprimer toute augmentation induite par le stress. Elle module donc les actions des glucocorticoïdes médiées par les GR et non par les MR, ces derniers étant théoriquement occupés pour les valeurs de base de corticostérone. Une injection de métyrapone intra-péritonéale (i.p.) à la dose de 150 mg.kg<sup>-1</sup> quatre heures avant le dosage de corticostérone montre des concentrations résiduelles normales (85  $\pm$ 3 ng.mL<sup>-1</sup>) alors que l'adrénalectomie supprime presque entièrement la corticostérone plasmatique (1,1  $\pm$ 0,1 ng.mL<sup>-1</sup>) [150]. La même dose de métyrapone bloque totalement l'augmentation de corticostérone induite par 15 min de nage réalisée trois heures après l'injection i.p. [17] ou un stress de contention [174]. Ainsi, l'efficacité de la métyrapone, c'est-à-dire l'obtention de valeurs de corticostérone plasmatiques proches des valeurs de bases (50-100 ng.mL<sup>-1</sup>) et la suppression totale de l'élévation induite par divers stress, est obtenue par son injection i.p., i.v. ou sous-cutanée (s.c). entre une et six heures avant le test à des doses allant de 100 à 200 mg.kg<sup>-1</sup> [2, 107, 228, 247, 248, 309, 466]. C'est donc la méthode que nous avons utilisée dans notre travail expérimental.

## II. Pré-expérimentation

### A. Objectifs et hypothèses

Les objectifs de cette pré-expérimentation sont (i) d'évaluer la faisabilité de la déplétion des glucocorticoïdes par l'injection de métyrapone ; (ii) d'évaluer l'intensité de la production des ARNm Hsp70-1 et 2 dans le cerveau au cours de l'exposition à la chaleur ; (iii) de déterminer s'il y a des différences d'intensité et/ou de nature dans l'expression des ARNm Hsp70-1 et 2 entre le CC et l'hyperthermie ; (iv) d'évaluer le rôle des glucocorticoïdes sur la tolérance à la chaleur et sur l'induction des ARNm Hsp70.

Nous attendions une expression des ARNm Hsp70 d'autant plus importante que la charge thermique est importante et, chez les animaux déplétés en glucocorticoïdes, une vulnérabilité plus importante associée à une moindre production d'ARNm Hsp70.

### B. Protocole

Quatre-vingt-dix-neuf rats sont randomisés dans 11 groupes dont les effectifs sont détaillés dans le **Tableau 3** ci-dessous :

**Tableau 3** : Effectifs des groupes expérimentaux

	<i>Contrôle</i>	<i>Injection</i>	<i>Témoin hyperthermie</i>	<i>Témoin CC</i>	<i>Hyperthermie</i>	<i>CC</i>
<b>Polyéthylène glycol (PEG)</b>	9	9	9	9	9	9
<b>Métyrapone</b>		9	9	9	9	9
<b>Sous-total</b>	9	18	18	18	18	18
					<b>Total</b>	99

Le protocole expérimental et l'exploitation des données de température sont détaillés en annexe 1 (page 177). Le protocole comprend trois conditions d'exposition, la neutralité thermique ( $T_a = 22^\circ\text{C}$  pour les groupes Contrôle, Injection, Témoin hyperthermie et Témoin coup de chaleur), l'hyperthermie correspondant à 60 min d'exposition à  $T_a = 40^\circ\text{C}$  ; et le CC correspondant à une exposition à  $T_a = 40^\circ\text{C}$  jusqu'à ce  $T_{re} = 43^\circ\text{C}$ . Chacune de ces trois conditions, hormis pour le groupe Contrôle, est divisée en deux groupes de traitement, la métyrapone afin de réaliser la déplétion en glucocorticoïdes, et le vecteur polyéthylène glycol (PEG). Le déroulement de chaque journée expérimentale, incluant six animaux décalés d'une demi-heure, est détaillé sur le chronogramme présenté en annexe (**Figure 26**).

La contrainte thermique et la tolérance sont appréciées par la  $T_{re}$  et l' $AUC_{40,4}$ . Le stress systémique et l'efficacité de la déplétion pharmacologique sont jugées par la concentration sérique en glucocorticoïdes. La réactivité cérébrale est appréciée par l'expression des ARNm Hsp70 dans le cortex frontal.

## C. Résultats non publiés

### 1. Validité de la méthode pharmacologique de déplétion glucocorticoïdurgique

Les animaux métyrapone présentent des concentrations de corticostérone plasmatique inférieures à celles des animaux PEG dans tous les groupes expérimentaux, hormis le groupe Injection. Ces concentrations de corticostérone plasmatique restent à des niveaux physiologiques chez les animaux métyrapone quel que soit le groupe expérimental. Chez les animaux PEG, les concentrations de corticostérone plasmatique augmentent dans tous les groupes expérimentaux, hormis le groupe Injection.

**Tableau 4 :** Concentrations de corticostérone plasmatique dans les différents groupes expérimentaux.

Corticostérone (ng.mL <sup>-1</sup> )	Contrôle	Injection	Témoin hyperthermie	Témoin CC	Hyperthermie	CC
PEG	83 ±22	170 ±39	494 ±84***	369 ±69*	376 ±27**	366 ±33**
Métyrapone		78 ±8	121 ±11+++	130 ±21++	86 ±14++	105 ±17+++

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. Les analyses statistiques effectuées sont non paramétriques.

++  $P < 0,01$  ; +++  $P < 0,001$  ; PEG vs Métyrapone (Test U de Mann-Whitney).

\*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  ; pour chaque traitement, comparaison de tous les groupes expérimentaux vs Contrôle (Test de Kruskal-Wallis).

### 2. Analyse des variables cliniques de température

Au cours de la période de référence, les rats métyrapone présentent des valeurs de  $T_{re}$  plus basses que celles des rats PEG. En comparaison aux valeurs de  $T_{re}$  de base [168], les animaux métyrapone semblent être en légère hypothermie et les animaux PEG en hyperthermie.

A la fin de l'exposition à la chaleur, aucune différence de  $T_{re}$  n'est observée entre traitements dans les groupes d'Hyperthermie et de CC. En revanche, les rats métyrapone présentent toujours des valeurs de  $T_{re}$  plus basses que celles des rats PEG dans les groupes témoins. Les rats métyrapone présentent une  $AUC_{40,4}$  inférieure à celle des rats PEG dans le groupe Hyperthermie mais pas dans le groupe CC.

**Tableau 5 :** Températures rectales moyennes sur les 30 min de la période de référence ( $T_{re}$  Ref) et sur les 30 secondes de la fin d'exposition à la chaleur ( $T_{re}$  Fin expo) et  $AUC_{40,4}$  chez les animaux PEG et métyrapone dans les différents groupes expérimentaux.

		<i>Témoin hyperthermie</i>	<i>Témoin CC</i>	<i>Hyperthermie</i>	<i>CC</i>
$T_{re}$ Ref (°C)	PEG	38,6 ±0,1	38,6 ±0,1	38,6 ±0,2	38,8 ±0,2
	Métyrapone	36,1 ±0,3 <sup>+++</sup>	37,1 ±0,3 <sup>++</sup>	36,1 ±0,3 <sup>++</sup>	36,4 ±0,1 <sup>+++</sup>
$T_{re}$ Fin expo (°C)	PEG	38,3 ±0,2	38,3 ±0,2	42,0 ±0,2	42,9 ±0,1
	Métyrapone	35,8 ±0,4 <sup>+++</sup>	37,5 ±0,2 <sup>+</sup>	41,4 ±0,2	43,0 ±0,1
$AUC_{40,4}$ (°C.min)	PEG			26,0 ±6,0	58,5 ±5,9
	Métyrapone			8,9 ±3,1 <sup>+</sup>	53,7 ±6,2

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. Les analyses statistiques effectuées sont non paramétriques.  
<sup>++</sup>  $P < 0,01$  ; <sup>+++</sup>  $P < 0,001$  ; PEG *vs* Métyrapone (Test U de Mann-Whitney).

### 3. Expression des ARNm Hsp70-1 et 2

Deux heures après l'injection, les expressions d'ARNm Hsp70-1 et Hsp70-2 ne sont pas modifiées quelque soit le traitement. Après 90 min de mesure de température, les expressions d'ARNm Hsp70 ne sont toujours pas modifiées. L'expression des ARNm Hsp70-2 est cependant plus élevée chez les rats PEG que chez les rats métyrapone. Après une heure d'exposition à la chaleur, les expressions des ARNm Hsp70 sont fortement augmentées. L'expression des ARNm Hsp70 est toujours plus élevée chez les animaux PEG que chez les animaux métyrapone. Le CC entraîne une augmentation supplémentaire des expressions des ARNm Hsp70 pour les deux traitements.

**Tableau 6 :** Expressions des ARNm Hsp70-1 et 2 chez les animaux PEG et métyrapone dans les groupes expérimentaux Contrôle, Injection, Témoin hyperthermie, Hyperthermie et CC.

		<i>Contrôle</i>	<i>Injection</i>	<i>Témoin hyperthermie</i>	<i>Hyperthermie</i>	<i>CC</i>
<b>Hsp70-1</b> (UA)	PEG	0,008 ±0,001	0,006 ±0,001	0,012 ±0,004	1,564 ±0,378 <sup>**</sup>	2,633 ±0,34 <sup>***</sup>
	Métyrapone		0,007 ±0,001	0,005 ±0,001 <sup>+</sup>	0,634 ±0,245 <sup>***</sup>	2,303 ±0,189 <sup>***</sup>
<b>Hsp70-2</b> (UA)	PEG	0,015 ±0,002	0,014 ±0,001	0,016 ±0,002	1,562 ±0,234 <sup>**</sup>	2,773 ±0,265 <sup>***</sup>
	Métyrapone		0,011 ±0,001	0,010 ±0,001 <sup>+</sup>	0,665 ±0,238 <sup>***</sup>	2,679 ±0,330 <sup>***</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. Les analyses statistiques effectuées sont non paramétriques.

<sup>+</sup>  $P < 0,05$  ; PEG *vs* Métyrapone (Test U de Mann-Whitney).

<sup>\*\*</sup>  $P < 0,01$  ; <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0,001$  ; pour chaque traitement, Hyperthermie *vs* Témoin hyperthermie et CC *vs* Témoin hyperthermie (Test U de Mann-Whitney).

## D. Résultats complémentaires

Ces données figurent dans un article soumis à European Journal of Pharmacology, sous le titre « Metyrapone induces hypothermia and blocks the stress-induced hyperthermia ».

### 1. Objectifs

En raison des effets secondaires de la métyrapone sur la thermorégulation, nous avons approfondi les résultats sur une partie des groupes d'animaux non exposés à la chaleur (**Tableau 7**) afin de préciser les effets secondaires de la métyrapone sur la thermorégulation et l'activation cérébrale en conditions basales et lors d'un stress modéré, représenté par l'insertion du thermocouple rectal. La question est de savoir si les animaux métyrapone sont dans le même état que les animaux PEG. (i) Les plus basses valeurs de  $T_{re}$  chez les animaux métyrapone sont-elles seulement une absence d'hyperthermie de stress ou une véritable hypothermie ? (ii) Si l'hypothermie et l'absence d'hyperthermie de stress sont confirmées, sont-elles associées à une différence d'activation cérébrale, autre marqueur de stress ?

### 2. Protocole

**Tableau 7** : Nouvelle dénomination des groupes expérimentaux

<i>Dénomination originelle</i>	<i>Nouvelle dénomination</i>
Contrôle	Contrôle
Injection PEG	Inj/PEG
Injection métyrapone	Inj/Métyrapone
Témoin hyperthermie PEG	Stress/PEG
Témoin hyperthermie métyrapone	Stress/Métyrapone

Nous étudions donc ici les effets de la métyrapone deux heures après l'injection (Inj/PEG et Inj/Métyrapone) et après 90 min de stress d'insertion du thermocouple rectal (Stress/PEG et Stress/Métyrapone) sur la thermorégulation et l'activation cérébrale.

### 3. Résultats

Deux heures après l'injection de métyrapone, aucune différence d'expression d'ARNm Hsp70 et c-fos n'est observée entre les animaux contrôles, les animaux PEG (Inj/PEG) et les animaux métyrapone (Inj/Métyrapone). En revanche, après 90 min de stress modéré, les animaux PEG (Stress/PEG) présentent des expressions d'ARNm Hsp70 plus élevées que les animaux métyrapone (Stress/Métyrapone). Les animaux métyrapone ont des valeurs de  $T_{re}$  plus basses que les animaux PEG dès l'insertion du thermocouple et tout au long des 90 min de stress. Une nette hyperthermie est observée chez les animaux PEG durant les 90 min.

#### **4. Conclusion**

Ces résultats suggèrent d'une part que la métyrapone n'agit pas comme un agent stressant au vue de l'hypothermie et de l'absence d'activation cérébrale deux heures après l'injection. D'autre part, elle semble réduire les réactions de stress d'hyperthermie et d'activation cérébrale, ce qui est plutôt en faveur d'une activité anti-dépressive. Les animaux métyrapone ne sont donc pas dans la même situation que les animaux PEG.

### **E. Conclusion**

Cette pré-expérimentation a permis de mettre en évidence les faits suivants :

- L'utilisation d'une mesure de  $T_{re}$  par thermocouple et l'usage d'une déplétion pharmacologique en glucocorticoïdes par injection de métyrapone permet d'obtenir un contraste avec des animaux stressés avec et sans glucocorticoïdes. L'injection de métyrapone deux heures avant le début de l'expérimentation maintient des niveaux de base de corticostérone plasmatiques pendant au moins quatre heures après l'injection.
- Les deux types d'ARNm Hsp70 sont induites dès la première heure d'exposition à la chaleur et encore plus fortement en CC, de manière non différentielle selon le type d'Hsp70. L'évaluation de la cinétique d'apparition des ARNm Hsp70 doit donc se faire au cours de la première heure d'exposition à la chaleur.
- La déplétion de glucocorticoïdes n'inhibe pas l'induction d'Hsp70 à la chaleur mais l'usage de métyrapone s'accompagne d'effets secondaires sur la  $T_{re}$ . Ainsi, il n'est pas possible de conclure quant au rôle des glucocorticoïdes sur (i) la tolérance à la chaleur faute de niveau initial équivalent et (ii) les différences d'induction des ARNm Hsp70 à la chaleur en raison d'un biais de température. Afin de palier l'hypothermie, les animaux traités en métyrapone devront être placés dans un environnement correspondant à la neutralité thermique ( $T_a=29^\circ\text{C}$ ) à partir de l'injection et jusqu'à l'exposition à la chaleur.
- Les effets secondaires de la métyrapone sur la thermorégulation sont le fait d'une réduction de réactivité au stress de manipulation éventuellement associée à une hypothermie.

### **F. Article soumis à European Journal of Pharmacology**



# **Metyrapone induces hypothermia and blocks the stress-induced hyperthermia**

**Virginie Michel<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Drouet<sup>1</sup>, André Peinnequin<sup>2</sup>, Antonia Alonso<sup>2</sup>, Alain Buguet<sup>3</sup>, Raymond Cespuglio<sup>3</sup> and Frédéric Canini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centre de Recherches du Service de Santé Emile Pardé, Département des Facteurs Humains, La Tronche - France ;

<sup>2</sup> Centre de Recherches du Service de Santé Emile Pardé, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, La tronche - France ;

<sup>3</sup> Université C. Bernard Lyon1, Faculté de Médecine, EA 4170, 8 av. Rockefeller F-69373 Lyon - France.

**\* Corresponding author** : Virginie Michel

Pôle de neurophysiologie du stress

Centre de Recherche du Service de Santé Emile Pardé

24 avenue des maquis du Grésivaudan

F 38702 La Tronche Cédex

Tel : +33 4 76 63 69 49

Email : vmichel@crssa.net

## **Acknowledgments:**

We are indebted to Nadine Fidier and Renaud Maury for their skilled technical helps, Josiane Denis and Valérie Leroux for the plasma dosages and Catherine Mouret for her RT-PCR advices. This work was supported by grants from the French Service de Santé des Armées.

## **Abstract**

Mechanisms through which metyrapone (a corticosterone synthesis inhibitor) acts were studied by mean of the hyperthermia induced by an efficient stressor, i.e. the procedure deployed during 90 min to measure the colonic temperature ( $T_{co}$ ). Two hours after injection, no difference in brain c-fos and Hsp70 mRNAs were observed in unhandled, vehicle or metyrapone-treated rats. However, during stressor exposure, vehicle-treated animals exhibited a hyperthermia with a brain expression of Hsp70 mRNA while the metyrapone-treated ones exhibited a hypothermia with lower level of Hsp70 mRNA. Data reported suggest that metyrapone protects the animal from stress exposure, a conclusion going along with its antidepressant activity.

## **Keywords**

Metyrapone, hypothermia, stress-induced hyperthermia, stress, frontal cortex, Hsp70

## **Introduction**

Metyrapone is a 11- $\beta$  hydroxylase inhibitor capable to block the synthesis of the corticosterone fraction triggered by stress (Dal-Zotto et al., 2003). It has been employed to study the part played by glucocorticoids in the alterations related to stress (Baez and Volosin, 1994). Part of the available data point out that metyrapone could act itself as a stressor (Rotllant et al., 2002) or bear an antidepressant activity (Baez and Volosin, 1994). Far from any stressor exposure, metyrapone activates, indeed, the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (Herman et al., 1992; Rotllant and Armario, 2005), stimulates a vasopressin production (Conte-Delvoix et al., 1992), decreases feeding (Kennett et al., 1985) through a CRF release (Jain et al., 1993) and increases glycemia (Rotllant et al., 2002; Werner, 1988). Lastly, it has also been reported that metyrapone could trigger the expression of Fos-like immunoreactivity in several brain areas involved in the stress circuitry like the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the amygdala (Rotllant et al., 2002).

Presently, little is known about the influence exerted by metyrapone on thermoregulation and particularly on the stress-induced hyperthermia (SIH) occurring when an animal is challenged (Briese and Cabanac, 1991). SIH is strongly related to stress since, when it occurs, a high plasma corticosterone level is present (Veening et al., 2004) together with an enhanced locomotor activity (Morimoto et al., 1992) and an autonomic activation including hypertension and tachycardia (Morimoto et al., 1992). SIH is triggered by brain release of CRF since (i) an icv administration of  $\alpha$ -helical CRF (9-41, a CRF antagonist) blocks all the signs of stress (Morimoto et al., 1992), while (ii) injections of CRF in the medial preoptic area (MPOA) or in the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) mimic SIH (Cerri and Morrison, 2006). Since metyrapone favors CRF expression, even far from stressor exposure (Herman et al., 1992; Rotllant et al., 2002), it would produce a basal hyperthermia. However, in quiet conditions, metyrapone decreases thermogenesis and induces an

hypothermia in guinea pig (Werner, 1988), but does not modify the body core temperature in mice (Pryce et al., 2003).

In the present study we thus evaluate the thermophysiological state of metyrapone-treated rats placed first in quiet conditions and then after submitted to a stressor like the procedure for the colonic temperature ( $T_{co}$ ) measurement using thermocouples (Gordon, 1990).

## **Materials and methods**

Forty-five male Sprague-Dawley rats (Iffa Credo, Les Oncins, France) weighing 270-350g were used. They were housed in a climatic chamber with ambient temperature ( $T_a$ ) set at  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity at  $50\pm 10\%$  and 12-12h light-dark cycle with the light on at 07:00 a.m.. The rats were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 7 days before experiments. During this period, food and water were available *ad libitum* and the animals were weighed five days a week. All experimental procedures were declared conform to ethic as certified by the committee of the CRSSA (Centre de Recherches du Service de Santé des Armées).

The 2-Methyl-1,2-di(pyridine-3-yl)propan-1-one (metyrapone; Sigma, Saint Quentin, France) was administered sub-cutaneously (s.c.) at the dose of  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  capable to block efficiently the stress-induced rise in corticosterone (Haleem et al., 1988). Metyrapone was freshly dissolved in a solution of 40% polyethylene glycol diluted in sterile saline (PEG; Sigma, Saint Quentin, France) and given under a volume of 1.5 ml per rat. Vehicle-treated rats received s.c. the same volume of PEG solution.

In a first experiment, the biological status of the quiet rats was analyzed two hours after administration of PEG or metyrapone. In this respect 3 groups were used: a control group of 9 animals remaining unhandled in their home cage throughout the entire investigation; two other groups of rats receiving a single injection of PEG or of metyrapone and remaining unhandled during two hours (Inj/PEG and Inj/Metyrapone,  $n = 9$  in each group). All animals were sacrificed at the end of this period.

In a second investigation, rats received their treatment in the previous conditions, but were thereafter exposed to stress during 90 min (Stress/PEG and Stress/Metyrapone,  $n = 9$  in each group). They were equipped with two thermocouples, the first was inserted into the rectum at 6-7 cm from the anal margin to measure the colonic temperature ( $T_{co}$ ) while the other was stuck with an adhesive tape on the upper part of the tail root to measure skin

temperature ( $T_{\text{tail}}$ ). Finally, a third thermocouple was used to measure  $T_a$  inside of the home cage. The rats of the experimental groups were sacrificed at the end of the stress period. Control rats were sacrificed at various time of the investigation between 08:00 and 11:00 a.m.. The sacrifice was done under deep halothane anesthesia (4% into 100%  $O_2$ , Laboratoire Belmont, Paris, France). Blood was taken by intra-cardiac puncture and put into heparinized tubes. The plasma was isolated by centrifugation (4500g for 7 min), then stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The brain was dissected on an ice bed. A sample of frontal cortex was taken and put in 500  $\mu\text{l}$  of RNALater (Ambion, Europe). It was maintained at  $4^\circ\text{C}$  during 24 hours, then stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

The  $T_{\text{co}}$ ,  $T_{\text{tail}}$  and  $T_a$  were measured every five seconds. Heat loss index (HLI) was calculated for each five-second epoch according to the formula  $\text{HLI}=(T_{\text{tail}}-T_a)/(T_{\text{co}}-T_a)$  (Romanovsky et al., 1998). The variables were averaged over 1 minute epochs for the first 5 minutes and over each one of the six 15-min epochs of the stress period.

Plasma corticosterone was assayed using a specific radioimmuno-assay kit (ICN Biomedicals, France). Plasma glucose and total protein were assayed with an Hitachi 912 Analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France) using enzymatic colorimetric and colorimetric methods respectively with Roche<sup>TM</sup> reagents (Roche Diagnostics, Meylan, France). All dosages were practiced according to the manufacturer's instructions.

Frontal cortex samples were homogenized (200  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 30 Hz, 2 min; 2 tungsten 2 mm carbide beads) with a Mixer Mill MM300 (Rescht, Haan, Germany) in lysis buffer (buffer RLT, Qiagen, Courtaboeuf, France). The lysates were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until mRNA extraction.

Messenger RNA was extracted from 8 mg of lyzed tissue in a 50  $\mu\text{l}$  final volume using MagNA Pure LC instrument (MagNA Pure LC mRNA isolation kit II ; Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Reverse transcription was immediately performed using the Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). Reaction was carried out from 4  $\mu\text{L}$  of mRNA (0.6 mg of tissue) with 50  $\mu\text{M}$  Oligo d(T)15 primer and RNase inhibitor (2 UI) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

Primer design, optimization and specificity checking were led as described previously (Peinnequin et al., 2004). Oligonucleotide primers were synthesized at Eurogentec (Saraing, Belgium). Selected forward (F) and reverse (R) primers are the following: c-fos F: 5'-CGGAGAATCCGAAGGGAAAG -3', R: 5'- TGGCAATCTCGGTCTGCAAC -3' generating a 136 bp DNA fragment (GenBank accession no. **NM\_022197**), Heat Shock Protein 70-1 (HSP70-1) F: 5'-ACCATCGAGGAGGTGGATTAGAGG-3', R: 5'-ACCAGCAGCCATCAAGAGTCTGTC-3' generating a 77 base pairs (bp) DNA fragment (GenBank accession no. **X77207**), Heat Shock Protein 70-2 (HSP70-2) F: 5'-TTTCCTTGCATGGTGGCTCAC -3', R: 5'-TTCACACACTGGGGAACAAGTGC-3' generating a 95 bp DNA fragment (GenBank accession no. **X77208**), Cyclophilin A (CycA) F: 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3', R 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3' generating a 127 bp DNA fragment (GenBank accession no. **NM\_017101**), Hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase (HPRT) F: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3', R: 5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3' generating a 123 bp DNA fragment (GenBank accession no. **NM\_012583**).

PCR was carried out with Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using 0.25 µL of cDNA (15 µg of tissue), in a 20 µL final volume, 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.4 µM of each primer (final concentration). Quantitative PCRs were performed using LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 50 cycles of 95°C for 20 s , 57°C (c-fos), 58°C (CycA), 60°C (HSP70-2, HPRT), 62°C (HSP70-1), for 5 s and a final step of 8 s at 72°C. Amplification specificity was checked using melting curve following the manufacturer's instructions. Crossing point (C<sub>p</sub>) values were calculated from Light Cycler Software v.3.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using the second derivative maximum method. Quantification was achieved using a pool of cDNA samples as calibrator (Peinnequin et al., 2004) according to the comparative threshold

cycle method (Livak and Schmittgen, 2001). Relative mRNA values were calculated with RelQuant software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Normalization was performed by geometric averaging of two internal control genes (CycA and HPRT) (Vandesompele et al., 2002). The validity of internal genes was checked *a posteriori* in our own investigation. The CycA and HPRT genes were not affected by the treatment nor by stress.

Statistical analysis was achieved using non parametric methods. Differences among groups were assessed using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Time courses were analyzed using Friedman test. The significance level was set at  $p < 0.05$ . Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## **Results**

In the first investigation (Table 1), no difference was observed in plasma corticosterone concentration among groups. Proteins were high in the rats receiving injection of either PEG or metyrapone ( $p < 0.001$  with Inj/PEG *vs* Control,  $p < 0.001$  and Inj/Metyrapone *vs* Control,  $p < 0.01$ ). Glucose was found high only in metyrapone-treated rats ( $p < 0.01$  with Inj/Metyrapone *vs* Control,  $p < 0.01$ ). No difference among groups were observed in brain mRNA expressions.

In the second investigation (Table 1), corticosterone was higher in Stress/PEG than in Stress/Metyrapone ( $p < 0.001$ ). Protein concentrations were similar in both groups, but glucose was higher in Stress/Metyrapone rats compared to Stress/PEG rats ( $p < 0.001$ ). Except c-fos, expressions of Hsp70-1 ( $p < 0.05$ ) and Hsp70-2 ( $p < 0.05$ ) mRNAs were higher in Stress/PEG than in Stress/Metyrapone rats.

The  $T_{co}$  was lower in Stress/Metyrapone rats than in Stress/PEG rats as soon as the first min (Fig 1,  $p < 0.001$ ) and throughout the 90-min of the stress procedure ( $p < 0.001$  for all  $T_{co}$  values). During the first 5 min,  $T_{co}$  increased in Stress/PEG ( $p < 0.001$ ) and Stress/Metyrapone rats ( $p < 0.05$ ), but the hyperthermia was observed on the entire 90-min period only in stress/PEG rats (Stress/PEG:  $p < 0.001$ ). No difference in  $T_{tail}$  and HLI was observed between groups throughout the considered periods. The  $T_{tail}$  decreased during the first 5 min of the procedure ( $p < 0.001$  for both groups) but it remained steady thereafter (Stress/PEG:  $p < 0.01$  and Stress/Metyrapone:  $p < 0.001$ ). The HLI time course was similar to that of  $T_{tail}$  (data not shown).

## **Discussion**

The rats treated with metyrapone were hypothermic and did not exhibit a SIH when challenged by a long lasting  $T_{co}$  measurement. The hypothermia observed seems to be congruent to that observed in guinea pig (Werner, 1988). It could be explained by a reduced heat production since it occurs at thermoneutrality while  $O_2$  consumption decreases (Werner, 1988). Any extra reaction related to the tail insulation occurred in metyrapone rats since HLI and  $T_{tail}$  were similar in both groups. Metyrapone-induced hypothermia could thus result from regulatory processes reflecting a diminished heat production. When the hypothermia was observed, the animals were in a quiet condition: (i) brain c-fos mRNA expression was low, suggesting a lack of brain activation within the last hour (Cullinan et al., 1995), (ii) an hyperglycemia (Rotllant et al., 2002; Werner, 1988) probably linked to a decreased consumption of glucose (Parthasarathy et al., 2002). Thus, the initial hypothermia that may occur in quiet animals, suggests that metyrapone does not act as a stressor.

Within the few minutes occurring after insertion of the thermocouple,  $T_{co}$  increased and  $T_{tail}$  decreased in PEG rats, both featuring SIH (Briese and Cabanac, 1991). However, SIH was blunted in metyrapone rats whereas they had probably perceived the challenge:  $T_{co}$  increased very slightly during the first five minutes while  $T_{tail}$  decreased. Moreover,  $T_{tail}$  decrease was similar in both treatment groups, suggesting a same level of sympathetic activation. The SIH could have been blocked at two levels: (i) in periphery where the animals could not stimulate their thermogenesis as suggested by the poor increase existing in  $T_{co}$  increase and the initial hypothermia; (ii) in brain where a lesser activation was observed in the expression of Hsp70 mRNAs in metyrapone rats versus PEG ones. Acute stress can indeed induce an immediate (Fleshner et al., 2004) or a delayed (6 h later) (Fukudo et al., 1997) Hsp70 mRNA increase. This suggests that metyrapone rats are less reactive to stress exposure, a conclusion going along with its antidepressant activity (Baez and Volosin, 1994).

## **Legends:**

### **Table 1**

Plasma corticosterone ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), protein ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), glucose ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) concentrations and brain relative quantity of Hsp70-1, Hsp70-2 and c-fos mRNA expressions ( $\times 100$ , AU). For all groups,  $n=9$ . Comparisons are done using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests in the first and the second investigation respectively. Results are done as \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$  and \*\*\*:  $p<0.001$ . Data are expressed as means $\pm$ SEM.

### **Figure 1.**

Time course values of  $T_{\text{co}}$  (A) and  $T_{\text{tail}}$  (B) during the first five-min stress period (left) and during the entire stress exposure duration (right) in Stress/PEG ( $\circ$ ,  $n=9$ ) and Stress/Metyrapone rats ( $\bullet$ ,  $n=9$ ). Comparisons between groups are done using Mann-Whitney tests. Results are expressed with \*\*\*:  $p<0.001$ . Values are plotted as means $\pm$ SEM.

1 **Table 1**

	1 <sup>st</sup> investigation			2 <sup>nd</sup> investigation	
	Control	Inj/PEG	Inj/Metyrapone	Stress/PEG	Stress/Metyrapone
<b>Corticosterone</b>	83±22	170±39	78±8	494±84	121±11 ***
<b>Glucose</b>	11.1±1.1	11.9±0.6	16.5±2.1 **	10.9±0.5	17.3±1.1 ***
<b>Proteins</b>	51.3±0.6	58.5±0.9	57.8±1.1 ***	58.1±1.0	59.5±1.4
<b>c-fos</b>	83.47±10.03	79.00±09.38	134.80±24.63	132.79±21.65	92.70±11.45
<b>Hsp70-1</b>	0.76±0.13	0.59±0.08	0.67±0.15	1.18±0.42	0.47±0.08 *
<b>Hsp70-2</b>	1.50±0.22	1.37±0.14	1.13±0.13	1.62±0.24	0.99±0.11 *

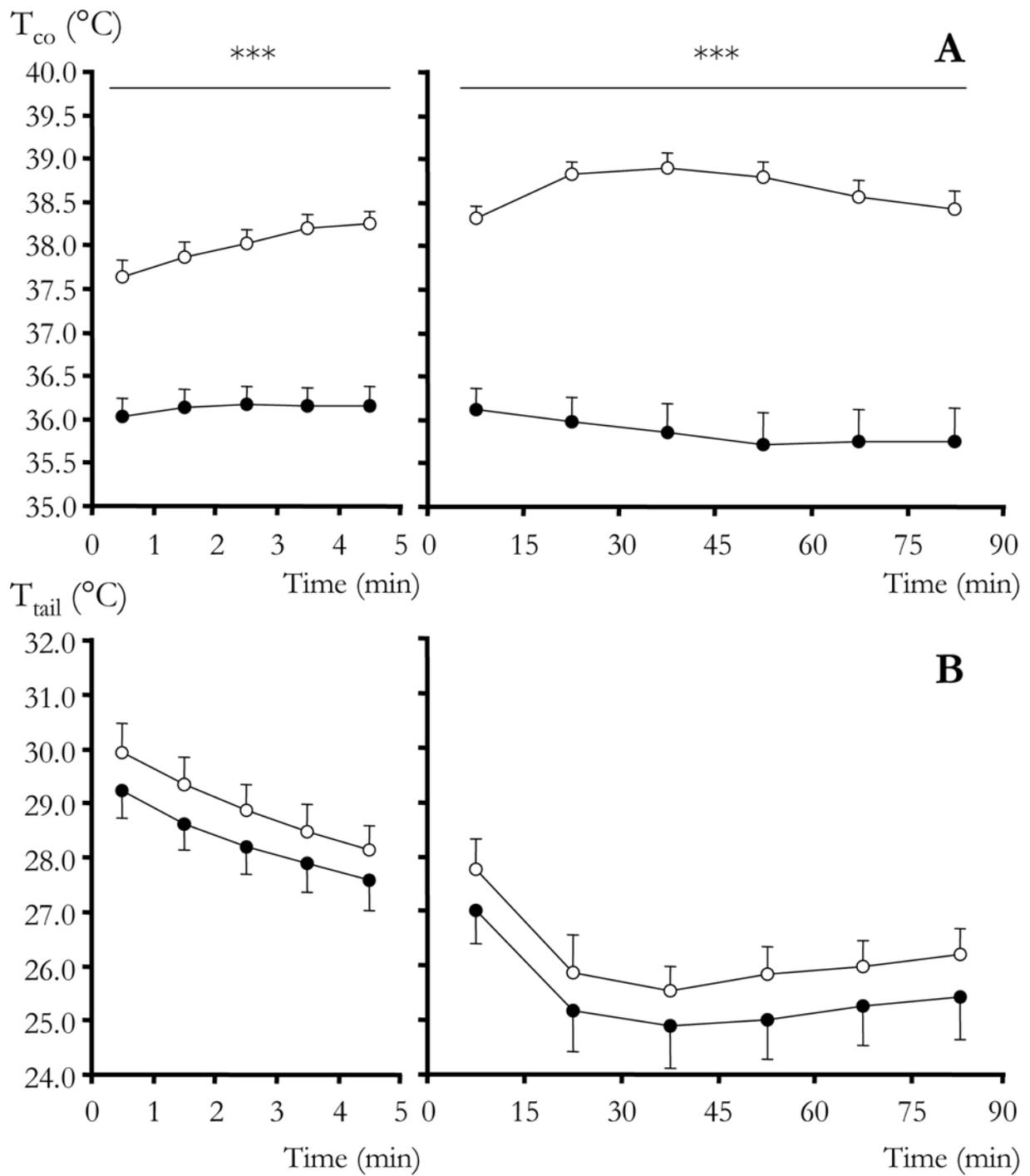
## References:

- Baez, M. and Volosin, M., 1994. Corticosterone influences forced swim-induced immobility. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 729-736.
- Briese, E. and Cabanac, M., 1991. Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever. *Physiol. Behav.* 49, 1153-1157.
- Cerri, M. and Morrison, S.F., 2006. Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus. *Neuroscience* 140, 711-721.
- Conte-Delvoix, B., Guillaume, V., Boudouresque, F., Graziani, N., Magnan, E., RGrino, M., Empaire, N., Nahoul, K., Cataldi, M. and Oliver, C., 1992. Effect of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressine secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *Acta Endocrinol.* 127, 435-440.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H. and Watson, S.J., 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat following acute stress. *Neuroscience* 64, 477-505.
- Dal-Zotto, S., Marti, O. and Armario, A., 2003. Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 28, 992-1009.
- Fleshner, M., Campisi, J., Amiri, L. and Diamond, D.M., 2004. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1142-1152.

- Fukudo, S., Abe, K., Hongo, M., Utsumi, A. and Itoyama, Y., 1997. Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. *Brain Res.* 757, 146-148.
- Gordon, C.J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963-991.
- Haleem, D.J., Kennett, G. and Curzon, G., 1988. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.* 458, 339-347.
- Herman, J.P., Schafer, M.K.-H., Thompson, R.C. and Watson, S.J., 1992. Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription *in vivo*. *Mol. Endocrinol.* 6, 1061-1069.
- Jain, M.R., Patil, P.P. and Subhedar, N., 1993. Direct action of metyrapone on brain: implication in feeding. *NeuroReport* 5, 69-71.
- Kennett, G.A., Dickinson, S.L. and Curzon, G., 1985. Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 143-152.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Morimoto, A., Nakamori, T. and Murakami, N., 1992. Possible involvement of the Central CRF in Response to Psychological Stress. *Jpn. J. Physiol.* 42, S283.
- Parthasarathy, C., Yuvaraj, S., Sivukumar, R., Ravi Sankar, B. and Balasubramanian, K., 2002. Metyrapone-induced corticosterone deficiency impairs glucose oxidation and steroidogenesis in Leydig cells of adult albino rats. *Endocr. J.* 49, 405-412.

- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., Agay, D., Chancerelle, Y. and Multon, E., 2004. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology* 5.
- Pryce, G., Giovannoni, G. and Baker, D., 2003. Mifepristone or inhibition of 11 $\beta$ -hydroxylase activity potentiates the sedating effects of the cannabinoid receptor-1 agonist D(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Neurosci. Lett.* 341, 164-166.
- Romanovsky, A.A., Kulchitsky, V.A., Simons, C.T. and Sugimoto, N., 1998. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? *Am. J. Physiol.* 275, R332-R338.
- Rotllant, D. and Armario, A., 2005. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroscience* 130, 427-434.
- Rotllant, D., Ons, S., Carrasco, J. and Armario, A., 2002. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur. J. Neurosci.* 16, 693-700.
- Vandesompele, J., De preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3.
- Veening, J.G., Bouwknecht, A., Joosten, H.J.J., Dederen, P.J., Zethof, T.J.J., Groenink, L., van der Gugten, J. and Olivier, B., 2004. Stress-induced hyperthermia in the mouse: c-fos expression, corticosterone and temperature changes. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 28, 699-707.

Werner, R., 1988. Effect of metopirone-ditartrate on thermogenesis in the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C, 445-450.





# **Travail expérimental**



# ***I. Expérimentation 1: métyrapone et tolérance à la chaleur***

Cette expérimentation a été publiée dans Brain Research [331], sous le titre «Effect of glucocorticoid depletion on heat-induced Hsp70, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene expression ».

## **A. Objectifs et hypothèses**

Les objectifs de cette expérimentation sont (i) d'évaluer la cinétique d'apparition des ARNm Hsp70 au cours des premières phases d'exposition à la chaleur, donc dans la première heure ; (ii) d'évaluer l'effet de la déplétion des glucocorticoïdes sur la tolérance à la chaleur et la cinétique d'apparition des ARNm ; (iii) de déterminer le tableau d'une intolérance à la chaleur définie selon les critères d'Hubbard ; (iv) d'évaluer la relation entre l'expression des ARNm d'Hsp70-1 et Hsp-2 et la tolérance à la chaleur.

## **B. Protocole**

Le protocole précis de l'expérimentation, le chronogramme et les méthodes de calcul utilisées sont précisés en annexe 2 (page 181). Brièvement, deux heures avant l'exposition à la chaleur, les animaux reçoivent une injection de métyrapone ou de solvant PEG. Les animaux traités en métyrapone sont laissés dans un environnement de neutralité thermique ( $T_a=29^\circ\text{C}$ ) pour supprimer l'hypothermie pharmacologique. Ils sont ensuite exposés à la chaleur pour des durées croissantes de 15, 30, 45 ou 60 min selon le groupe expérimental. A la fin de l'exposition, les animaux sont sacrifiés et tous les prélèvements sont effectués.

*A posteriori*, les animaux sont redistribués selon la charge thermique ( $AUC_{40,4}$ ), définie par Hubbard. Quatre nouveaux groupes sont ainsi formés sur la base du risque vital. Le groupe Contrôle comprend les rats ne subissant aucun stress. Le groupe HL<sub>1</sub> regroupe les rats avec une charge thermique nulle, mais ayant subi le stress de l'injection ou le stress de l'injection et du thermocouple. Le groupe HL<sub>2</sub> comprend les animaux avec une charge thermique modérée selon les critères de Hubbard ( $AUC_{40,4}<20^\circ\text{Cmin}$ ). Le groupe HL<sub>3</sub> regroupe les rats présentant une charge thermique intense avec risque léthal ( $AUC_{40,4}>20^\circ\text{min}$ ).

La tolérance à la chaleur est évaluée au travers des réponses physiologiques par la  $T_{re}$ , le niveau de lactate plasmatique et l'hématocrite, et des réponses cérébrales analysées dans le cortex frontal par l'expression des ARNm Hsp70, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ .

## **C. Résultats**

Lors d'une hyperthermie sévère ( $AUC_{40,4}>20^\circ\text{min}$ ), les animaux PEG souffrent de déshydratation et de déséquilibre métabolique au niveau systémique. Au niveau du cortex cérébral, l'activation d'un processus inflammatoire local est sous-tendue par l'augmentation de la transcription des ARNm IL-1 $\beta$ .

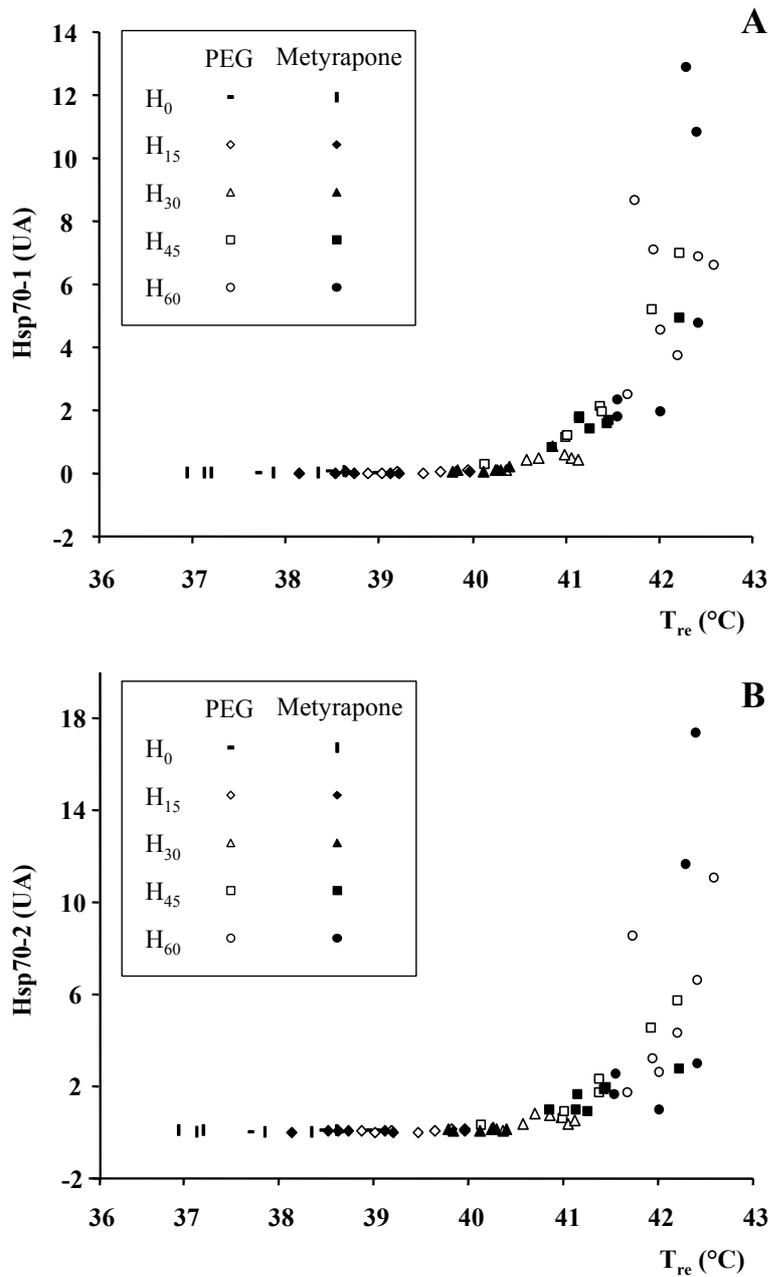
Cette activation témoignerait de l'apparition d'activateurs communs à l'induction des ARNm Hsp70, expliquant ainsi la perte de corrélation observée entre l'expression d'ARNm Hsp70 et la charge thermique.

Lorsqu'une déplétion en glucocorticoïdes est ajoutée à cette hyperthermie sévère, on retrouve le même état de déshydratation et de déséquilibre métabolique systémique et la même augmentation des ARNm Hsp70 et IL-1 $\beta$  dans le cortex frontal que chez les animaux PEG. En revanche, l'activation pro-inflammatoire cérébrale semble être plus avancée en raison de l'apparition d'ARNm TNF- $\alpha$ . On peut donc suspecter un effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la production d'ARNm TNF- $\alpha$ .

Les critères de charge thermique calculée à partir de l'AUC<sub>40,4</sub> développés par Hubbard se révèlent opérationnels dans nos conditions expérimentales. Le seuil de 20°C.min permet de distinguer les animaux dans un état encore physiologique, régulé, en deçà de ce seuil, des animaux ayant basculés dans un état pathologique avec un risque de létalité, au-delà de ce seuil.

## **D. Résultats complémentaires non publiés**

La relation entre l'expression des ARNm Hsp70 et la valeur de T<sub>re</sub> de fin d'exposition est caractérisée par des courbes exponentielles (PEG: Hsp70-1:  $y=10^{-31}e^{1,7286x}$  avec  $r^2=0,93$ ; Hsp70-2:  $y=4x10^{-27}e^{1,4776x}$  avec  $r^2=0,92$ ; Métyrapone: Hsp70-1:  $y=10^{-25}e^{1,3853x}$  avec  $r^2=0,88$ ; Hsp70-2:  $y=10^{-20}e^{1,1079x}$  avec  $r^2=0,83$ ). De ces équations sont calculées les valeurs minimales de T<sub>re</sub> pour lesquelles les ARNm Hsp70 commencent à augmenter (PEG : Hsp70-1 : 39,2°C ; Hsp70-2 : 39,1°C ; Métyrapone : Hsp70-1 et Hsp70-2 : 38,9°C).



**Figure 22 :** Relation entre l'expression des ARNm Hsp70-1 et 2 et la  $T_{re}$  finale dans les différents groupes de durée d'exposition à la chaleur ( $H_0$ ,  $H_{15}$ ,  $H_{30}$ ,  $H_{45}$  et  $H_{60}$ , dont les durées d'exposition à la chaleur sont respectivement 0, 15, 30, 45 et 60 min) chez les animaux PEG et chez les animaux métyrapone.

## E. Conclusion

Cette expérimentation permet de proposer les conclusions suivantes :

- La cinétique d'apparition des ARNm d'Hsp70 montre que les animaux les plus gravement atteints sont ceux ayant eu la réaction la plus intense, avec le coût allostasique que cela suppose. A l'origine pensée comme un indice de tolérance à la chaleur, l'induction des ARNm Hsp70 doit être considérée comme un marqueur de l'agression cellulaire. Elle représente la réactivité cellulaire face à l'agression infligée. La disparition de corrélation entre ARNm Hsp70 et charge thermique dans les groupes à risque de mortalité laisse à penser qu'un facteur supplémentaire intervient lorsque le risque vital apparaît.
- La déplétion de glucocorticoïdes ne modifie ni les réponses physiologiques, ni l'expression des ARNm Hsp70, mais est associée à une réaction pro-inflammatoire plus importante. Ceci suggère une moindre tolérance à la chaleur et un risque lésionnel plus important. La déplétion en glucocorticoïdes semble être responsable d'une vulnérabilité plus importante à la chaleur non pas par une interaction avec l'induction des ARNm Hsp70 mais plutôt par une interaction avec les processus inflammatoires locaux.
- L'apparition d'un risque léthal est liée à l'émergence d'un syndrome inflammatoire et d'un déséquilibre métabolique précoce survenant à un moment où la notion de CC ne peut être évoquée. Ce syndrome inflammatoire apparaît dans le tissu cérébral au sens large et n'est donc pas le reflet d'un envahissement du cerveau par les cytokines venant de la périphérie.

## F. Perspectives

Le blocage pharmacologique de la réactivité de l'axe HPA ne permet pas de juger véritablement du rôle naturalistique que jouent les variations d'activation de l'axe HPA dans l'émergence d'une intolérance à la chaleur. En d'autres termes, la relation entre stress et tolérance ne peut être analysée.

Afin de mieux cerner les mécanismes impliqués dans la vulnérabilité à la chaleur, la réponse de stress systémique (activation de l'axe HPA) et la réponse cérébrale (activation cellulaire, agression cellulaire et activation inflammatoire) doivent être plus amplement étudiées chez des animaux exposés en libre cours à  $T_a=40^\circ\text{C}$  pendant 90 min, sans traitement pharmacologique.

## G. Article Brain Research

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)


---



---

**BRAIN  
RESEARCH**


---



---



---

**Research Report**
**Effect of glucocorticoid depletion on heat-induced Hsp70, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene expression**
**Virginie Michel<sup>a,\*</sup>, André Peinnequin<sup>b</sup>, Antonia Alonso<sup>b</sup>, Alain Buguet<sup>c</sup>,  
Raymond Cespuglio<sup>c</sup>, Frédéric Canini<sup>a</sup>**
<sup>a</sup>Centre de Recherches du Service de Santé Emile Pardé, Département des Facteurs Humains, F-38702 La Tronche – France<sup>b</sup>Centre de Recherches du Service de Santé Emile Pardé, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, F-38702 La Tronche – France<sup>c</sup>Université C. Bernard Lyon1, Faculté de Médecine, EA 4170 Radicaux libres, substrats énergétiques et physiopathologie cérébrale, 8 av. Rockefeller F-69373 Lyon – France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 11 June 2007

Available online 16 June 2007

## Keywords:

Rat

Heat load

Corticosterone

Cerebral cortex

Hsp70

Cytokine

## ABSTRACT

When exposed to heat, conscious naive rats may develop lethal heatstroke, depending on heat load, i.e., time spent at high body core temperature. The occurrence of heatstroke was hypothesized to result from a defective glucocorticoid secretion related to altered heat-stress responses. We thus investigated the potential involvement of glucocorticoids in heat tolerance and its consequences on physiological responses, heat shock protein 70 (Hsp70), and cytokine mRNA expressions. Two hours before heat exposure, the animals were injected either with metyrapone, an inhibitor of corticosterone synthesis, or with its vehicle. Heat exposure lasted for 15, 30, 45 or 60 min. Thereafter, the rats were distributed into three groups according to their heat load: null, moderate (without any lethal risk) and intense (with lethal risk). Physiological responses were evaluated with colonic temperature, plasma lactate and hematocrit. Brain responses were assessed in frontal cortex through Hsp70, interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) mRNA expressions. The animals with a severe heat load exhibited a high hematocrit, increased plasma lactate level and enhanced brain IL-1 $\beta$  and Hsp70 mRNA expressions. Independent of the heat load, Metyrapone rats showed the same thermophysiological responses and IL-1 $\beta$  and Hsp70 mRNA expressions when compared with vehicle rats. However, the Metyrapone rats experiencing an intense heat load exhibited an increased TNF- $\alpha$  mRNA expression. In conclusion, these data (i) confirm that heat load is important in the calibration of the risk attached to heat exposure; and (ii) suggest that corticosterone synthesis inhibition may favor TNF- $\alpha$  mRNA expression without any effect on Hsp70 mRNA expression.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

---

\* Corresponding author. Pôle de Neurophysiologie du Stress Département des Facteurs Humains Centre de Recherches du Service de Santé Emile Pardé 24 avenue du maquis du Grésivaudan F 38702 La Tronche Cédex – France. Fax: +33 4 76 63 69 45.

E-mail address: [vmichel@crssa.net](mailto:vmichel@crssa.net) (V. Michel).

Abbreviations: AUC, area under the T<sub>co</sub> time course curve; CycA, cyclophilin A; HL, heat load; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; Hsp70, heat shock protein 70; IL-1 $\beta$ , interleukin-1beta; PCR, polymerase chain reaction; PEG, polyethylene glycol; RT, reverse transcription; RH, relative humidity; T<sub>a</sub>, ambient temperature; T<sub>co</sub>, colonic temperature; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha

## 1. Introduction

Heat exposure may provoke pathological reactions depending on the heat intensity and the exposure duration. Heat tolerance is defined as the ability of animals to cope with heat stress without major biological disturbances (Bligh and Johnson, 1973). It could correspond to the heat exposure duration during which the animals remain under physiological conditions. Impairment of the heat tolerance was shown to be related to the occurrence of death within 24 h following cessation of the heat exposure (Hubbard et al., 1977). The strain of heat exposure, related to the time spent at a high body core temperature ( $T_{co}$ ), is represented by heat load, defined as the area located under the  $T_{co}$  time course curve (AUC) and expressed in degree minute ( $^{\circ}\text{C min}$ ). The risk of death occurrence within 24 h was previously shown to be related to heat load level above a threshold ( $\text{AUC}_{\text{threshold}}$ ) set at  $T_{co}=40.4$   $^{\circ}\text{C}$ . The resting rats experiencing heat load exceeding 20  $^{\circ}\text{C min}$  over that threshold ( $\text{AUC}_{40.4}$ ) exhibit a risk of heat-induced death and thus are assumed to be severely heat-stressed (Hubbard et al., 1977). Large individual variation in heat coping is commonly observed in conscious heat-exposed rats (Ohara et al., 1975; Wright et al., 1977).  $T_{co}$  increases either steadily with one (type I) or two subsequent rising slopes (type II), or follows a triphasic time course (type III). The latter pattern is constituted with an initial  $T_{co}$  rise followed by a plateau of varied duration and level, ending in a final pre-lethal  $T_{co}$  rise (Ohara et al., 1975; Wright et al., 1977). Such variability in responses to heat stress suggests that environmental conditions do not represent the sole factor in the induction of heat disorders.

The mechanisms underlying heat tolerance in conscious and naive animals still remain largely unexplored; specifically, the role of glucocorticoids in heat tolerance remains to be investigated. In heat-shocked anaesthetized rats, glucocorticoids have been regarded as neuroprotective. Liu et al. (2000) demonstrated that dexamethasone reduces the cerebral ischemia following cardiovascular and neuronal damages, whereas, adrenalectomy decreases the survival time and impairs the physiological reactions to extreme heat stress. The mechanisms by which glucocorticoids may be involved in heat tolerance may be related to their anti-inflammatory properties (Barnes, 1998; Smoak and Cidlowski, 2004). In heatstressed rats, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  proteins increase in the brain and blood (Leon et al., 2006; Lin et al., 1995) and dexamethasone treatment limits this reaction, at least for blood IL-1 $\beta$ , and improves survival time (Liu et al., 2000). Consequently, low levels of blood glucocorticoids may enhance inflammatory reactions and limit heat tolerance. However, the nature of the relationship between early inflammatory responses featured by cytokine mRNA expression, glucocorticoid secretion and heat tolerance remains to be investigated. It might also be argued that heat shock proteins 70 (Hsp70) thought to be tissue protection-inducers (Kiang and Tsokos, 1998; Kregel, 2002) may be protective against heat aggression. Severe heatstressed patients exhibit lower plasma Hsp70 protein content (Wang et al., 2001). Moreover, Hsp70 proteins improve physiological function and limit heat-induced damages (Lee et al., 2006; Wang et al., 2005; Yang et al., 1998), whereas *in situ* microinjections of anti-Hsp70 antiserum reverse cardiovascular protection (Li et al., 2005, 2001). However, the neuroprotective effect has been reported in case of overexpos-

ure of Hsp70 protein (Lee et al., 2006) or after pre-induction of Hsp70 protein by heat shock (Wang et al., 2005; Yang et al., 1998), chemical stress (Yang et al., 1998), or exercise (Hung et al., 2005). Less is known about naive heat-exposed animals. Hsp70-induced neuroprotection may be delayed since brain Hsp70 mRNA are present only after 35 min of heat exposure (Blake et al., 1990; Maroni et al., 2003), and proteins are not detected until 4 h after heat exposure (Maroni et al., 2003; Westman and Sharma, 1998). Insufficient or delayed Hsp70 mRNA production in the early phase of heat exposure may decrease heat tolerance through an impairment of the physiological function. Furthermore, glucocorticoids may also modify Hsp70 expression. Adrenalectomy blocks Hsp70 protein expression in the brain after exposure of rats to cats (Fleshner et al., 2004) and dexamethasone treatment, which reduces corticosterone level, also attenuates the adrenal Hsp70 mRNA expression after restraint stress (Udelsman et al., 1994).

In the present investigation, we studied the early heat-induced physiological and brain responses in naive rats according to the level of experienced heat load, and analyzed the role of glucocorticoid depletion on these responses. Different groups of animals were exposed to diverse heat exposure durations (0, 15, 30, 45, and 60 min) in order to obtain different heat load values at the end of the heat exposure. Afterwards, according to their heat load value, the animals were redistributed into three groups: no heat exposure ( $\text{HL}_1$ ), heat exposure with moderate heat load (without any lethal risk,  $\text{HL}_2$ ) and heat exposure with intense heat load (with lethal risk,  $\text{HL}_3$ ). The physiological responses of the animals were analyzed through  $T_{co}$  level, blood lactate concentration, and hematocrit. The early brain responses were studied through the expression of Hsp70 and cytokine mRNA in the cerebral cortex. The deficiency in glucocorticoid secretion was mimicked by using metyrapone, an inhibitor of 11 $\beta$ -hydroxylase that blocks the production of corticosterone (Jenkins et al., 1958). The role of glucocorticoid depletion was analyzed by comparisons between metyrapone- and vehicle-treated rats.

## 2. Results

### 2.1. Effects of treatments on the heat load groups and the linked variables

Metyrapone and PEG rats were similarly distributed considering heat load groups (Table 1;  $\chi^2=1.34$ ,  $p=0.25$ ). Ref- $T_{co}$  values were lower ( $\text{HL}_2$  and  $\text{HL}_3$ ,  $p<0.001$ ), and  $T_{co}$  variations greater ( $\text{HL}_2$ ,  $p<0.05$  and  $\text{HL}_3$ ,  $p<0.001$ ) in Metyrapone rats than in PEG rats. No difference was observed in End- $T_{co}$ , heat exposure duration and  $\text{AUC}_{40.4}$  values between Metyrapone and PEG rats in the  $\text{HL}_2$  and  $\text{HL}_3$  groups (Table 1).

### 2.2. Effects of heat load on peripheral and brain responses

In PEG rats, differences among heat load groups were observed for corticosterone ( $p<0.001$ ), hematocrit ( $p<0.001$ ), glucose ( $p<0.05$ ), lactate ( $p<0.001$ ), Hsp70-1 ( $p<0.001$ ), Hsp70-2 ( $p<0.001$ ) IL-1 $\beta$  ( $p<0.01$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p<0.01$ ). In Metyrapone rats, differences were observed in corticosterone ( $p<0.001$ ), hematocrit ( $p<0.05$ ), glucose ( $p<0.001$ ), lactate ( $p<0.001$ ),

**Table 1 – Values of End- $T_{co}$ ,  $T_{co}$  variation, heat exposure duration and AUC<sub>40.4</sub> in HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups**

	HL <sub>2</sub>		HL <sub>3</sub>	
	PEG	Metyrapone	PEG	Metyrapone
N	19	22	9	5
Ref- $T_{co}$ (°C)	38.5±0.1	37.7±0.1***	38.5±0.1	37.8±0.1***
End- $T_{co}$ (°C)	40.3±0.2	40.2±0.2	42.1±0.1	42.3±0.1
$T_{co}$ variation (°C)	1.6±0.2	2.5±0.3*	3.4±0.1	4.4±0.1***
Heat exposure duration (min)	25±2.7	29±3.2	52±2.2	53±2.6
AUC <sub>40.4</sub> (°C min)	2.3±0.8	2.5±0.9	28.5±2.6	28.9±2.3

Values are expressed as the mean±SEM. Comparisons were done using ANOVA and the significant difference between treatment groups is noted as \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001.

Hsp70-1 ( $p$ <0.001), Hsp70-2 ( $p$ <0.001) IL-1 $\beta$  ( $p$ <0.001) and TNF- $\alpha$  ( $p$ <0.01).

The HL<sub>1</sub> rats exhibited similar hematocrit and plasma lactate levels than the control animals (Figs. 1B and D). Plasma corticosterone concentration was increased after treatment injection (Fig. 1A, PEG:  $p$ <0.001 with Control vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001; Metyrapone:  $p$ <0.05 with Control vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001). Glycemia was increased only in HL<sub>1</sub> Metyrapone rats (Fig. 1C,  $p$ <0.001 with Control vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001). The HL<sub>1</sub> rats exhibited similar mRNA expressions than the control rats, except for TNF- $\alpha$ , which was decreased in PEG rats (Fig. 2D,  $p$ <0.01 with Control vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.01).

The HL<sub>2</sub> rats exhibited the same hematocrit and plasma glucose and lactate levels than the pair-treated HL<sub>1</sub> animals (Figs. 1B–D). Plasma corticosterone was further increased only in PEG rats (Fig. 1A,  $p$ <0.001 with HL<sub>2</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001). The HL<sub>2</sub> rats exhibited similar mRNA expressions than the pair-treated HL<sub>1</sub> rats (Fig. 2).

The characteristics of HL<sub>3</sub> rats differed from the HL<sub>1</sub> animals. The HL<sub>3</sub> rats were dehydrated, as suggested by higher hematocrit values (Fig. 1B, PEG:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001; Metyrapone:  $p$ <0.05 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.05). They also showed evidence of metabolic imbalance characterized by an increase in plasma lactate concentration (Fig. 1D, PEG:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001; Metyrapone:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001) and a decrease in glycemia in the Metyrapone rats (Fig. 1C, Metyrapone:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.01). As compared to HL<sub>1</sub> rats, HL<sub>3</sub> animals exhibited higher levels in Hsp70-1, Hsp70-2 mRNA (Figs. 2A and B, for mRNA expression; PEG:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001; Metyrapone:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001) and IL-1 $\beta$  mRNA expressions (Fig. 2C, PEG:  $p$ <0.01 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.01; Metyrapone:  $p$ <0.001 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.001). Brain TNF- $\alpha$  mRNA was increased in the HL<sub>3</sub> condition only in Metyrapone rats (Fig. 2D,  $p$ <0.01 with HL<sub>3</sub> vs. HL<sub>1</sub>,  $p$ <0.01).

### 2.3. Effects of treatments on peripheral and brain responses in each HL group

In HL<sub>1</sub> groups, Metyrapone rats exhibited lower plasma corticosterone levels (Fig. 1A,  $p$ <0.01) and hematocrit (Fig. 1B,  $p$ <0.05), higher glycemia (Fig. 1C,  $p$ <0.001), but similar plasma

lactate levels (Fig. 1D) compared with the PEG rats. No treatment difference was observed in any mRNA expression (Fig. 2).

In HL<sub>2</sub> groups, Metyrapone rats exhibited lower plasma corticosterone levels ( $p$ <0.001), higher glycemia ( $p$ <0.001), but similar hematocrit and plasma lactate levels than PEG rats. No treatment difference was observed in any mRNA expression. The Hsp70 mRNA expression was related to AUC<sub>40.4</sub> levels in PEG (Hsp70-1:  $r^2$ =0.90,  $p$ <0.001 and Hsp70-2:  $r^2$ =0.83,  $p$ <0.001) and Metyrapone rats (Hsp70-1:  $r^2$ =0.77,  $p$ <0.001 and Hsp70-2:  $r^2$ =0.87,  $p$ <0.001).

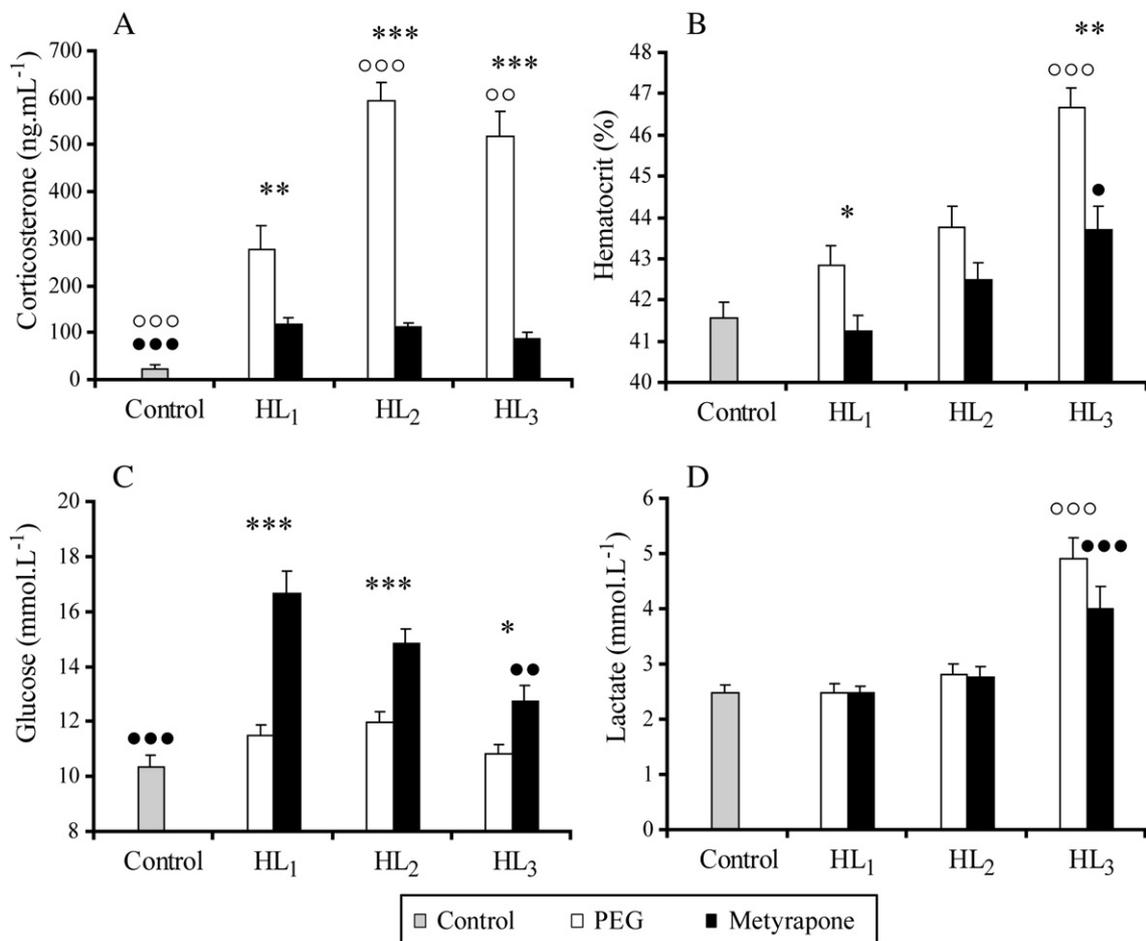
In HL<sub>3</sub> groups, Metyrapone rats exhibited lower plasma corticosterone levels ( $p$ <0.001) and hematocrit ( $p$ <0.01), higher glycemia ( $p$ <0.05), but similar plasma lactate levels than PEG rats. Brain TNF- $\alpha$  mRNA expression was higher in Metyrapone rats than in PEG rats ( $p$ <0.05), whereas other mRNA expressions were similar in both groups. No relationship was found between brain Hsp70 mRNA expression and AUC<sub>40.4</sub> in HL<sub>3</sub> groups, with an exception for Hsp70-2 in PEG rats ( $r^2$ =0.63,  $p$ <0.05).

## 3. Discussion

The major findings of this study are that rats with an intense heat load exhibited a metabolic imbalance, a high expression of brain Hsp70 mRNA and an inflammation. The glucocorticoid depletion did not modify Hsp70 mRNA expression but was associated with an increase in cytokine mRNA expression.

The Hsp70 mRNA expression can be considered as an early marker of cell reactivity to heat as it increases after a short heat exposure duration (Blake et al., 1990). During the shorter heat exposure durations, Hsp70 mRNA induction appeared to be directly driven by both local temperature and heat exposure duration since it was highly correlated to the heat load in HL<sub>2</sub> PEG rats. This is in agreement with studies that link Hsp70 mRNA level to  $T_{co}$  and heat exposure duration (Blake et al., 1990) and consider heat as the main trigger of Hsp70 (Kregel, 2002). However, this relationship disappeared in the more severely heated animals, i.e. HL<sub>3</sub> PEG rats. They exhibited a large increase in Hsp70 mRNA expression in the frontal cortex, which was not correlated to the heat load. This suggests that other factors may have triggered Hsp70 induction: (i) the metabolic imbalance (Kregel, 2002) revealed by lactate accumulation in blood (Zurovski et al., 1991) and (ii) the factors triggering local inflammation featured by the elevated IL-1 $\beta$  mRNA expression (Kregel, 2002). Therefore, the level of Hsp70 mRNA and its lack of relation with heat can be considered as a biomarker of injury in brain cells. However, this early reaction did not allow prediction of the final neuroprotection level, which depends on the Hsp70 proteins, which appear several hours afterwards (Maroni et al., 2003; Westman and Sharma, 1998). The time gap between cell aggression, inducing Hsp70 mRNA expression, and cell protection, due to Hsp70 protein expression, is at risk for heat survival.

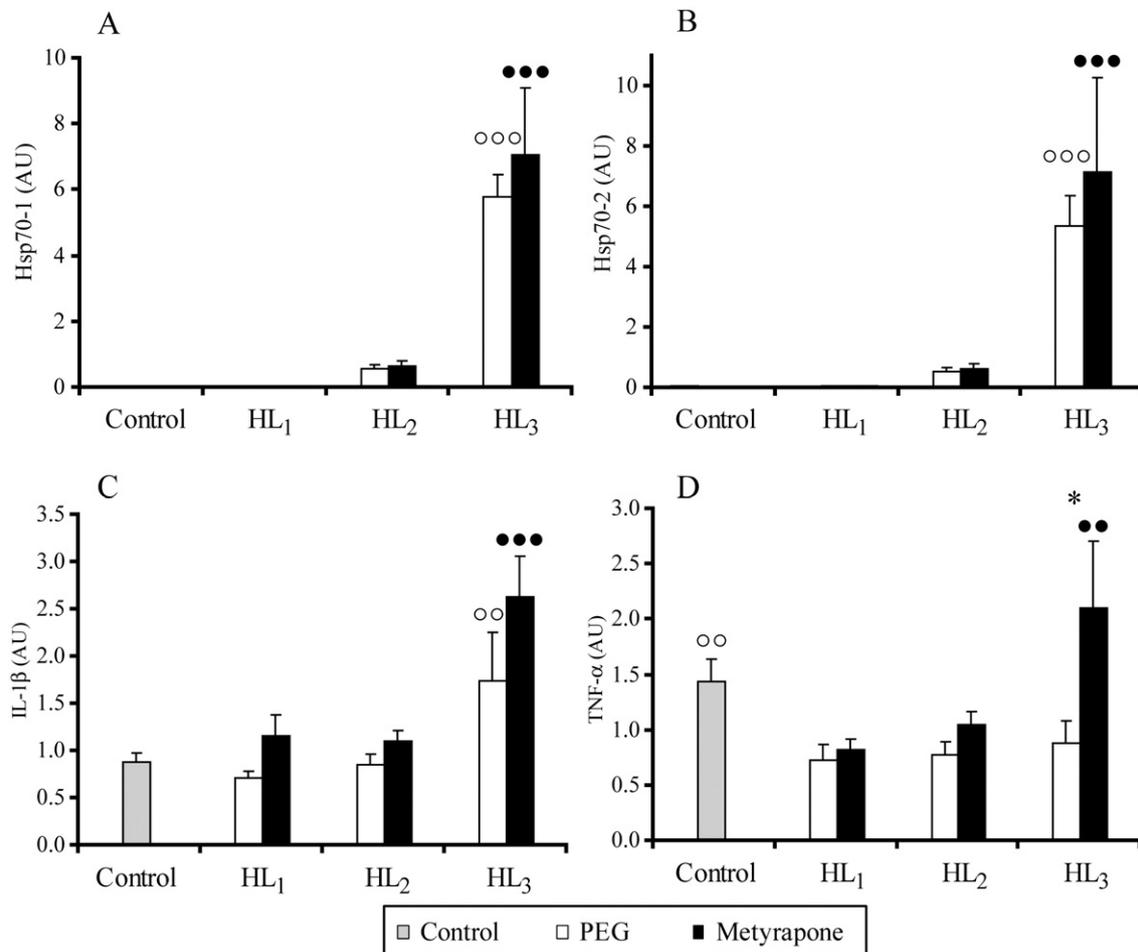
The role of glucocorticoids was analyzed in the Metyrapone rats. The exposure to stressors, such as handling, injections,  $T_{co}$  measurement (Briese and De Quijada, 1970) and heat exposure (Djordjevic et al., 2003; Leon et al., 2006), are known



**Fig. 1** – Plasma corticosterone concentrations (A), hematocrit (B), glycemia (C) and lactatemia (D) in non-treated (Control, ■), PEG (□) and Metyrapone (■) rats in HL<sub>1</sub>, HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups. Values are expressed as means ± SEM. Comparisons between Control and heat load groups under the same treatment were done using a one-factor ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. The significant difference from HL<sub>1</sub> PEG is noted as, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; and from HL<sub>1</sub> Metyrapone, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Comparisons between treatment groups were done using a one-factor ANOVA and the significant difference is noted as, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

to induce high blood glucocorticoid levels. Such a result was observed in PEG rats of our investigation, but not in Metyrapone rats, in which plasma corticosterone level was limited to 100 ng mL<sup>-1</sup>. However, metyrapone provokes also hyperglycemia (our results and those of Rotilant et al., 2002; Werner, 1988) and hypothermia. The latter, only observed in guinea pig (Werner, 1988), was partially blunted by exposing the rats at thermal neutrality. The lower Ref- $T_{co}$  suggests that metyrapone may interact with thermoregulation processes, at least in thermal neutrality condition. Conversely, metyrapone and PEG rats may have shared almost the same physiological and cerebral responses in heat conditions. They showed: (i) similar End- $T_{co}$  and AUC<sub>40,4</sub>, similar heat exposure duration and similar distribution in HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> risk groups. These results suggest that the thermal aggression to the organism was nearly the same between PEG and Metyrapone rats. However, Metyrapone rats exhibited a greater  $T_{co}$  variation. This could be explained either by true differences in thermophysiological responses to heat stress or by the lower Ref- $T_{co}$  values generating an increased thermal gradient between the

animals and the environment; (ii) similar blood lactate accumulation level in each HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups; and (iii) similar brain IL-1 $\beta$  mRNA expression level in HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups. The TNF- $\alpha$  mRNA expression was, however, higher in Metyrapone than in PEG rats in the HL<sub>3</sub> group. This may suggest that HL<sub>3</sub> Metyrapone rats were in a more advanced stage of the brain inflammatory process. This effect of metyrapone agrees with reports suggesting that glucocorticoids regulate the inflammatory response (Barnes, 1998; Smoak and Cidowski, 2004) and inhibit the synthesis and release of cytokines (Cato and Wade, 1996). Glucocorticoids inhibit TNF- $\alpha$  mRNA expression through the inhibition of transcriptional mechanisms (Almawi and Melemedjian, 2002). It may involve the glucocorticoid GR receptors since (i) the complex glucocorticoid GR receptor blocks the expression of TNF- $\alpha$  through the inhibition of transcriptional factors such as activator protein-1 or nuclear factor- $\kappa$ B (Almawi and Melemedjian, 2002; Barnes, 1998; Crinelli et al., 2000). This factor binds on specific sites of the TNF- $\alpha$  promoter to enhance its expression (Guha et al., 2000; Pope et al., 2000); (ii) our



**Fig. 2** – Relative quantity of Hsp70-1 (A), Hsp70-2 (B), IL-1 $\beta$  (C) and TNF- $\alpha$  (D) mRNA expressions in frontal cortex of non-treated (Control, ■), PEG (□) and Metyrapone (■) rats in HL<sub>1</sub>, HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Comparisons between Control and heat load groups under the same treatment were done using a one-factor ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. The significant difference from HL<sub>1</sub> PEG is noted as, \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001; and from HL<sub>1</sub> Metyrapone, \* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001. Comparisons between treatment groups were done using one-factor ANOVA and the significant difference is noted as, \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.

Metyrapone animals had limited glucocorticoid levels capable to saturate only the mineralocorticoid receptors (MRs).

It is noticeable that the metyrapone-induced limitation of plasma glucocorticoid level did not modify the Hsp70 mRNA expression, independently of the heat activation level. Such a result is not in contradiction with some data from the literature. In case of ischemia-reperfusion, methylprednisolone pretreatment did not modify the cardiac Hsp72 mRNA expression (Valen et al., 2000). In case of stress, the restraint-induced increase in Hsp70 mRNA expression was blocked by the complete inhibition of glucocorticoid secretion using dexamethasone in the adrenal, but not in the aorta (Udelsman et al., 1994). In the goldfish exposed to predator, glucocorticoid depletion using metyrapone inhibited the stress-induced increase in brain Hsp70 mRNA (Kagawa and Mugiya, 2002). In our experiments, a possible glucocorticoid depletion effect on Hsp70 mRNA expression was not masked by differences in body core temperature as no difference in  $T_{co}$  and  $AUC_{40.4}$  was observed between treatment groups

after heat exposure. Altogether, glucocorticoid level limitation by metyrapone may facilitate the brain inflammatory responses without any interaction with the Hsp70 protective response.

Our PEG animals could also be categorized into two different populations according to the cut-off defined by Hubbard et al. (1977). The HL<sub>2</sub> group assembled animals coping with the heat exposure and sharing similar reactions with the non heat-exposed HL<sub>1</sub> group. The HL<sub>3</sub> group assembled animals differing from the HL<sub>1</sub> rats by (i) an elevated hematocrit evocative of dehydration; (ii) a plasma lactate accumulation suggesting a metabolic imbalance (Zurovski et al., 1991); (iii) and an increase in brain IL-1 $\beta$  and Hsp70 mRNA. Since the HL<sub>3</sub> rats had an  $AUC_{40.4}$  above 20 °C min, they were assumed to be above the lethal threshold. Their brain IL-1 $\beta$  mRNA increase can thus be considered as a marker of the brain tissue suffering, which takes place earlier than clinical manifestations of heatstroke. Indeed, no HL<sub>3</sub> PEG rats were under heatstroke condition at

the end of heat exposure: they remained conscious, their  $End-T_{co}$  level was below the critical thermal maximum (Erskrine and Hutchison, 1982). In this case, the TNF- $\alpha$  mRNA increase should be considered as a marker of advanced brain suffering. The  $AUC_{40.4}$  criterion is thus a convenient tool allowing an early calibration of the heat exposure strength, far before the occurrence of heatstroke.

In conclusion, the original data reported in our study suggest that corticosterone synthesis inhibition by metyrapone may favor the expression of TNF- $\alpha$  mRNA independently to that of Hsp70 mRNA. Furthermore, the  $AUC_{40.4}$  criterion is of importance to calibrate the risk attached to a heat exposure.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Ninety-eight male Sprague-Dawley rats (Iffa Credo, Les Oncins, France), weighing 270–350 g were housed three per cage. Ambient temperature ( $T_a$ ) was set at  $22 \pm 1$  °C, relative humidity (RH) at  $50 \pm 10\%$ . The animals were submitted to a 12–12 h light–dark cycle with lights on at 08:00 a.m. Food and water were available *ad libitum*, except during the experimental sessions. The rats were allowed to adapt to laboratory conditions for at least 7 days prior to the beginning of the

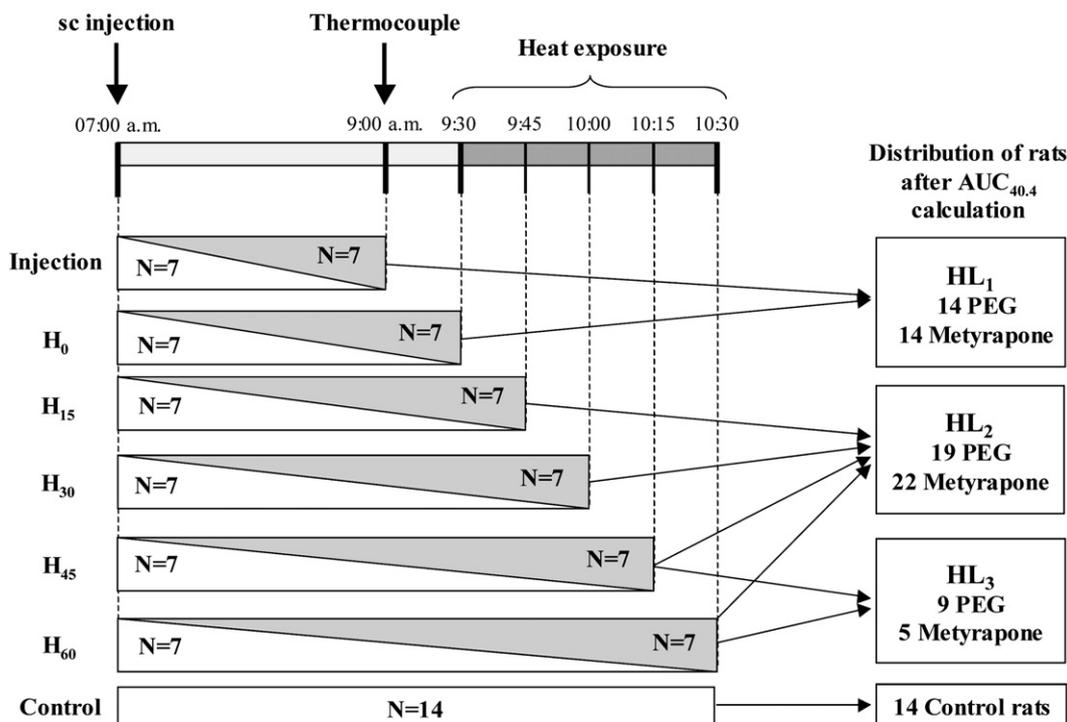
investigation. During this period, they were handled and weighed 5 days a week. All experimental procedures were reviewed and approved by the institutional Ethics Committee.

### 4.2. Drugs

Metyrapone (2-methyl-1,2-di(pyridine-3-yl)propan-1-one; Sigma, Saint Quentin, France) was freshly dissolved in a 40% solution of polyethylene glycol (PEG, Sigma, Saint Quentin, France) obtained by diluting PEG in 0.9% sterile saline. Metyrapone was then subcutaneously (s.c.) administered at a dose of  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  in 1.5 mL (Haleem et al., 1988; Roozendaal et al., 1996). Control animals received the same volume of the solvent solution.

### 4.3. Experimental design

The rats were randomly distributed into 13 experimental groups (Fig. 3). The animals belonging to the Control group ( $n=14$ ) stayed in their home cage and were not handled throughout the investigation. They were sacrificed at various time of the investigation. The 12 other groups (each one,  $n=7$ ) received either metyrapone (6 Metyrapone groups) or PEG (6 PEG groups). The 6 experimental conditions were defined as following: (i) The rats belonging to the two “Injection” groups experienced only the treatment injection. (ii) Those belonging



**Fig. 3** – Schema of experimental design, time course and heat load groups. The composition of the 13 experimental groups and the corresponding experimental time course are presented on the left side of the schema and the composition of the 3 heat load groups on the right side. The 13 experimental groups were composed as follows: a group of 14 Control rats, the 12 other groups were defined by a 2-level “treatment” factor: 7 PEG rats (white area) and 7 Metyrapone rats (grey area), and a 6-level “condition” factor: Injection,  $H_0$ ,  $H_{15}$ ,  $H_{30}$ ,  $H_{45}$  and  $H_{60}$ . At the end of the heat exposure, the same rats were redistributed in the 3 heat load groups based on the  $AUC_{40.4}$  criterion: a group of 14 Control rats, 2 groups of rats without any heat exposure, HL<sub>1</sub>: 14 PEG rats and 14 Metyrapone rats, 2 groups of rats with moderate heat load, HL<sub>2</sub>: 19 PEG rats and 22 Metyrapone rats and 2 groups of rats with intense heat load, HL<sub>3</sub>: 9 PEG rats and 5 Metyrapone rats.

to the H<sub>0</sub> groups experienced the treatment injection and the phase of colonic temperature ( $T_{co}$ ) measurement: they were exposed to stress, but not to heat. (iii) Those belonging to the H<sub>15</sub>, H<sub>30</sub>, H<sub>45</sub> and H<sub>60</sub> groups were exposed to heat during 15, 30, 45 and 60 min, respectively, in order to get various heat loads. Seven animals were studied during each experimental day, one rat being taken at random in each experimental condition (Control, Injection, H<sub>0</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>30</sub>, H<sub>45</sub> and H<sub>60</sub>) and independently of its treatment.

Preliminary to the investigation, the basal thermophysiological effects of 150 mg kg<sup>-1</sup> of metyrapone were checked. At 22 ± 1 °C  $T_a$ , the metyrapone-treated animals exhibited a slight hypothermia.

#### 4.4. Experimental time course

At 07:00 a.m., the rats were placed in individual cages with little of their own litter in order to reduce the environmental novelty stress. They received a s.c. injection of PEG or metyrapone, according to their treatment group. They were then left for a 2-h “Resting phase”. Since metyrapone would induce an hypothermia at  $T_a=22$  °C, two different  $T_a$  were used for the Resting phase: Metyrapone rats were kept at thermal neutrality ( $T_a=29$  °C, Gordon, 1990) to limit the metyrapone-induced hypothermia, while PEG rats remained at room temperature ( $T_a=22$  °C). At the end of the Resting phase, the Injection group rats were sacrificed. The other animals were equipped with a thermocouple inserted into the rectum at 6–7 cm from the anal margin to measure  $T_{co}$ . They spent then a further 30-min “Reference phase” at the same  $T_a$  than previously noticed. At the end, the rats were either sacrificed (H<sub>0</sub>) or transferred in another climatic chamber for a 15-, 30-, 45- or 60-min heat exposure at  $T_a=40$  °C and RH=40–50% (H<sub>15</sub>, H<sub>30</sub>, H<sub>45</sub>, H<sub>60</sub>). When heat exposure ended, the rats were immediately transferred into another room, where they were deeply anesthetized with a 100% O<sub>2</sub> ventilation containing 4% of halothane (Laboratoire Belmont, Paris, France). Blood samples were taken by intracardiac puncture and transferred into heparinized tubes kept in ice until centrifugation. Plasma was isolated by centrifugation (4 °C, 4500×g for 7 min) and stored at –80 °C until analysis. Brains were quickly removed and dissected on an ice bed. Frontal cortex samples were removed, weighed and placed in Eppendorf tubes containing 500 µL of RNAlater (Ambion, Courtabeuf, France). Samples were maintained at 4 °C during 24 h to give time for the RNAlater to permeate tissues. They were then stored at –20 °C until analysis.

#### 4.5. Physiological data management

$T_{co}$  was measured every 5 s throughout the investigation. Values were averaged over 30 min to obtain the Reference phase (Ref- $T_{co}$ ) mean values and over 30 s to characterize the thermophysiological state at the beginning (Early- $T_{co}$ ) and at the end of heat exposure (End- $T_{co}$ ). Heat-induced  $T_{co}$  variations were calculated as the difference between Early- $T_{co}$  and End- $T_{co}$ .

The animals were then categorized according to the intensity of experienced heat stress. As already stated, heat

load was defined as the area under the  $T_{co}$  time course curve (AUC) and expressed in degree minute (°C min). For running rats, a positive AUC above a threshold (AUC<sub>threshold</sub>) set at  $T_{co}=40.4$  °C defined an intense heat stress with a risk of death within 24 h. Thus, heat load was calculated in each rat according to the following formula (Hubbard et al., 1977):

$$AUC_{40.4} = \sum((T_{co} \text{ exceeding } 40.4) - 40.4)/12.$$

The resting rats experiencing heat loads exceeding 20 °C min over that threshold (AUC<sub>40.4</sub>) exhibit the same risk and thus were assumed to be severely heat-stressed (Hubbard et al., 1977). Consequently, our rats were distributed into four groups (Fig. 3): (i) Control rats representing physiological situation devoid of stress; (ii) HL<sub>1</sub> rats without any heat exposure (Injection and H<sub>0</sub> groups); (iii) HL<sub>2</sub> animals without any lethal risk (AUC<sub>40.4</sub> < 20 °C min); and (iv) HL<sub>3</sub> rats presenting a lethal risk (AUC<sub>40.4</sub> ≥ 20 °C min).

#### 4.6. Plasma assessments

Hematocrit was measured after centrifugation ( $T_a$ , 12,000 rpm for 5 min) using hematocrit capillaries (Haematokrit Kapillaren, Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany). Plasma corticosterone concentrations were determined using a specific radioimmunoassay kit (ICN Biomedicals, Strasbourg, France). Plasma glucose and lactate were assayed on Hitachi 912 Analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France) using enzymatic colorimetric method with Roche™ reagents (Roche Diagnostics, Meylan, France). All analyses were performed according to the manufacturer’s instructions.

#### 4.7. Molecular biology assessment

##### 4.7.1. mRNA isolation and reverse transcription (RT)

The frontal cortex samples were homogenized (200 mg mL<sup>-1</sup>) with a Mixer Mill MM300 (Rescht, Haan, Germany) in guanidine thiocyanate lysis buffer (buffer RLT, Qiagen, Courtaboeuf, France; 30 Hz, 2 min; 2 tungsten 2 mm carbide beads). Lysates were stored at –80 °C until mRNA extraction.

The extraction of mRNA was carried out on the MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with Isolation Kit II (tissue) from 40 µL of lysate (8 mg of tissue). A 50 µL final volume of mRNA was eluted for each sample.

Reverse transcription was immediately performed using the Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). The reaction was carried out from 4 µL of mRNA (0.6 mg of tissue) with 50 µM Oligo d(T)15 primer and RNase inhibitor (2 UI). The cDNA was stored at –80 °C until use.

##### 4.7.2. Primer design

The two genes, Hsp70-1 and Hsp70-2, coding for the Hsp70 protein were analyzed (Akçetin et al., 1999). The primer design and its optimization regarding the primer dimmer, the self-priming formation and the primer melting temperature were performed with MacVector software (Accelrys, San Diego, USA). The specificities of the polymerase chain reaction (PCR) amplification were documented with the LightCycler melting curve analysis as previously described (Peinnequin et al.,

2004). The melting peaks obtained either from the RT-product and from the specific recombinant DNA were identical. The oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec (Saraing, Belgium).

The selected forward (F) and reverse (R) primers were the following: Heat Shock Protein 70-1 (HSP70-1): F: 5'-ACCATC-GAGGAGGTGGATTAGAGG-3' and R: 5'-ACCAGCAGCCATCAA-GAGTCTGTC-3' generating a 77-base pair (bp) DNA fragment (GenBank Accession No. X77207); HSP70-2: F: 5'-TT-TCTTGCATGGTGGCTCAC-3' and R: 5'-TTCACACACTGGG-GAACAAGTGC-3' generating a 95-bp DNA fragment (GenBank Accession No. X77208); interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ): F: 5'-CACC-TCTCAAGCAGAGCACAG-3' and R: 5'-GGGTTCATGG-TGAAGTCAAC-3' generating a 79-bp DNA fragment (GenBank Accession No. NM\_031512); tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ): F: 5'-AAATGGGCTCCTCTCATCAGTTC-3' and R: 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGGTACGAC-3' generating a 111-bp DNA fragment (GenBank Accession No. NM\_012675); cyclophilin A (CycA): F: 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3' and R: 5'-CTTCTTGGTGGTCTTGGCATTCC-3' generating a 127-bp DNA fragment (GenBank Accession No. NM\_017101); hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT): F: 5'-CTCATG-GACTGATTATGGACAGGAC-3' and R: 5'-GCAGGTCAGCA-AAGAACTTATAGCC-3' generating a 123-bp DNA fragment (GenBank Accession No. NM\_012583).

#### 4.7.3. Real-time PCR

PCR was carried out with the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using 0.25  $\mu$ L of cDNA (15  $\mu$ g of tissue), in a 20  $\mu$ L final volume, 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.4  $\mu$ M of each primer (final concentration). Quantitative PCRs were performed using the same LightCycler for 50 cycles of 95 °C for 20 s (denaturation), 58 °C (CycA, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), 60 °C (HSP70-2, HPRT), 62 °C (HSP70-1) for 5 s (annealing temperature, which is primer dependent) and a final step of 8 s at 72 °C (elongation). The amplification specificity was checked using the melting curve. The crossing point (C<sub>p</sub>) values were calculated from LightCycler Software v.3.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using the second derivative maximum method. The quantification was achieved using a pool of cDNA samples as calibrator (Peinnequin et al., 2004), according to the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001). The relative mRNA values were calculated with the RelQuant software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The normalization was performed by geometric averaging of two internal control genes (CycA and HPRT) (Vandesompele et al., 2002). The validity of internal genes was checked a posteriori in our own investigation. The CycA and HPRT genes were affected neither by the treatment nor by the environmental conditions.

#### 4.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Statistica 6.0 software (Statsoft-France, Maison-Alfort, France). The differences between heat load groups (Control, HL<sub>1</sub>, HL<sub>2</sub>, HL<sub>3</sub>) were analyzed for each treatment using one-factor ANOVA. If necessary, the ANOVA was followed by Dunnett's post hoc tests using HL<sub>1</sub> as reference since it corresponded to the rat status immediately preceding heat exposure. Then, treatment

effects were studied in each of the three heat load groups (HL<sub>1</sub>, HL<sub>2</sub>, HL<sub>3</sub>) using one factor analysis of variance (ANOVA). The relationship between relative Hsp70 mRNA expression and AUC<sub>40,4</sub> value was analyzed in each heat load group using a correlation test. The homogeneity of treatment repartition in HL<sub>2</sub> and HL<sub>3</sub> groups was carried out using a  $\chi^2$ -square test. The significance level was set at  $p < 0.05$ . Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Acknowledgments

We are indebted to R. Carter for his advice on the manuscript, N. Fidler and R. Maury for their skilled technical assistance, J. Denis and V. Leroux for corticosterone analysis, C. Cruz for cytokine analysis and C. Mouret for her guidance in RT-PCR measures. This work was supported by grants from the French Service de Santé des Armées.

## REFERENCES

- Akcecin, Z., Pregla, R., Darmer, D., Heynemann, H., Haerting, J., Brömme, H.-J., Holtz, J., 1999. Differential expression of heat shock proteins 70-1 and 70-2 mRNA after ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *Urol. Res.* 27, 306–311.
- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leuk. Biol.* 71, 9–15.
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.* 94, 557–572.
- Blake, M.J., Gershon, D., Fargnoli, J., Holbrook, N.J., 1990. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. *J. Biol. Chem.* 265, 15275–15279.
- Bligh, J., Johnson, K.G., 1973. Glossary of terms for thermal physiology. *J. Appl. Physiol.* 35, 941–961.
- Briese, E., De Quijada, M.G., 1970. Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol. Lat. Am.* 20, 97–102.
- Cato, A.C., Wade, E., 1996. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BioEssays* 18, 371–378.
- Crinelli, R., Antonelli, A., Bianchi, M., Gentilini, L., Scaramucci, S., Magnani, M., 2000. Selective inhibition of NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol. Dis.* 26, 211–222.
- Djordjevic, J., Cvijic, G., Davidovic, V., 2003. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiol. Res.* 52, 67–72.
- Erskine, D.J., Hutchison, V.H., 1982. Critical thermal maxima in small mammals. *J. Mammal.* 63, 267–273.
- Fleshner, M., Campisi, J., Amiri, L., Diamond, D.M., 2004. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1142–1152.
- Gordon, C.J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963–991.
- Guha, M., Bai, W., Nadler, J.L., Natarajan, R., 2000. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 17728–17739.
- Haleem, D.J., Kennet, G., Curzon, G., 1988. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.* 458, 339–347.

- Hubbard, R.W., Bowers, W.D., Matthew, W.T., Curtis, F.C., 1977. Rat model of acute heatstroke mortality. *J. Appl. Physiol.* 42, 809–816.
- Hung, C.-H., Chang, N.-C., Cheng, B.-C., Lin, M.-T., 2005. Progressive exercise preconditioning protects against circulatory shock during experimental heatstroke. *Shock* 23, 426–433.
- Jenkins, J.S., Meakin, J.W., Nelson, D.H., Thorn, G.W., 1958. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* 128, 478–480.
- Kagawa, N., Mugiya, Y., 2002. Brain HSP70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator. *Zool. Sci.* 19, 735–740.
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80, 183–201.
- Kregel, K.C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177–2186.
- Lee, W.C., Wen, H.C., Chang, C.P., Chen, M.Y., Lin, M.T., 2006. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J. Appl. Physiol.* 100, 2073–2082.
- Leon, L.R., Blaha, M.D., Dubose, D.A., 2006. Time course of cytokine, corticosterone and tissue injury response in mice during heat strain recovery. *J. Appl. Physiol.* 100, 1400–1409.
- Li, P.-L., Chao, Y.-M., Chan, S.H.H., Chan, J.Y.H., 2001. Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarius confers cardiovascular protection during heatstroke. *Circulation* 103, 2114–2119.
- Li, F.C.H., Chan, J.Y.H., Chan, S.H.H., Chang, A.Y.W., 2005. In the rostral ventrolateral medulla, the 70-kDa heat shock protein (HSP70), but not HSP90, confers neuroprotection against fatal endotoxemia via augmentation of nitric-oxide synthase I (NOS I)/protein kinase G signaling pathway and inhibition of NOS II/peroxynitrite cascade. *Mol. Pharmacol.* 68, 179–192.
- Lin, M.T., Kao, T.Y., Jin, Y.T., Chen, C.F., 1995. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the heat stroke-induced neuronal damage by reducing the cerebral ischemia in rats. *Brain Res. Bull.* 37, 595–598.
- Liu, C.-C., Chien, C.-H., Lin, M.-T., 2000. Glucocorticoids reduce interleukin-1 $\beta$  concentration and result in neuroprotective effects in rat heatstroke. *J. Physiol.* 527, 333–343.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method. *Methods* 25, 402–408.
- Maroni, P., Dandinelli, P., Tiberio, L., Rovetta, F., Piccoletti, R., Schiaffonati, L., 2003. In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation. *Mol. Brain Res.* 119, 90–99.
- Ohara, K., Furuyama, F., Isobe, Y., 1975. Prediction of survival time of rats in severe heat. *J. Appl. Physiol.* 38, 724–729.
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., Agay, D., Chancerelle, Y., Multon, E., 2004. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 5 (3), 1–10.
- Pope, R., Mungre, S., Liu, H., Thimmapaya, B., 2000. Regulation of TNF- $\alpha$  expression in normal macrophages: the role of C/EBP $\beta$ . *Cytokine* 12, 1171–1181.
- Rooszendaal, B., Carmi, O., McGaugh, J.L., 1996. Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1429–1433.
- Rotllant, D., Ons, S., Carrasco, J., Armario, A., 2002. Evidence that metyrapone can act as stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur. J. Neurosci.* 16, 693–700.
- Smoak, K.A., Cidlowski, J.A., 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* 125, 697–706.
- Udelsman, R., Blake, M.J., Stagg, C.A., Holbrook, N.J., 1994. Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression in vivo. *Surgery* 115, 611–616.
- Valen, G., Kawakami, T., Tähepõld, P., Dumitrescu, A., Löwbeer, C., Vaage, J., 2000. Glucocorticoid pretreatment protects cardiac function and induces heat shock protein 72. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 279, H836–H843.
- Vandesompele, J., De preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 0034.1–0034.11.
- Wang, Z.-Z., Wang, C.-L., Wu, T.-C., Pan, H.-N., Wang, S.-K., Jiang, J.-D., 2001. Autoantibody response to heat shock protein 70 in patients with heatstroke. *Am. J. Med.* 111, 654–657.
- Wang, J.-L., Ke, D.-S., Lin, M.-T., 2005. Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion. *Shock* 23, 161–167.
- Werner, R., 1988. Effect of metopirone-ditartrate on thermogenesis in the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C, 445–450.
- Westman, J., Sharma, H.S., 1998. Heat shock protein response in the central nervous system following hyperthermia. In: Westman, J., Sharma, H.S. (Eds.), *Prog. Brain Res.*, vol. 115, Amsterdam, pp. 207–239.
- Wright, G., Knecht, E., Wasserman, D., 1977. Colonic heating patterns and the variation of thermal resistance among rats. *J. Appl. Physiol.* 43, 59–64.
- Yang, Y.-L., Lu, K.-T., Tsay, H.-J., Lin, C.-H., Lin, M.-T., 1998. Heat shock protein expression protects against death following exposure to heatstroke in rats. *Neurosci. Lett.* 252, 9–12.
- Zurovski, Y., Eckstein, L., Horowitz, M., 1991. Heat stress and thermal dehydration: lactatemia and plasma volume regulation. *J. Appl. Physiol.* 71, 2434–2439.



## II. *Expérimentation 2 : stress et tolérance à la chaleur*

Les résultats partiels de cette expérimentation ont été publiés dans *Neuroscience* [330], sous le titre « Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment ».

### A. Objectifs et hypothèses

Les objectifs de cette expérimentation sont (i) de déterminer si l'intolérance à la chaleur peut être expliquée par une activation de l'axe HPA de manière inappropriée, (ii) de définir les tableaux d'intolérance et *a contrario* de tolérance à la chaleur chez des animaux exposés non contraints à la chaleur pour un stress calibré en durée, (iii) de déterminer s'il est possible de prévoir le statut tolérant ou intolérant et, selon quels critères. Ce dernier objectif est encore à l'état de résultats complémentaires en cours de rédaction.

### B. Protocole

Le protocole précis de l'expérimentation, le chronogramme et les méthodes de calcul utilisées sont précisés en annexe 3 (page 185). Afin de s'extraire de toute contrainte ou biais méthodologiques, aucun traitement n'est administré, le suivi de la température corporelle profonde (température abdominale,  $T_{abd}$ ) et de l'activité locomotrice est réalisé par télémétrie sans aucune manipulation des animaux, et la durée d'exposition au chaud est la même pour tous les animaux (90 min). L'expérimentation comprend donc seulement deux groupes d'animaux, l'un exposé à la chaleur (68 rats,  $T_a = 40^\circ\text{C}$ ) et l'autre servant de contrôle (12 rats,  $T_a = 22^\circ\text{C}$ ).

Les 80 animaux sont distribués *a posteriori* de l'expérimentation dans quatre groupes à l'aide d'une méthode statistique de classification (k-moyennes) qui minimise la variabilité intra-groupe et maximise la variabilité inter-groupes. La classification est basée sur la variable de  $T_{abd}$  finale représentant un bon indice du niveau de tolérance à la chaleur. Les groupes de rats ainsi formés se composent de la manière suivante : (i) un groupe Contrôle composé des 12 rats exposés à  $T_a = 22^\circ\text{C}$  ; (ii) un groupe Tolérant (Tol,  $n=30$ ) comprenant les rats exposés au chaud présentant les plus faibles valeurs de  $T_{abd}$  finale ; (iii) un groupe Médian (Med,  $n=24$ ) composé des rats exposés au chaud présentant des valeurs intermédiaires de  $T_{abd}$  finale ; (iv) un groupe d'Intolérant (HE,  $n=14$ ) incluant les rats exposés au chaud ayant atteint les valeurs de  $T_{abd}$  finale les plus élevées.

L'état clinique ainsi que le niveau d'activation de l'axe HPA, reflété par l'ACTH et la corticostérone plasmatiques sont étudiés dans chacun des groupes formés *a posteriori*. Les mécanismes sous-jacents de ces deux aspects sont analysés dans l'hypothalamus et l'hypophyse par l'expression des ARNm suivants : le CRF dans l'hypothalamus, la POMC dans l'hypophyse, les IEGs, c-fos, c-jun et EGR1, la MCIP1 pour la signalisation calcique, les Hsp70-1 et 2 pour la réponse de choc thermique et les médiateurs de la réponse inflammatoire tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'I $\kappa$ B $\alpha$ .

## C. Résultats

Les animaux Tol montrent une légère déshydratation, une mobilisation modérée des tryglycérides et une forte activation de l'axe HPA témoignée par la forte élévation d'ACTH et de glucocorticoïdes plasmatiques. A l'inverse, les animaux HE sont sévèrement déshydratés et présentent un déséquilibre métabolique de part l'élévation du lactate sanguin et la forte diminution des triglycérides. Ils présentent aussi une moindre sécrétion d'ACTH et de glucocorticoïdes que les rats Tol. En dépit d'une forte activation cellulaire témoignée par l'élévation des ARNm c-fos, les rats HE ne montrent pas d'augmentation significative des ARNm POMC. Enfin, une activation pro-inflammatoire est mise en évidence par l'augmentation des ARNm IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  associée à une réduction des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$ .

## D. Résultats complémentaires

### 1. Objectifs

L'objectif est de déterminer la possibilité d'une prédiction précoce du groupe de tolérance, donc du risque de CC, sur la base de variables mesurées (i) avant l'exposition à la chaleur ou (ii) dans les phases précoces de l'exposition à la chaleur. L'hypothèse fondamentale est que les animaux les plus réactifs au stress sont les animaux dont la tolérance à la chaleur sera la plus faible en raison d'une charge allostasique excédant leur capacité de faire face.

Pour atteindre ces objectifs, nous utilisons les groupes préalablement isolés en analysant quels furent leurs comportements psychophysiologiques durant les phases d'hébergement et d'exposition à la chaleur. L'analyse des données de T<sub>abd</sub> et d'activité locomotrice des animaux, enregistrées en continu tout au long de l'expérimentation sert de base de travail. En effet, ces variables sont sensibles aux conditions stressantes (hyperthermie de stress [53, 62] et hyperactivité de stress [198, 427]).

### 2. Prédiction sur le comportement pré-expérimental

#### a. Hypothèse

La plus grande réactivité aux stressseurs est recherchée sur la base (i) de rythmes circadiens de T<sub>abd</sub> et d'activité plus ou moins amples [324]; (ii) une hyperthermie de stress et une hyperactivité locomotrice plus prononcées lors des évènements stressants constitués par les pesées journalières.

#### b. Résultats

Aucune différence de T<sub>abd</sub> et d'activité locomotrice n'est observée entre les groupes en condition de base et de stress. Cependant, le signal recueilli au cours de la phase d'hébergement était très perturbé et de médiocre qualité. Il est donc difficile de conclure à une absence certaine de différence entre les animaux tolérants et intolérants à la chaleur quant à leur état de base et leur stressabilité.

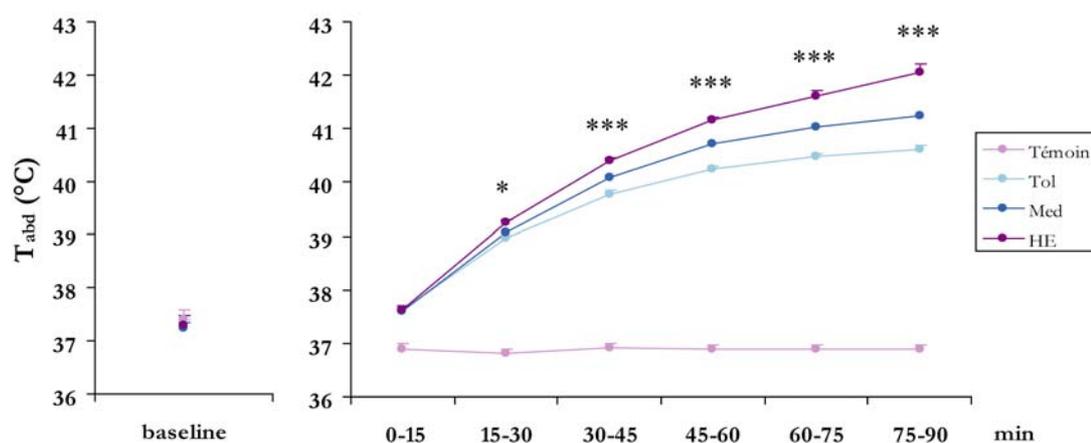
### 3. Phase d'exposition à la chaleur

#### a. Hypothèse

La plus grande réactivité au stress chaud est recherché sur la base (i) d'une augmentation plus rapide de  $T_{abd}$ , (ii) d'une augmentation plus rapide de l'activité locomotrice spontanée. Cependant les données de la littérature concernant l'activité locomotrice à la chaleur sont rares. Une augmentation de l'activité locomotrice observée juste avant le CC [74] peut être interprétée comme un comportement d'échappement, évocateur d'une anxiété, voire d'une peur [198, 427].

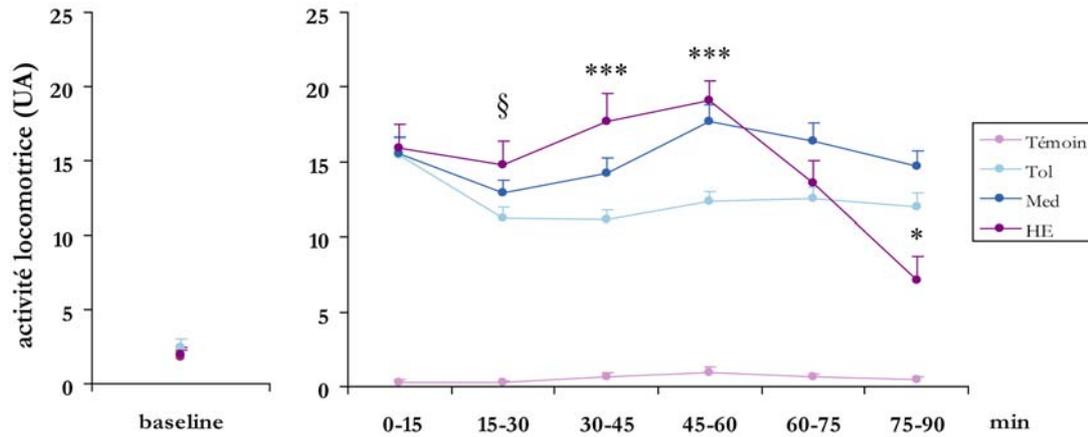
#### b. Résultats

La  $T_{abd}$  diverge entre les groupes dès 15 min d'exposition à la chaleur et avec un parallélisme surprenant des courbes (Figure 23).



**Figure 23 :** Température abdominale ( $T_{abd}$ ) de base (valeur moyenne des 60 min précédant l'exposition à la chaleur) et tout au long de l'exposition à la chaleur (valeurs moyennes sur 6 périodes de 15 min) des 4 groupes d'animaux. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  ESM. Les étoiles symbolisent les différences significatives ( $P < 0,001$ ) entre les groupes Tol et HE (Test *post-hoc* de Bonferroni après ANOVA à un facteur sur chaque période de temps).

L'activité locomotrice diverge également selon les groupes d'animaux dès les 30 premières minutes d'exposition à la chaleur (Figure 24). Ceci témoigne d'une différence de réactivité comportementale précoce synchronique au stress chaud : les animaux intolérants à la chaleur présentent une activité plus élevée jusqu'à 60 min de l'exposition par rapport aux animaux tolérants, alors que les animaux médians se trouvent dans une position intermédiaire. A partir de 60 min, l'activité des animaux intolérants chute pour atteindre une valeur inférieure à celle des animaux tolérants dans les 15 dernières min.



**Figure 24 :** Activité locomotrice de base (valeur moyenne des 60 min précédant l'exposition à la chaleur) et tout au long de l'exposition à la chaleur (valeurs moyennes sur 6 périodes de 15 min) des 4 groupes d'animaux. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  ESM. Les étoiles symbolisent les différences significatives ( $P < 0,001$ ) et le caractère § symbolise une tendance ( $P < 0,10$ ) entre les groupes Tol et HE (Test *post-hoc* de Bonferroni après ANOVA à un facteur sur chaque période de temps).

## E. Conclusion

Cette expérimentation permet de proposer les conclusions suivantes :

- L'intolérance à la chaleur est associée à une altération de l'activation de l'axe HPA : les animaux les plus tolérants ont l'activation la plus forte de l'axe HPA et les animaux intolérants l'activation la plus faible. Il n'est pas possible de déterminer clairement le niveau déficient de l'axe HPA. Ceci suggère que la valeur de l'activation de l'axe HPA sous contrainte soit réellement la limitation de la réactivité psychophysiologique. L'hyperactivation locomotrice des animaux les moins tolérants est un argument en faveur de cette hypothèse.
- Les animaux intolérants à la chaleur sont définis par les mêmes critères que lors de l'expérimentation précédente : déséquilibre métabolique (hyperlactatémie), déshydratation, activation inflammatoire ou levée de l'inhibition glucocorticoïdergique.
- Il est difficile de déterminer le statut de stress des animaux intolérants : (i) ont-ils présenté un défaut d'activation de l'axe HPA tout au long de l'exposition au stresser ? ou (ii) ont-ils présenté un excès d'activation de l'axe HPA avec un épuisement ? (iii) ont-ils présenté une activation initiale normale suivie d'un épuisement précoce ? Ces trois possibilités d'évolution aboutissent à un même statut pouvant être qualifié de stress dépassé en fin d'exposition à la chaleur.
- Il est possible de prédire le risque de CC sur la base du comportement à la chaleur. Cette conclusion rejoint des données épidémiologiques observées chez l'homme (*i.e.*, motivation à poursuivre comme facteur de risque de CC [57, 383]) ou des données expérimentales notées chez le rat (*i.e.*, absence d'arrêt de la course chez les animaux allant faire un CCE [48]).

- Le mécanisme par lequel les glucocorticoïdes contrôlent l'expression de l'inflammation cérébrale passe par l'activation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . L'activation de la voie NF- $\kappa$ B est donc capitale dans l'émergence de l'intolérance à la chaleur.

## **F. Perspectives**

Si cette expérimentation a permis de montrer la réalité de la variabilité inter-individuelle et de la relation entre tolérance à la chaleur et stress, elle n'a pas permis de mettre en évidence les mécanismes par lesquels la variabilité inter-individuelle s'exprime et les relations avec la réactivité aux stressors psychologiques. Existe-t-il un unique pattern de sensibilité à la contrainte ? Une expérimentation classifiant les animaux *a priori* selon des techniques éthologiques et de phénotypes d'expression de récepteurs pourrait être envisagée.

## **G. Article Neuroscience**



## DECREASED HEAT TOLERANCE IS ASSOCIATED WITH HYPOTHALAMO–PITUITARY–ADRENOCORTICAL AXIS IMPAIRMENT

V. MICHEL,<sup>a\*</sup> A. PEINNEQUIN,<sup>b</sup> A. ALONSO,<sup>b</sup>  
A. BUGUET,<sup>c</sup> R. CESPUGLIO<sup>c</sup> AND F. CANINI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Département des Facteurs Humains, Pôle de Neurophysiologie du Stress, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées Emile Pardé, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, F-38702 La Tronche Cédex, France

<sup>b</sup>Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France

<sup>c</sup>Université Claude-Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine, EA 4170 Radicaux Libres, Substrats Énergétiques et Physiopathologie Cérébrale, 8 Avenue Rockefeller, F-69373 Lyon, France

**Abstract**—When rats are exposed to heat, they adapt themselves to the stressor with a wide inter-individual variability. Such differences in heat tolerance may be related to particularities in the hypothalamo–pituitary–adrenocortical (HPA) axis activation. To further this hypothesis, 80 rats instrumented with a telemetric device for abdominal temperature ( $T_{abd}$ ) measurement were separated into two groups. Sixty-eight rats were exposed during 90 min at an ambient temperature of 40 °C, and 12 rats to an ambient temperature of 22 °C. Heat-exposed rats were then divided into three groups using the a posteriori k-means clustering method according to their  $T_{abd}$  level at the end of heat exposure. Heat tolerant rats (Tol,  $n=30$ ) exhibiting the lowest  $T_{abd}$  showed a slight dehydration, a moderate triglyceride mobilization, but the highest plasma adrenocorticotrophic-hormone (ACTH) and corticosterone levels. Conversely, heat exhausted rats (HE,  $n=14$ ) presented the highest  $T_{abd}$ , a higher degree of dehydration, a greater metabolic imbalance with the lowest plasma triglyceride level and the highest lactate concentration, as well as a lowest plasma corticosterone and ACTH levels. The fact that the proopiomelanocortin (POMC) mRNA content within the pituitary was low despite of a high c-fos mRNA level is also relevant. Current inflammatory processes in HE rats were underlined by lower inhibitory factor  $\kappa B\alpha$  ( $I\kappa B\alpha$ ) mRNA and higher tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA. In conclusion, data show that intolerance to heat exposure is associated to an HPA axis impairment, possibly related to changes occurring in the  $I\kappa B\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA levels. © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. Tel: +33-4-76-63-69-49; fax: +33-4-76-63-69-45. E-mail address: vmichel@crssa.net (V. Michel).

**Abbreviations:** ACTH, adrenocorticotrophic-hormone; ANOVA, analysis of variance; AP-1, activator protein-1; CRF, corticotropin releasing factor; CycA, cyclophilin A; EDTA, ethylene-diamine-tetraacetic acid; EGR1, early growth response 1; HE, heat exhausted; HPA, hypothalamo–pituitary–adrenocortical; HPRT, hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase; Hsp, heat shock protein; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ;  $I\kappa B\alpha$ , inhibitory factor  $\kappa B\alpha$ ; MCIP1, myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1; Med, medium heat tolerant; PCR, polymerase chain reaction; POMC, pro-opiomelanocortin; PVN, paraventricular nucleus; r.h., relative humidity; RT, reverse transcription; S.E.M., standard error of the mean;  $T_a$ , ambient temperature;  $T_{abd}$ , abdominal temperature;  $T_{co}$ , body core temperature; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Tol, heat tolerant.

**Key words:** rat, heat exhaustion, body core temperature, corticosterone, ACTH, inflammatory processes.

When exposed to heat, some subjects do not develop any pathological condition while others become slightly or severely ill (Bouchama and Knochel, 2002). Mild symptoms are represented by heat exhaustion with a slightly elevated body core temperature ( $T_{co} < 40$  °C), intense thirst, weakness, discomfort and anxiety (Bouchama and Knochel, 2002). Severe evolution leads rarely to heatstroke with a  $T_{co}$  above 40 °C, CNS disturbances and cardiovascular shock (Bouchama and Knochel, 2002). In the rat, heat tolerance varies considerably among individuals (Ohara et al., 1975; Wright et al., 1977). Under similar heat exposure conditions, the  $T_{co}$  time course follows either one of three patterns (Wright et al., 1977): a linear and sustained  $T_{co}$  increase until death occurs (type I), a rapid then slower  $T_{co}$  increase (type II) or a more common triphasic pattern (type III). The latter is characterized by an initial  $T_{co}$  increase, a subsequent plateau stabilized at diverse  $T_{co}$  levels and a final  $T_{co}$  rise until death. Therefore, according to the  $T_{co}$  pattern and a given heat exposure duration, some rats may develop heatstroke, while others may not. Heat tolerance can thus be evaluated through the level of  $T_{co}$  reached at the end of a given heat exposure. However, high  $T_{co}$  represents only one of the aspects of the heat-induced illness. Other factors include dehydration (Zurovski et al., 1991; Nakajima et al., 1998; Whyte et al., 2004), metabolic imbalance (Zurovski et al., 1991) and systemic inflammation (Lin et al., 1995; Leon et al., 2006). Such observations raise the question of the mechanisms underlying vulnerability to heat and development of heat-related illnesses in certain individuals.

Heat exposure constitutes a stressor, i.e. a stimulus triggering biological stress reactions (McEwen, 2005). The heat-exposed brain is fully activated, as suggested by the increase in c-fos mRNA and protein in different brain regions including the hypothalamus, the thalamus and the amygdala (Lin et al., 1999). Large releases have been reported in hippocampal norepinephrine (Lieberman et al., 2005), hypothalamic dopamine and serotonin (Lin, 1997) and striatal glutamate (Chang et al., 2004). The hypothalamo–pituitary–adrenocortical (HPA) axis is also mobilized as suggested by the increase in Fos-positive cells (Cham et al., 2006) and c-fos mRNA content (Tsay et al., 1999) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), as well as the increase in blood adrenocorticotrophic-hormone (ACTH) and corticosterone concentrations (Curé, 1988; Djordjevic et al., 2003). Furthermore, the HPA axis mobilization is accompanied by the activation of the sym-

pathetic axis, as suggested by the increase in plasma norepinephrine and epinephrine concentrations (Gisolfi et al., 1991; Kregel et al., 1991).

According to the above reports, we hypothesized that inter-individual heterogeneity in heat tolerance could be associated with differences in stress reactions. Such differences could be expressed in terms of HPA axis activation levels. In other words, the animals with the highest  $T_{\infty}$  would exhibit an inadequate HPA axis mobilization, whereas heat tolerant (Tol) animals would benefit from an adequate HPA axis control. To test this hypothesis, naive unstressed conscious rats were exposed to a standardized heat exposure (40 °C for 90 min). They were classified using an a posteriori k-means clustering method to separate Tol (lowest final  $T_{\infty}$ ) from non-Tol rats (highest  $T_{\infty}$ ). The clinical state and HPA axis activation level were described in each group. The mechanisms underlying both aspects were thereafter analyzed by employing the quantified variations occurring in pituitary and hypothalamic mRNA levels for: (i) hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF) and pituitary pro-opiomelanocortin (POMC), (ii) immediate-early gene (IEG: c-jun, c-fos and the early growth response 1, EGR1), (iii) calcium signaling pathway (myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1, MCIP1), (iv) heat shock response (heat shock protein, Hsp70-1 and Hsp70-2) and (v) inflammatory mediators (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ; inhibitory factor  $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Eighty male Sprague–Dawley rats (Iffa Credo, Les Oncins, France), weighing 250–350 g were selected. Immediately after arrival, they were allowed to adapt to laboratory conditions for at least 7 days. During this phase, they were housed at three per cage and kept in standard conditions: food and water available *ad libitum*, ambient temperature ( $T_a$ ) set at  $22 \pm 1$  °C, relative humidity (r.h.) at  $50 \pm 10\%$ , 12-h light/dark cycle with light on at 7:00 a.m. They were also handled and weighed 5 days a week to reduce handling stress (Briese and De Quijada, 1970). At the end of this adaptation period, a telemetric sensor was implanted to measure the abdominal temperature ( $T_{abd}$ ). The surgical act was followed by a 10-day recovery period, during which the rats were placed in individual cages in the same experimental conditions as previously described. Procedures involving animals and their care were conducted in compliance with French laws on laboratory animals, which in turn are in compliance with international laws and policies [European Union Directive of 24 November 1986 (86/609/EU) and Decree of 20 October 1987 (87-848/EU)]. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

### Surgical procedures and data telemetric acquisition

The monitoring and data-collecting system consisted of implantable radiotelemetry devices (Physiotel® TA10TAF40, Data Sciences, St. Paul, MN, USA), remote receivers and computer-based data acquisition systems (Dataquest IV, Data Sciences). The sensor was surgically implanted in the rats' abdominal cavity under a profound pentobarbital anesthesia (Sanofi-Adventis, Paris, France, 60 mg·kg<sup>-1</sup>). A sagittal abdominal incision was made. The telemetric device was placed in the peritoneal cavity;

muscles and skin were then stitched up. After surgery, the rats were placed in individual cages with a postsurgical antibiotic (Ex-tencilline®, Sanofi-Adventis, 60,000 IU per rat, i.p.) and an analgesic (Finadine®, Schering-Plough, Segre, France, 1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) therapy. The data acquisition system was started immediately after surgery to monitor the clinical recovery.  $T_{abd}$  was recorded throughout the investigation as measure means over 10-s periods every min during the experimental session and every 2 min during the recovery phase.

### Experimental design

After the recovery period, the 80 rats were randomly distributed into two groups: neutrality ( $n=12$ ) and heat ( $n=68$ ). Each experimental session was performed between 8:00 and 11:00 a.m. To avoid handling stress, the rats belonging to the heat group were transferred in their home cages into a climatic chamber for a 90-min period of heat exposure ( $T_a=40$  °C; r.h.= $50 \pm 10\%$ ). The rats belonging to the neutrality group stayed in their home cage under housing conditions without being handled. Food and water were removed during heat or neutral exposure. On each experimental day, one neutrality rat and five heat rats were included. At the end of the neutral or heat exposure, the rats, still in their cage, were immediately transferred into another room to be deeply anesthetized with a 100% O<sub>2</sub> ventilation containing 4% of halothane (Laboratoire Belmont, Paris, France). Under deep anesthesia, blood samples were taken by intra-cardiac puncture, put into tubes containing either heparin or EDTA (ACTH dosage), and kept in ice until centrifugation. The plasma was isolated by centrifugation (4 °C, 4500×g for 7 min) and stored at  $-80$  °C until analysis. The rats were then decapitated. Their brains were quickly removed and dissected on an ice bed. The whole median hypothalamus and the pituitary gland were removed, weighed and put into Eppendorf tubes containing 500  $\mu$ l of RNAlater® (Ambion, Cortalboeuf, France). Samples were maintained at 4 °C during 24 h in order to give the RNAlater the time to permeate tissues. They were then stored at  $-20$  °C until analysis.

### Physiological data management

The 90-min heat or neutral exposure period was described using the first (initial  $T_{abd}$ ) and last (final  $T_{abd}$ )  $T_{abd}$  measurements. The 80 rats were a posteriori distributed into four groups reflecting their level of heat tolerance according to final  $T_{abd}$ . The classification was done using the Statistica 6.0 software (Statsoft-France, Maison-Alfort, France) by the k-means clustering method, which minimizes variability within groups and maximizes variability between groups. The four groups were separated as follows: (i) control group made of the 12 neutrality rats; (ii) Tol group ( $n=30$ ) composed of heat-exposed rats having the lowest final  $T_{abd}$ , i.e. the Tol rats; medium heat tolerant (Med) group ( $n=24$ ) including the heat-exposed rats reaching medium final  $T_{abd}$ ; and the heat exhausted or HE group ( $n=14$ ) comprising heat-exposed rats that reached the highest final  $T_{abd}$ .

### Plasma assessment

Hematocrit was measured with hematocrit capillaries (Hematokrit Kapillaren, Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany) after centrifugation ( $T_a$ , 12,000 r.p.m. for 5 min). Plasma corticosterone and ACTH were assayed using specific radioimmunoassay kits (ICN Biomedicals, Strasbourg, France for corticosterone and MP Diagnostics, Illkirch, France for ACTH). Plasma proteins, lactate, glucose, triglycerides and glycerol were assayed on Hitachi 912 Analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the colorimetric method with Roche™ reagents (Roche Diagnostics) or with a specific kit for glycerol (Diffchamb, Lyon, France). All analyses were performed according to manufacturers' instructions.

## Molecular biology assessment

**mRNA isolation and reverse transcription (RT).** The samples were homogenized ( $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) with a Mixer Mill MM300 (Rescht, Haan, Germany) in guanidine thiocyanate lysis buffer (buffer RLT, Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions (30 Hz, 2 min; 2 tungsten 2 mm carbide beads (Qiagen)). The lysates were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the mRNA extraction.

The extraction of mRNA was carried out on the MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with an Isolation Kit II (tissue) from  $40 \mu\text{L}$  of lysate (8 mg of tissue). A  $50 \mu\text{L}$  final volume of mRNA was eluted for each sample.

RT was immediately performed using the Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). The reaction was carried out from  $4 \mu\text{L}$  of mRNA (0.6 mg of tissue) with  $50 \mu\text{M}$  Oligo d(T)15 primer and Rnase inhibitor (2 IU) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

**Primer design.** The primer design and its optimization regarding the primer dimmer, the self-priming formation and the primer melting temperature were done with MacVector software (Accelrys, San Diego, USA). The specificities of the PCR amplification were documented with the LightCycler melting curve analysis as previously described (Peinnequin et al., 2004). The melting peaks obtained from the RT-product and the specific recombinant DNA were identical. The oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec. The selected forward (FW) and reverse (RW) primer sequences are listed in Table 1.

**Real-time polymerase chain reaction (PCR).** The PCR was carried out with the Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science) using  $0.25 \mu\text{L}$  of cDNA ( $15 \mu\text{g}$

of tissue), in a  $20 \mu\text{L}$  final volume,  $4 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  and  $0.4 \mu\text{M}$  of each primer (final concentration). The quantitative PCRs were performed using LightCycler (Roche Applied Science) for 50 cycles of  $95^\circ\text{C}$  for 20 s (denaturation),  $53\text{--}62^\circ\text{C}$  for 5 s (annealing temperature, which is primer dependent, Table 1) and a final step of 8 s at  $72^\circ\text{C}$  (elongation). The amplification specificity was checked using the melting curve, following the manufacturer's instructions. The crossing point ( $C_p$ ) values were calculated from the Light Cycler Software v.3.5 (Roche Applied Science) using the second derivative maximum method. The quantification was achieved using a pool of cDNA samples as calibrator (Peinnequin et al., 2004), according to the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001). The relative mRNA values were calculated with the RelQuant software (Roche Applied Science). The normalization was performed by geometric averaging of three internal control genes (cyclophilin A (CycA), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) and  $\beta$ -actin) (Vandesompele et al., 2002).

The validity of internal genes was checked a posteriori in our own investigation. The CycA, HPRT and  $\beta$ -actin genes were not affected by environmental conditions.

## Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the Statistica 6.0 software (Statsoft-France).

Differences among the four a posteriori classified rat groups were analyzed using one factor factorial analysis of variance (ANOVA). If necessary, the ANOVA was followed by Bonferroni post hoc tests focusing on differences between control and each heat-exposed group, and differences between Tol and HE groups, except for the final  $T_{\text{abd}}$  variable in which comparisons were made in all couples. The significance level

**Table 1.** Forward (FW) and reverse (RW) primer sequences used for quantitative PCR assays

Gene	Accession number	5'–3' Primer sequence	Product size (bp)	Annealing temperature ( $^\circ\text{C}$ )
CycA	NM_017101	FW GGCAAATGCTGGACCAACAC RW CTTCCCAAAGACCACATGCTTG	94	56
HPRT	NM_012583	FW CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC RW GCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAGCC	123	60
$\beta$ -actin	NM_031144	FW TCAGGTCATCACTATCGGCAATG RW TTTTCATGGATGCCACAGGATTC	95	54
Hsp70-1	X77207	FW ACCATCGAGGAGGTGGATTAGAGG RW ACCAGCAGCCATCAAGAGTCTGTG	77	62
Hsp70-2	X77208	FW TTTCTTGATGGTGGCTCAC RW TTCACACACTGGGGAACAAGTGC	95	60
IL-1 $\beta$	NM_031512	FW CACCTCTCAAGCAGAGCACAG RW GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	79	58
TNF- $\alpha$	NM_012675	FW AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC RW TCTGCTTGGTGGTTGCTACGAC	111	58
I $\kappa$ B $\alpha$	XM_343065	FW AGCTGACCCTGGAAATCTTCAG RW CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG	115	57
MCIP1	NM_153724	FW GACTTTAACTACAATTTAGCTCCCTGAT RW TTGGCCCTGGTCTCACTTTC	80	60
c-fos	NM_022197	FW CGGAGAATCCGAAGGGAAAG RW TGGCAATCTCGGTCTGCAAC	136	55
c-jun	NM_021835	FW CAATGGGCACATCACCACTACAC RW TCTGGCTATGCAGTTTCAGCTAGG	122	61
CRF	NM_031019	FW TGGATCTCACCTTCCACCTTCTG RW TTCCTGTTGCTGTGAGCTTGC	85	58
POMC	NM_139326	FW TCACCACGGAAAGCAACCTG RW TTTTCAGTCAAGGGCTGTTTCATCTC	108	57
EGR1	NM_012551	FW CGAGCGAACAACCCTACGA RW CGTTATTTCAGAGCGATGTCAGAA	63	53

**Table 2.** Values of  $T_{abd}$  at the beginning (initial  $T_{abd}$ ) and at the end (final  $T_{abd}$ ) of heat exposure in control ( $n=12$ ), Tol ( $n=30$ ), Med ( $n=24$ ) and HE ( $n=14$ ) rat groups

Assay	Control	Tol	Med	HE
Initial $T_{abd}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	36.8 $\pm$ 0.1	37.1 $\pm$ 0.1	37.0 $\pm$ 0.1	37.0 $\pm$ 0.1
Final $T_{abd}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	36.9 $\pm$ 0.2	40.7 $\pm$ 0.1***	41.4 $\pm$ 0.0*** <sup>ooo</sup> <sup>fff</sup>	42.4 $\pm$ 0.1****+

Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Comparisons were done using factorial ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests.

\*\*\* Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.001$ ).

+++ HE group vs. Tol group ( $P<0.001$ ).

ooo Med group vs. Tol group ( $P<0.001$ ).

fff Med group vs. HE group ( $P<0.001$ ).

was set at  $P<0.05$  and the existence of a trend was considered if  $P<0.10$ . The data are presented as means $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.).

## RESULTS

### Physiological data

At the beginning of the investigation, initial  $T_{abd}$  values were similar in the four groups (Table 2). As a bias due to the a posteriori classification, heat-exposed rats exhibited higher final  $T_{abd}$  than control rats (Table 2;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ), HE rats presented higher final  $T_{abd}$  than Tol animals (HE vs. Tol,  $P<0.001$ ), and Med rats presented higher final  $T_{abd}$  than Tol animals (Med vs. Tol,  $P<0.001$ ) but lower final  $T_{abd}$  than HE animals (Med vs. HE,  $P<0.001$ ).

In comparison to control rats, heat-exposed animals exhibited elevated hematocrit values (Table 3;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and higher concentrations in plasma proteins (Table 3;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ), lactate (Table 3;  $P<0.001$  with Med vs. control,  $P<0.01$  and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and glycerol (Table 3;  $P<0.001$  with Med and HE vs. control,  $P<0.05$ ). However, heat-exposed animals exhibited a lower plasma triglyceride concentration than control rats (Table 3;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ). The HE rats differed from Tol rats in the fact that the former showed higher values in hematocrit (HE vs. Tol,  $P<0.001$ ), plasma concentrations of proteins (HE vs. Tol,  $P<0.001$ ) and lactate (HE vs. Tol,  $P<0.001$ ), but lower levels in plasma triglyceride concentration (HE

vs. Tol,  $P<0.001$ ). Glycemia was similar over the four groups.

The activity of the HPA axis was enhanced by heat exposure determining higher plasma concentrations of corticosterone and ACTH than in control conditions (Table 4; corticosterone,  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ; ACTH,  $P<0.001$  with Tol and Med vs. control,  $P<0.001$  and HE vs. control,  $P=0.06$ ). The HE rats had lower plasma corticosterone concentration than Tol animals (HE vs. Tol,  $P<0.001$ ). The plasma ACTH/corticosterone concentration ratio was equal in all groups (data not shown).

### Molecular biology data

Pituitary POMC mRNA level was slightly elevated in the Tol and Med rats compared with control animals (Table 4;  $P=0.05$  with Tol vs. control,  $P=0.08$  and Med vs. control,  $P=0.07$ ). However, Tol and HE rats did not differ in pituitary POMC mRNA content. The hypothalamic CRF mRNA level remained the same in the four groups.

Heat-exposed rats exhibited higher c-fos mRNA levels in both the hypothalamus (Fig. 1A<sub>1</sub>;  $P<0.001$  with Tol vs. control,  $P<0.01$ ; Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and the pituitary (Fig. 1A<sub>2</sub>;  $P<0.001$  with Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ). Among all heat-exposed animals, HE rats presented higher c-fos mRNA level than Tol rats (Fig. 1; HE vs. Tol,  $P<0.001$  in both regions). Similar heat-induced variations were observed for c-jun (data not shown) and EGR1 (data not shown).

**Table 3.** Plasma protein, lactate, glucose, triglyceride and glycerol concentrations and hematocrit in control ( $n=12$ ), Tol ( $n=30$ ), Med ( $n=24$ ) and HE ( $n=14$ ) rat groups at the end of heat exposure

Assay	Control	Tol	Med	HE
Protein ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	52.3 $\pm$ 0.9	61.1 $\pm$ 0.5***	60.9 $\pm$ 0.7***	65.2 $\pm$ 0.8****+
Hematocrit (%)	40.8 $\pm$ 0.5	44.9 $\pm$ 0.4***	46.2 $\pm$ 0.5***	50.2 $\pm$ 0.8****+
Lactate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2.3 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.7**	9.0 $\pm$ 1.1****+
Glucose ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	14.9 $\pm$ 1.0	17.4 $\pm$ 0.5	17.4 $\pm$ 0.9	18.3 $\pm$ 2.3
Triglycerides ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.0***	0.5 $\pm$ 0.0***	0.2 $\pm$ 0.0****+
Glycerol ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	142 $\pm$ 16	204 $\pm$ 13	247 $\pm$ 21*	251 $\pm$ 44*

Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Comparisons were done using ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests.

\* Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.05$ ).

\*\* Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.01$ ).

\*\*\* Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.001$ ).

+++ HE group vs. Tol group ( $P<0.001$ ).

**Table 4.** Plasma corticosterone and ACTH concentrations and relative quantity of pituitary POMC and hypothalamic CRF mRNAs in control ( $n=12$ ), Tol ( $n=30$ ), Med ( $n=24$ ) and HE ( $n=14$ ) rat groups at the end of heat exposure

Assay	Control	Tol	Med	HE
Corticosterone (ng·mL <sup>-1</sup> )	154±21	695±28***	617±28***	461±29****++
ACTH (pg·mL <sup>-1</sup> )	436±117	1687±157***	1929±188***	1281±188 <sup>§</sup>
POMC mRNA (AU)	0.78±0.08	1.03±0.05 <sup>§</sup>	1.05±0.06 <sup>§</sup>	1.04±0.09
CRF mRNA (AU)	0.86±0.05	0.89±0.04	0.82±0.04	0.88±0.11

Values are expressed as the mean±S.E.M. Comparisons were done using ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests.

<sup>§</sup> Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.10$ ).

\*\*\* Heat-exposed groups vs. control group ( $P<0.001$ ).

\*\*\*\*HE group vs. Tol group ( $P<0.001$ ).

Heat exposure also enhanced hypothalamic (Fig. 1B<sub>1</sub>;  $P<0.001$  with Tol vs. control,  $P<0.01$  and Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and pituitary (Fig. 1B<sub>2</sub>;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ) Hsp70-1 mRNA levels. Once again, HE rats exhibited higher Hsp70-1 mRNA level than Tol rats (HE vs. Tol,  $P<0.001$  in both regions). Similar observations were made on the Hsp70-2 mRNA in the hypothalamus and the pituitary gland.

As compared with control rats, heat-exposed animals exhibited increased MCIP1 mRNA levels in both the hypothalamus (Fig. 1C<sub>1</sub>;  $P<0.001$  with Tol, Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and pituitary (Fig. 1C<sub>2</sub>;  $P<0.001$  with Med vs. control,  $P<0.05$  and HE vs. control,  $P<0.001$ ). The HE rats also exhibited a higher MCIP1 mRNA level than Tol rats in both brain regions (hypothalamus,  $P<0.01$ ; pituitary,  $P<0.001$ ).

Compared with the control group, Med and HE rats had a higher IL-1 $\beta$  mRNA level in the hypothalamus (Fig. 2A<sub>1</sub>;  $P<0.001$  with Med vs. control,  $P<0.01$  and HE vs. control,  $P<0.001$ ) and pituitary (Fig. 2A<sub>2</sub>;  $P<0.001$  with Med and HE vs. control,  $P<0.001$ ). Similarly to observations made from the other analyses, HE rats presented a higher IL-1 $\beta$  mRNA level than Tol rats (HE vs. Tol,  $P<0.001$  in both regions).

In the hypothalamus and pituitary, TNF- $\alpha$  mRNA level was lower in Tol and, at a lesser extent, in Med rats than in control rats (hypothalamus, Fig. 2B<sub>1</sub>,  $P<0.001$  with Tol vs. control,  $P<0.001$  and Med vs. control,  $P=0.08$ ; pituitary, Fig. 2B<sub>2</sub>,  $P<0.001$  with Tol vs. control,  $P<0.01$ ). Conversely, heat-exposed rats showed higher levels in the I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA level than control rats in the hypothalamus (Fig. 2C<sub>1</sub>;  $P<0.001$  with Tol and Med vs. control,  $P<0.001$  and HE vs. control,  $P<0.05$ ) and pituitary (Fig. 2C<sub>2</sub>;  $P<0.001$  with Tol and Med vs. control,  $P<0.001$ ). Once again, HE and Tol rats differed in the fact that the former exhibited higher TNF- $\alpha$  and lower I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA levels than Tol rats (TNF- $\alpha$ : HE vs. Tol,  $P<0.001$  for both genes in both regions).

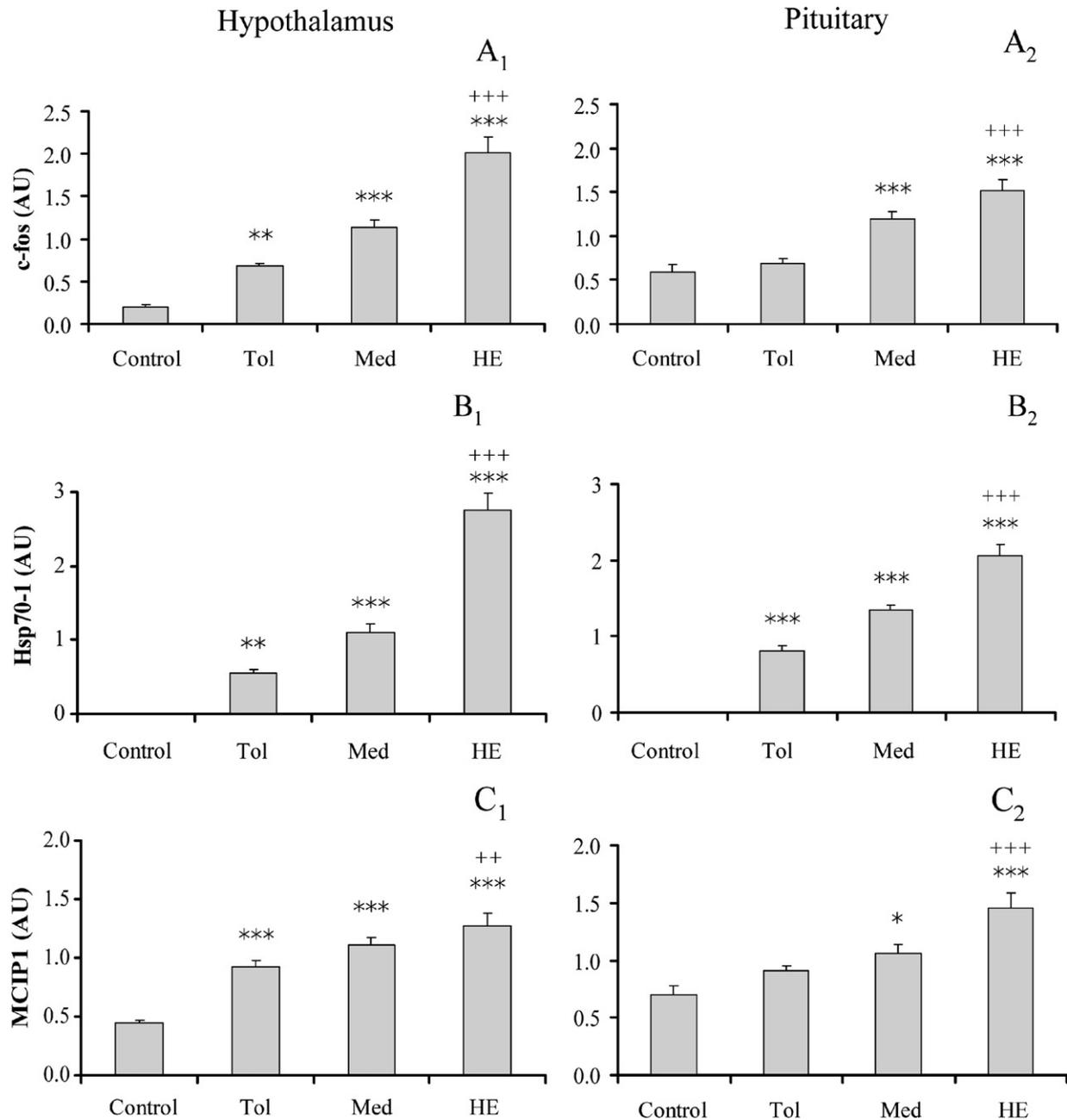
## DISCUSSION

In the present investigation, the rats submitted to a standardized heat exposure were segregated a posteriori into three groups according to their final  $T_{abd}$ . As expected, the animals showing the highest  $T_{abd}$  also developed a heat-induced disease concomitantly with a lower level of HPA

axis activation and a higher level of hypothalamic activation. Conversely, the rats with the lower  $T_{abd}$  remained healthy, presenting a high HPA axis activation associated with a blockade of hypothalamic and pituitary inflammation.

All heat-exposed rats were in a stressful condition as they presented an increased HPA axis activity (Selye, 1950; Natelson et al., 1986). However, those developing both a limited HPA axis activation and the highest final  $T_{abd}$  values at the end of heat exposure, also exhibited metabolic alterations. Firstly, dehydration was suggested by elevated plasma protein concentration and hematocrit. Secondly, energy mobilization was shown by the drastic drop in triglycerides and the increase in glycerol. Since triglyceride mobilization is likely to reflect catecholamine release (Coppack et al., 1994), a sympatho-adreno-medullary activation may be suspected in these rats. Such a decrease in plasma triglycerides concomitant to the increase in glycerol has also been observed in rats exposed to acute immobilization (Ricart-Jané et al., 2002). However, increased glycemia was reported after immobilization (Ricart-Jané et al., 2002), but not after heat exposure (our present results), suggesting an increased tissue consumption of glucose in the latter condition. This was confirmed by the increase in plasma lactate concentration evoking a shift toward anaerobic metabolism and consequently a systemic metabolic imbalance (Zurovski et al., 1991). Furthermore, plasma lactate accumulation has been reported to be strongly related to the rise in body temperature under conditions of heat stress and dehydration (Zurovski et al., 1991). Taken together, HPA activation, dehydration, exacerbated sympathetic activation and metabolic imbalance suggest that the rats with a high  $T_{abd}$  level were HE. They were thus in an advanced stage of stress, despite a short exposure to the stressor (Selye, 1950).

The heat-exposed rats with the lowest final  $T_{abd}$  had physiological measurements in contrast to rats with the highest final  $T_{abd}$ . They exhibited a larger increase in corticosterone, but a reduced level of dehydration and metabolic activation: plasma triglyceride concentration decreased in a lesser extent, while glycerol did not increase. Furthermore, the steady-state of plasma glucose level without any lactate accumulation suggests that the animals were not HE. This smaller sympathetic activation (Coppack et al., 1994), associated with the large corticosterone

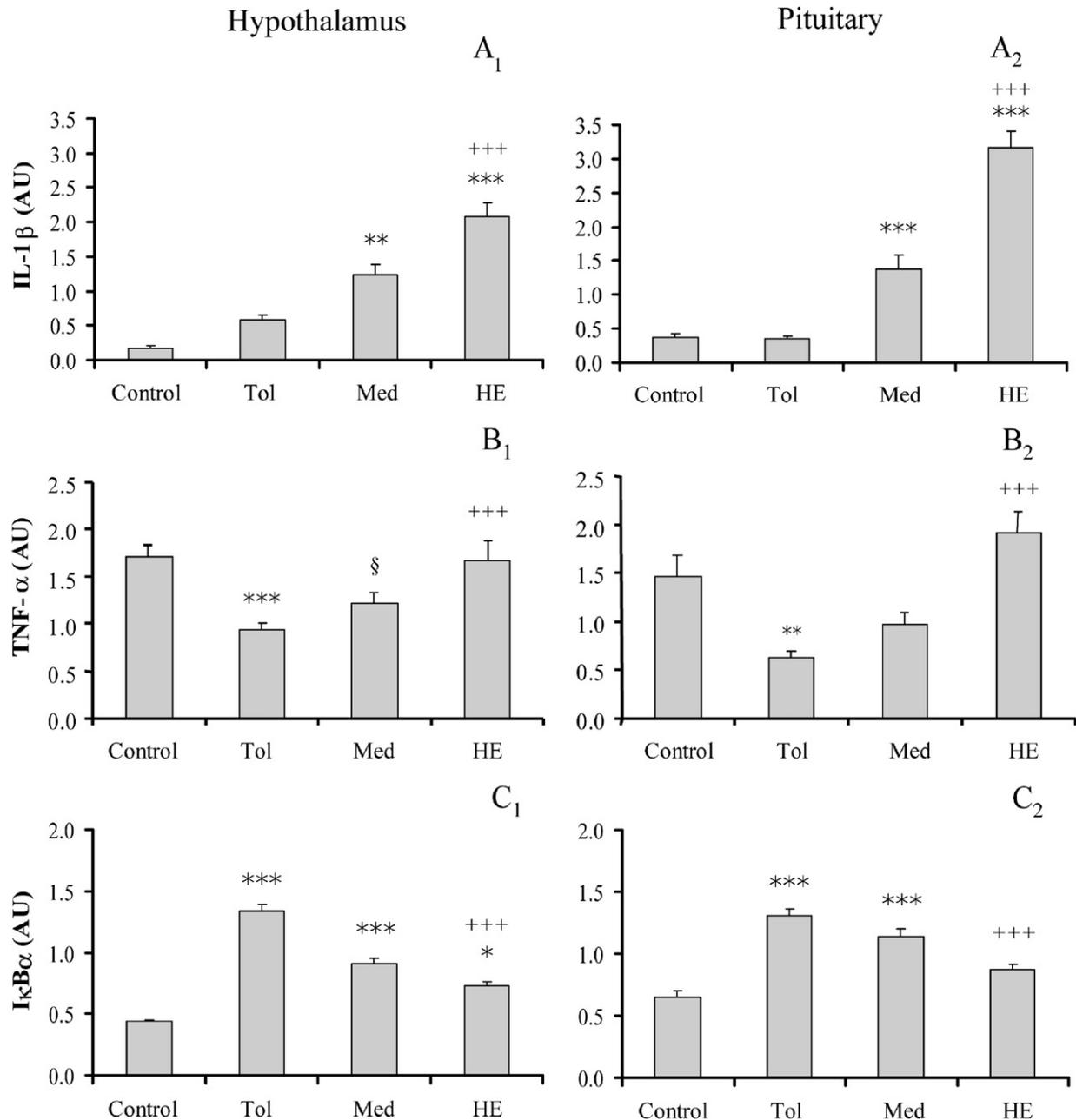


**Fig. 1.** Relative quantity of c-fos (A), Hsp70-1 (B) and MCIP1 (C) mRNAs in the hypothalamus (1) and pituitary (2) in control ( $n=12$ ), Tol ( $n=30$ ), Med ( $n=24$ ) and HE ( $n=14$ ) rat groups at the end of heat exposure. Comparisons were done using factorial ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests comparing heat-exposed groups to control group (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  and \*\*\*  $P<0.001$ ) and HE group vs Tol group (++  $P<0.01$  and +++  $P<0.001$ ). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

increase, suggests that they were at an early stage of heat stress. They can thus be considered as Tol animals.

These conclusions are strengthened by the differences in HPA axis mobilization levels observed in these two extreme groups of the a posteriori classification. Tol rats exhibited high plasma levels of corticosterone and ACTH, indicating a fully activated HPA axis. Conversely, HE rats presented lower plasma corticosterone and ACTH concentrations than Tol rats, suggesting either that HPA reactivity was dampened or that the HPA axis function was ex-

hausted. A defective adrenal function is unlikely to be the cause as the ACTH/corticosterone ratio was similar in Tol and HE rats. At the hypothalamic level, the CRF mRNA content was similar in all groups. However, the detection of the additional CRF mRNA may have been masked by a pre-existing CRF mRNA pool (Herman et al., 1992; Imaki et al., 1995; Ginsberg et al., 2003). In the pituitary gland, the POMC mRNA content was increased in all heat-exposed rats, although it varied greatly in HE rats. These arguments suggest that the HPA axis impairment ob-



**Fig. 2.** Relative quantity of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) and I $\kappa$ B $\alpha$  (C) mRNAs in the hypothalamus (1) and pituitary (2) in control ( $n=12$ ), Tol ( $n=30$ ), Med ( $n=24$ ) and HE ( $n=14$ ) rat groups at the end of heat exposure. Comparisons were done using factorial ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests comparing heat-exposed groups to control group (§  $P<0.10$ , \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  and \*\*\*  $P<0.001$ ) and HE group vs Tol group (+++  $P<0.001$ ). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

served in HE rats would not be the consequence of a localized brain functional breakdown.

The HPA axis activation impairment was further investigated by the assessment of other mRNA expressions. Cellular activation was indicated by the induction of immediate early genes such as c-fos (Chan et al., 1993; Hoffman et al., 1993). C-fos is known to increase after psychological and physical stress in the rat hypothalamus and pituitary (Senba and Ueyama, 1997; Autelitano, 1998) and during heat exposure in the hypothalamus of conscious

(Cham et al., 2006) or anesthetized rats (Lin et al., 1999; Tsay et al., 1999). Fos expression is dependent on the intensity of the acute heat stress (Harikai et al., 2003), restraint stress (Chowdhury et al., 2000) and audiogenic stress (Campeau and Watson, 1997). In case of a sustained 80-min heat exposure, c-fos mRNA content increases in the PVN during the first 40-min period and remains steady thereafter (Lin et al., 1999; Tsay et al., 1999). The c-fos mRNA content could be interpreted as a turnover with a swift induction (30 min, Autelitano, 1998;

Lin et al., 1999; Tsay et al., 1999) and an intense destruction featured by its short half-life (10–15 min, Sheng and Greenberg, 1990). It suggests therefore that a sustained c-fos mRNA expression occurs during heat exposure. The high hypothalamic and pituitary c-fos mRNA levels observed in HE rats could be interpreted as a sustained high-level cell activation. Similarly, the lower hypothalamic c-fos mRNA level in Tol rats could be representative from a low level cell activation. Such a conclusion is strengthened by the lack of a heat-induced c-fos mRNA content in the pituitary gland in Tol rats.

The PVN c-fos expression has been reported to be positively correlated with the magnitude of HPA axis responses to a 30-min psychological stressor exposition (Pace et al., 2005). Furthermore, activator protein-1 (AP-1) complex may up-regulate CRF (Senba and Ueyama, 1997) and POMC (Autelitano, 1998) gene expressions. In our investigation, Tol rats exhibited low c-fos activation together with a high level of terminal products of the HPA axis, i.e. ACTH and corticosterone. This discrepancy could be explained by the difference in time course between c-fos expression and HPA axis activation. Tol rats probably exhibited an early stress phase, followed by a corticosterone inhibitory feedback on c-fos expression (Fevurly and Spencer, 2004). This was not observed in HE rats having higher c-fos mRNA content with lower blood corticosterone and ACTH levels. In spite of reduced cell activation, Tol rats seemed therefore more efficient than HE rats as they produced higher levels of ACTH and corticosterone. This strengthens the hypothesis that HE rats may have experienced a HE HPA axis function rather than an insufficient global reactivity to heat stress.

The exhaustion of the HPA axis in HE rats in spite of high cellular activation could be due to an excess in deleterious stimuli such as free radical occurrence or excess in calcium influx. The former possibility is suggested by the Hsp70 mRNA increase in both the hypothalamus and pituitary. Although Hsp70 mRNA induction is triggered by heat, denatured proteins and free radicals (Welch, 1992; Calabrese et al., 2000), it is probable that denatured proteins and free radicals represented the main trigger, at least in HE rats. The sharper increase in Hsp70 mRNA observed in HE rats, as compared with the other groups, did not correlate linearly with the  $T_{abd}$  increase, suggesting that other physiological triggers occurred concomitantly. The hypothesis is supported by the high amount of MCIP1 mRNA expression reflecting both the calcium signaling pathway activation (Rothermel et al., 2003) and the presence of an oxidative stress (Crawford et al., 1997; Lin et al., 2003).

Alternatively, an occurrence of local inflammatory processes may also be considered since Tol rats did not have any IL-1 $\beta$  gene activation, whereas HE rats showed a high IL-1 $\beta$  mRNA level in the hypothalamus and pituitary. In Tol rats, the lack of IL-1 $\beta$  mRNA could be explained either by a lack of stimulation or by a repression of gene transcription. The slight hypothalamic increase in c-fos, MCIP1 and Hsp70 mRNA suggests that, in Tol rats, protein kinase C activators, high cyclic AMP and free radical concentra-

tions, calcium influx and AP-1 would initiate the IL-1 $\beta$  mRNA induction (Watkins et al., 1999). The lack of c-fos and MCIP1 mRNA induction in Tol rats' pituitary suggests that the stimulation of IL-1 $\beta$  mRNA was minimal. However, the high level of corticosterone observed in Tol rats would have blocked the existing induction since glucocorticoids are considered as potential inhibitors of inflammatory activity (Barnes, 1998; Watkins et al., 1999; Smoak and Cidlowski, 2004). Conversely, the high level of IL-1 $\beta$  mRNA observed in HE rats reflects intense stimulation together with a reduced inhibition, as evidenced by the higher content in c-fos, MCIP1 and Hsp70 mRNA and the lower plasma corticosterone level. This IL-1 $\beta$  mRNA increase was not accompanied by an enhancement in TNF- $\alpha$  mRNA level as compared with control rats. Since TNF- $\alpha$  protein levels are increased in the blood and brain of heatstroke rats (Lin et al., 1995; Leon et al., 2006), it can be assumed that HE rats had not reached heatstroke. The increase in I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA in all heat-exposed rats is not surprising as heat can induce I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA (Wong et al., 1999) through the heat shock responsive element in the I $\kappa$ B $\alpha$  promoter (Wong et al., 1997). The higher amount of I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA in Tol rats than in HE rats could be explained by the involvement of glucocorticoids in the I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA induction. High levels of glucocorticoids up-regulate the I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA after immobilization stress *in vivo* (Quan et al., 2000) as well as *in vitro* (Scheinman et al., 1995). Similarly to IL-1 $\beta$  cytokine and opposite to I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA expression, TNF- $\alpha$  mRNA may have been repressed in Tol rats by glucocorticoid inhibitory effects (Barnes, 1998; Smoak and Cidlowski, 2004). Indeed, TNF- $\alpha$  mRNA decreased in the Tol rats' hypothalamus and pituitary as compared with control rats and was consequently higher in HE rats than in Tol rats. On the contrary, the lack of inhibition together with the occurrence of higher stimulation by protein kinase C and free radicals (Jongeneel, 1994) led to an increase in the TNF- $\alpha$  mRNA level in the HE rats. Therefore, two physiological responses to the same heat stress became evident. (i) Tol rats exhibiting high I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA, low IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNAs as well as high corticosterone levels, were healthy. This suggests that a protective threshold may be assigned to the increased I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA level and glucocorticoids in a context of regulated stress. (ii) HE rats presenting lower I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA, higher IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNAs, but lower corticosterone level, expressed elevated metabolic rate and metabolic imbalance. This suggests a deficiency in the activation of protective mechanisms related to the exacerbation of deleterious mechanisms in a context of overwhelming stress. The actual role of HPA axis impairment in such a situation could be further studied by evaluating the impact of corticosterone supplementation on the probability of heat illness occurrence.

## CONCLUSION

In conclusion, 20% of rats exposed to heat in our conditions exhibited a heat intolerance characterized by elevated levels of  $T_{abd}$ , dehydration, metabolic imbalance and decreased HPA axis activation. The concom-

itance of limited HPA axis activation in spite of high hypothalamo-pituitary activation suggests that these animals were in an overwhelmed stress activation leaving room for inflammation.

*Acknowledgments*—We are indebted to N. Fidier and R. Maury for their skilled technical helps, J. Denis, L. Vachez-Colomb and V. Leroux for the corticosterone dosages, and C. Mouret for her advice. This work was supported by grants from the French Service de Santé des Armées.

## REFERENCES

- Autelitano DJ (1998) Stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AP-1 in hypothalamus and pituitary. *Brain Res Bull* 45:75–82.
- Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94:557–572.
- Bouchama A, Knochel JP (2002) Heat stroke. *N Engl J Med* 346:1978–1988.
- Briese E, De Quijada MG (1970) Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol Lat Am* 20:97–102.
- Calabrese V, Testa G, Ravagna A, Bates TE, Stella AMG (2000) HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 269:397–400.
- Campeau S, Watson SJ (1997) Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol* 9:577–588.
- Cham JL, Klein R, Owens NC, Mathai M, McKinley M, Badoer E (2006) Activation of spinally projecting and nitergic neurons in the PVN following heat exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:91–101.
- Chan RKW, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1993) A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGF-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci* 13:5126–5138.
- Chang C-K, Chiu W-T, Chang C-P, Lin M-T (2004) Effect of hypervolemic haemodilution on cerebral glutamate, glycerol, lactate and free radicals in heatstroke rats. *Clin Sci* 106:501–509.
- Chowdhury GMI, Fujioka T, Nakamura S (2000) Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull* 52:171–182.
- Coppack SW, Jensen MD, Miles JM (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* 35:177–193.
- Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, Davies KJA (1997) Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 342:6–12.
- Curé M (1988) Plasma corticosterone response in continuous versus discontinuous chronic heat exposure in rat. *Physiol Behav* 45:1117–1122.
- Djordjevic J, Cvijic G, Davidovic V (2003) Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiol Res* 52:67–72.
- Fevurly RD, Spencer RL (2004) Fos expression is selectively and differentially regulated by endogenous glucocorticoids in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the dentate gyrus. *J Neuroendocrinol* 16:970–979.
- Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL (2003) Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or Fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 15:1075–1083.
- Gisolfi CV, Matthes RD, Kregel KC, Oppliger R (1991) Splanchnic sympathetic nerve activity and circulating catecholamines in the hyperthermic rat. *J Appl Physiol* 70:1821–1806.
- Harikai N, Tomogane K, Sugawara T, Tashiro S-I (2003) Differences in hypothalamic Fos expressions between two heat stress conditions in conscious mice. *Brain Res Bull* 61:617–626.
- Herman JP, Schafer MKH, Thompson RC, Watson SJ (1992) Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6:1061–1069.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14:173–213.
- Imaki T, Xiao-Quan W, Shibasaki T, Yamada K, Harada S, Chikada N, Naruse M, Demura H (1995) Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *J Clin Invest* 96:231–238.
- Jongeneel VC (1994) Regulation of the TNF- $\alpha$  gene. *Prog Clin Biol Res* 388:367–381.
- Kregel KC, Overton JM, Johnson DG, Tipton CM, Seals DR (1991) Mechanism for pressor response to nonexertional heating in the conscious rat. *J Appl Physiol* 71:192–196.
- Leon LR, Blaha MD, DuBose DA (2006) Time course of cytokine, corticosterone and tissue injury response in mice during heat strain recovery. *J Appl Physiol* 100:1400–1409.
- Lieberman HR, Georgelis JH, Maher TJ, Yeghiayan SK (2005) Tyrosine prevents effects of hyperthermia on behavior and increases norepinephrine. *Physiol Behav* 84:33–38.
- Lin HY, Michtalik HJ, Zhang S, Andersen TT, Van Riper DA, Davies KKJA, Ermak G, Petti LM, Nachod S, Narayan AV, Bhatt N, Crawford DR (2003) Oxidative and calcium stress regulate DSR1 (Adapt78/MCIP1) protein. *Free Radic Biol Med* 35:528–539.
- Lin M-T (1997) Heatstroke-induced cerebral ischemia and neuronal damage. Involvement of cytokines and monoamines. *Ann N Y Acad Sci* 813:572–580.
- Lin MT, Kao TY, Jin YT, Chen CF (1995) Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the heat stroke-induced neuronal damage by reducing the cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull* 37:595–598.
- Lin M-T, Yang YL, Tsay H-J (1999) C-fos expression in rat brain during heat stress. *J Therm Biol* 24:423–427.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-DDC_T}$  method. *Methods* 25:402–408.
- McEwen BS (2005) Stressed or stressed out: what is the difference? *J Psychiatry Neurosci* 30:315–318.
- Nakajima Y, Nose H, Takamata A (1998) Plasma hyperosmolality and arterial pressure regulation during heating in dehydrated and awake rats. *Am J Physiol* 275:1703–1711.
- Natelson BH, Creighton D, McCarty R, Tapp WN, Pitman D, Ottenweller JE (1986) Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* 39:117–125.
- Ohara K, Furuyama F, Isobe Y (1975) Prediction of survival time of rats in severe heat. *J Appl Physiol* 38:724–729.
- Pace TWW, Gaylord R, Topczewski F, Girotti M, Rubin B, Spencer RL (2005) Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experience is not directly related to the stressfulness of that experience. *Eur J Neurosci* 22:1679–1690.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E (2004) Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 5:3.
- Quan N, He L, Lai W, Shen T, Herkenham M (2000) Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. *J Neurosci* 20:6473–6477.
- Ricart-Jané D, Rodriguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, Lopez-Tejero MD, Llobera M (2002) Immobilization stress alters

- intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51:925–931.
- Rothermel BA, Vega RB, Williams RS (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* 13:15–21.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS (1995) Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270:283–286.
- Selye H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *BMJ* 17:1383–1392.
- Senba E, Ueyama T (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the rat brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29:183–207.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477–485.
- Smoak KA, Cidlowski JA (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 125:697–706.
- Tsay H-J, Li H-Y, Lin C-H, Yang Y-L, Yeh J-Y, Lin M-T (1999) Heat-stroke induces c-fos expression in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 262:41–44.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
- Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF (1999) Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 $\beta$ : molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sci* 65:449–481.
- Welch JW (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72:1063–1081.
- Whyte DG, Thunhorst RL, Johnson AK (2004) Reduced thirst in old, thermally dehydrated rats. *Physiol Behav* 81:569–576.
- Wong HR, Ryan M, Wispé JR (1997) Stress response decreases NF- $\kappa$ B nuclear translocation and increases I- $\kappa$ B $\alpha$  expression in A549 cells. *J Clin Invest* 99:2423–2428.
- Wong HR, Ryan MA, Menendez IY, Wispé JR (1999) Heat shock activates the I- $\kappa$ B $\alpha$  promoter and increases I- $\kappa$ B $\alpha$  mRNA expression. *Cell Stress Chaperones* 4:1–7.
- Wright G, Knecht E, Wasserman D (1977) Colonic heating patterns and the variation of thermal resistance among rats. *J Appl Physiol* 43:59–64.
- Zurovski Y, Eckstein L, Horowitz M (1991) Heat stress and thermal dehydration: lactatemia and plasma volume regulation. *J Appl Physiol* 71:2434–2439.

(Accepted 24 April 2007)  
(Available online 24 May 2007)

### ***III. Expérimentation 3 : Développement d'une méthode de criblage pour l'analyse d'un grand nombre de gènes cibles en qRT-PCR en temps réel***

Ces données figurent dans un article soumis à Analytical Biochemistry, sous le titre « Target gene identification using quantitative real time PCR pool screening ».

#### **A. Objectifs**

La RT-PCR quantitative (RT-PCRq) en temps réel est la méthode de référence de quantification des ARNm en raison de sa précision, sa reproductibilité, sa sensibilité et sa spécificité. Cependant, un grand nombre de gènes est souvent impliqué dans tel processus physiologique ou pathologique à étudier et un grand nombre d'animaux souvent impliqué dans les expérimentations. Or, le dosage de la totalité des gènes sur tous les échantillons est très long et coûteux. Il est donc indispensable de déceler au préalable les gènes cibles les plus pertinents pour l'analyse des voies d'intérêt. Le but de ce travail est de développer une méthode de criblage rapide et économique. Elle repose sur l'hypothèse selon laquelle le regroupement de tous les échantillons d'un groupe expérimental (pool d'échantillons) est équivalent à la moyenne de tous les échantillons de ce groupe.

#### **B. Matériel de travail**

##### ***4. Méthode de travail***

La quantification des ARNm par RT-PCRq nécessite plusieurs étapes : (i) broyage des échantillons ; (ii) extraction des ARNm ; (iii) transcription des ARNm en ADNcomplémentaire ; (iv) quantification par réaction de polymérisation en chaîne. La standardisation de toutes ces étapes est indispensable pour une quantification de qualité : tous les échantillons doivent être traités de la même manière. De plus, la dernière étape nécessite une normalisation : dosage de tous les échantillons de gènes de référence ou gènes rapporteurs (gènes pour lesquels l'expression est stable quelques soient les conditions), auquel est rapporté le dosage des gènes d'intérêt ou gènes cibles. Si la standardisation et la normalisation sont parfaites, alors les quantités de gènes de référence sont identiques dans tous les échantillons. Il en découle alors une égalité de la valeur mesurée sur pool d'échantillons avec la moyenne des valeurs mesurées sur tous les échantillons.

La standardisation et la normalisation ne pouvant être parfaites, la moyenne de tous les échantillons d'un groupe expérimental diffère de la valeur du pool de ce groupe. Plus la standardisation et la normalisation seront de qualité, plus la valeur de pool se rapprochera de la moyenne de tous les échantillons. Autrement dit, la capacité de prédiction de la valeur de pool dépend de la qualité de la standardisation et la normalisation. Cette méthode de criblage impose donc la quantification des gènes

cibles sur les pools uniquement et la quantification des gènes de référence sur la totalité des échantillons pour juger la qualité de la standardisation.

Le but de la méthode est d'attribuer des intervalles de confiance aux valeurs de pool normalisées en deux étapes. La première étape du travail consiste à utiliser les paramètres de standardisation pour affecter un intervalle de confiance *a priori*. La deuxième étape utilise en plus une évaluation de l'amplitude de variation de l'expression des gènes cibles au sein d'un même groupe expérimental (valeur  $\alpha$ ), afin d'améliorer la précision de l'intervalle de confiance. Les gènes cibles les plus pertinents peuvent ainsi être sélectionnés et dosés sur l'intégralité des échantillons.

## ***5. Echantillons biologiques***

La mise au point et l'évaluation de cette nouvelle méthode d'exploration de la réactivité cellulaire s'appuie sur les échantillons de l'expérimentation 2 déjà dosés individuellement et en pool.

## **C. Résultats**

Afin de valider cette méthode de criblage, nous avons comparé sur un grand nombre de gènes cibles la valeur des pools à la moyenne des valeurs de tous les échantillons de ce pool (valeur réelle) dans les groupes formés *a posteriori* de l'expérimentation 2.

Pour les gènes largement exprimés, dans la plupart des cas, les encadrements obtenus avec une valeur  $\alpha$  de 4 sont prédictifs de la valeur réelle, c'est-à-dire que la valeur réelle se trouve dans l'intervalle de confiance de la valeur de pool. Pour les gènes faiblement exprimés, une valeur  $\alpha$  de 16 est souhaitable pour assurer une bonne prédiction. La valeur de pool est d'autant plus prédictive de la valeur moyenne des échantillons et les encadrements sont d'autant plus précis que la standardisation et la normalisation sont de qualité.

## **D. Conclusion**

Cette méthode de criblage permet à partir du dosage pour tous les échantillons des gènes de référence, un criblage des gènes cibles sur des pools d'échantillons correspondant aux groupes expérimentaux. Elle ne permet pas d'effectuer une analyse statistique et fournit uniquement des données qualitatives sur les variations d'expression entre deux groupes expérimentaux. Elle permet cependant de se faire une représentation du schéma d'expression génomique *a priori* afin de doser uniquement ce qui est pertinent.

## **E. Perspectives**

Cette méthode peut être appliquée au dosage de protéines à condition de connaître ou pouvoir évaluer les variations entre les valeurs minimale et maximale d'un groupe.

## **F. Article soumis à Analytical Biochemistry**



# **Target gene identification using quantitative real time**

## **PCR pool screening**

Running title : RT-PCR screening using pool quantification

Michel V. <sup>1</sup>, Banzet S. <sup>1</sup>, Mouret C. <sup>2</sup>, Carter III. R. <sup>1</sup>, Canini F. <sup>1</sup> and Peinnequin A. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Department of Human Factors, BP87,  
38702 La Tronche Cédex, France

<sup>2</sup> Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Genomics Core Facility BP87, 38702 La  
Tronche Cédex, France

### **Address for correspondence:**

Andre Peinnequin,  
CRSSA,  
BP 87  
38702 La Tronche Cedex, France  
Phone : +334 76 63 69 72  
Fax : +334 76 63 69 40  
E-mail: andrepeinnequin@crssa.net

## **Abstract**

One of the main problem in transcriptional study is to find the relevant target genes to analyze pathways involved in physiological and pathological processes. Using pools of all the samples of each experimental group and normalization parameters of each sample, we proposed a fast real-time qRT-PCR method of screening to choose the relevant target genes, while avoiding the quantification of all the samples. This method allows to ascertain confidence ranges to the pool normalized values using both a mathematical model and an assumption regarding the fold-change between the extreme values within each experimental group ( $\alpha$  value). An  $\alpha$  value of 4 appears to be suitable for most of the cases. However, an  $\alpha$  value of 16 gives the most accurate predictions for the low expressed genes. The confidence ranges will be smaller if the standardization and the normalization are correctly performed. It is important to note that this method provides qualitative information, but does not allow to perform any statistical analysis. Lastly, this method is suitable for the protein assays provided that  $\alpha$  value is determined.

**Key words** : qRT-PCR; pool screening; method; transcription regulation; gene expression, mRNA quantification; pathway identification; target gene

## **Background**

Biological and pathological processes involve changes in gene expression at both the transcriptional and translational levels. Most of gene expression studies aim to identify the pathways involved in physiological and pathophysiological processes. The main problem is to find the relevant target genes to analyze pathways at the transcriptional level for each study, not the pathway of choice. For any given target genes, both the existence of a transcriptional regulation and a time of sampling accordant to their expression time course are required. Thus, screening is necessary to choose the most relevant genes. Microarrays are up to now the most efficient method of transcriptional screening. Meanwhile they are costly and time consuming to answer a specific question and only allow for a few experimental conditions to be tested at a time. We proposed therefore an alternative screening method using real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Real time qRT-PCR is currently the gold standard in mRNA quantification, due to the accuracy, reproducibility, sensitivity and specificity of the assay. However, the quantification of numerous mRNAs is costly and time consuming. Using pooled samples of each experimental group appears to be the simplest method to select the best target genes within a pathway. However, the average of all the samples within a group differs from the value of the pool of the samples of the group. The pool value and the average value are equal if the house-keeping genes amounts or if the target genes normalized values are identical within all the samples of the experimental group. So the predictive application of the pool value is dependent on the standardization of the experiment. Thus, this fast screening method requires to assess both potential target gene levels in each pool and house-keeping gene levels in each sample.

The aim of the present work was to use the standardization parameters, i.e. the normalization values of each sample, to affect a confidence range to the pool values through two steps. The

first step ascertains an *a priori* confidence range of the pool value using only the standardization parameters. The second step allows to improve the prediction using a realistic assumption regarding the variation of the normalized target gene values within each group. This method as a whole allows the choice of the most engaging target genes.

## **Methods**

### **Experimental procedure**

Experimental procedure is described elsewhere [1]. Briefly, 80 animals were exposed during 90 minutes either to neutral ambient temperature (group a, n=12) or to heat (n=68). The latter were distributed in three groups according to their heat tolerance (good (group b, n=19) middle (group c, n=30) and bad (group d, n=19) tolerance). In each rat, three samples were taken from hypothalamus, frontal cortex and pituitary (tissues A, B and C, respectively). We obtained 4 groups for each of the 3 tissues, i.e. 12 experimental groups. The experimental study from which were collected the samples was in accordance with ethical French guidelines and approved by the Ethical Committee of the French Army Medical Research Centre.

### **Standardization and qRT-PCR conditions**

The samples from rat hypothalamus, cortex and pituitary (tissues A, B C) were homogenized (200 mg·mL<sup>-1</sup>) with a Mixer Mill MM300 (30 Hz, 2 min; 2 tungsten 2 mm carbide beads, Rescht, Germany) using guanidine thiocyanate lysis buffer (buffer RLT, Qiagen, France). The lysates were stored at -80°C until the mRNA extraction. Messengers RNA were extracted from 40 µL of lysate (8 mg of tissue) and were eluted in a 50 µL final volume using the MagNAPure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with the Isolation Kit II (tissue). Reverse transcription was immediately performed using the Reverse

Transcription Core Kit (Eurogentec, Belgium). The reaction was carried out from 4  $\mu$ L cDNA with 50  $\mu$ M oligo-d(T)15 primer and Rnase inhibitor (2 IU) according to the manufacturer's instructions. After performing RT, an equal volume of all cDNA samples was mixed to obtain 12 pools corresponding to the 12 experimental groups. The cDNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. The PCR was carried out with the Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science) from 0.25  $\mu$ L of cDNA using a LightCycler instrument. The quantitative PCRs were performed for 50 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 20 s (denaturation), 53 to  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 s (annealing temperature) and a final step of  $72^{\circ}\text{C}$  for 8 s (elongation). Primer sets and detailed PCR conditions are shown in Table 1. The amplification specificity was checked using the melting curve [2]. The crossing point ( $C_p$ ) values were calculated from the Light Cycler Software v.3.5 (Roche Applied Science) using the second derivative maximum method. The quantification was achieved using a pool of cDNA samples as calibrator [2], according to the comparative threshold cycle method [3].

### **Normalization**

The normalization was performed using geometric averaging of three validated internal control genes: CycA, HPRT and  $\beta$ -actin for the hypothalamus and the pituitary (tissue A and tissue C respectively) and CycA,  $\beta$ -actine and ARBP for the frontal cortex (Tissue B). Expression stability of the potential reference genes was assessed using GENORM software [4]. The pairwise variations were below 0.15, the threshold below which the inclusion of an additional control gene is not required (respectively 0.095, 0.118 and 0.134 for the tissues A, B and C). For calculations, the Genorm normalization factor was used as reference gene value ( $r_i$ ).

### **Definition of used parameters**

For each sample, the normalized value ( $s_i$ ) of a target gene expression is given by the formula

$$s_i = \frac{t_i}{r_i} \quad (1)$$

where  $t_i$  and  $r_i$  respectively represent the concentrations of the target gene and the

reference gene. It is noticed that  $s_{\min} \leq \frac{t_i}{r_i} \leq s_{\max}$  (1.1), where  $s_{\min}$  and  $s_{\max}$  are respectively the

lower and the higher normalized  $s_i$  values. The expression (1.1) is equivalent to

$$s_{\min} r_i < t_i < s_{\max} r_i \quad (1.2)$$

where  $\alpha$  is the fold-change between the minimum and the maximum

$s_i$  concentrations within an experimental group ( $\alpha = s_{\max} / s_{\min} \geq 1$ ).

The mean normalized value (M) of the  $s_i$  values is given by the equation  $M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_i}$  (2). The

measured pool concentration ( $P_T$ ) is given by the formula  $P_T = \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{n}$  (3). The normalized

value of the pool (P) is given by the equation  $P = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{t_i}{n}}{\sum_{i=1}^n \frac{r_i}{n}} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i}{\sum_{i=1}^n r_i}$  (3.1). This equation is

equivalent to  $P = \frac{P_T}{r_m}$  (3.2) where  $r_m$  represents the measured mean concentration of the

reference gene within the samples. The fold-change between the P values of the two extreme experimental groups is described as  $\beta$  ratio.

### Statistical analysis

Non parametric tests were used in order to avoid as possible hypothesis on value distributions. They were performed with the Statistica 6.0 software (Statsoft-France, Maison Alford, France). Differences in error risk according to Cp were tested using Fisher's exact test. All the values are expressed as means  $\pm$  SD.

## Results and Discussion

### A priori confidence range of the mean predicted value.

It follows from (2) and (3.2) that  $P=M$  if and only if  $r_i$  remains a constant. Consequently, the better the experiment standardization and normalization, the closer the value  $P$  approaches  $M$ . Therefore, a validated normalization and an estimate of the standardization allows us to estimate  $M$  starting from  $P$ . Given  $r_{Max}$  and  $r_{min}$ , the maximum and minimum values of reference gene, it comes  $\frac{t_i}{r_{Max}} \leq \frac{t_i}{r_i} \leq \frac{t_i}{r_{min}}$  (4). By using (2) and (4), an *a priori* confidence

range of the  $M$  value is done by the inequality  $\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_{Max}} \leq \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_i} \leq \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_{min}}$  (5). It comes

$\frac{P_T}{r_{Max}} \leq M \leq \frac{P_T}{r_{min}}$  (5.1). It is noticed that  $P$  belongs to the same interval. Consequently, the

measurement of both the target gene pool value ( $\sum_{i=1}^n t_i$ ) and the samples reference values allows for a rough but *a priori* estimate of  $M$ . The substitution of the  $r_{Max}$  and  $r_{min}$  values for intermediary values in the inequality (5.1), would allow for a better estimation of  $M$ . However, the most accurate estimate requires assumptions based upon the unknown distribution of the parameter  $s_i$ .

### Improvement of the confidence range of the predicted mean value

Given that the reference gene concentrations  $r_i$  are ranking in decreasing order from  $r_1$  to  $r_n$ . The substitution of the  $r_{Max}$  ( $r_1$ ) value by the  $j^{th}$  decreasing value ( $j \in [1, n]$ ) in equation (5) allows to improve the lower limit of the confidence range. This substitution is possible if

$\sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_j} \leq \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_i}$  (6). However, (6) can be written as  $\sum_{i=1}^j \frac{t_i}{r_j} + \sum_{i=j+1}^n \frac{t_i}{r_j} \leq \sum_{i=1}^j \frac{t_i}{r_i} + \sum_{i=j+1}^n \frac{t_i}{r_i}$  (6.1), then

$\sum_{i=j+1}^n t_i (\frac{1}{r_j} - \frac{1}{r_i}) \leq \sum_{i=1}^j t_i (\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_j})$  which leads to  $\sum_{i=j+1}^n t_i (\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_j}) \geq \sum_{i=1}^j t_i (\frac{1}{r_j} - \frac{1}{r_i})$  (6.2). The

expression  $\sum_{i=j+1}^n t_i (\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_j})$  is positive, because  $i \in [j+1, n] \Rightarrow r_i \leq r_j$  in proportion to the

increasing ranking of  $r_i$ . Likewise, the expression  $\sum_{i=1}^j t_i \left( \frac{1}{r_j} - \frac{1}{r_i} \right)$  is positive, because

$i \in [1, j] \Rightarrow r_i \geq r_j$ . The substitution of the lower and higher  $t_i$  limits from (1.2) respectively in

the left and right part of the inequality (6.2) leads to the following expression

$$\sum_{i=1}^j \alpha \cdot s_{\min} \cdot r_i \left( \frac{1}{r_j} - \frac{1}{r_i} \right) \leq \sum_{i=j+1}^n s_{\min} \cdot r_i \left( \frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_j} \right) \quad (6.3).$$
 This inequality is equivalent to

$$\alpha \cdot \sum_{i=1}^j \left( \frac{r_i}{r_j} - 1 \right) \leq \sum_{i=j+1}^n \left( 1 - \frac{r_i}{r_j} \right) \quad (6.4).$$

Consequently, as for the higher limit, the improvement of the lower limit requires making an

assumption regarding the value of  $\alpha$  :  $\alpha \leq \frac{\sum_{i=j+1}^n \left( \frac{r_i}{r_j} - 1 \right)}{\sum_{i=1}^j \left( 1 - \frac{r_i}{r_j} \right)}$  (6.5). This inequality leads

So,  $x_{\text{Max}}$  can be substituted by the  $j^{\text{th}}$  decreasing value  $r_k$  in inequality (5) if  $\alpha \leq A_j$  (6.6)

$$\text{where } A_j = \frac{\sum_{i=j+1}^n \left( \frac{r_i}{r_j} - 1 \right)}{\sum_{i=1}^j \left( 1 - \frac{r_i}{r_j} \right)} \quad (6.7).$$

In the same way, the substitution of  $r_{\min}$  ( $r_n$ ) value by the  $k^{\text{th}}$  decreasing value  $r_k$  ( $k \in [1, n]$ ) in

the inequality (5) allows to improve the higher limit of the confidence range. This substitution

is possible if  $\sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_i} \leq \sum_{i=1}^n \frac{t_i}{r_k}$  (7). This inequality is equivalent to  $\sum_{i=1}^k \frac{t_i}{r_i} + \sum_{i=k+1}^n \frac{t_i}{r_i} \leq \sum_{i=1}^k \frac{t_i}{r_k} + \sum_{i=k+1}^n \frac{t_i}{r_k}$

$$(7.1). \text{ This inequality leads to } \sum_{i=k+1}^n t_i \left( \frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_k} \right) \leq \sum_{i=1}^k t_i \left( \frac{1}{r_k} - \frac{1}{r_i} \right) \quad (7.2).$$

In proportion to the increasing ranking of  $r_i$ , the expressions  $\sum_{i=k+1}^n \left( \frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_k} \right)$  and  $\sum_{i=1}^k \left( \frac{1}{r_k} - \frac{1}{r_i} \right)$  are

both positive ( $i \in [k+1, n] \Rightarrow r_i \leq r_k$  and  $i \in [1, k] \Rightarrow r_i \geq r_k$ ). The substitution of the higher and

lower  $t_i$  limits from (1.2) respectively in the left and right part of the inequality (7.2) leads to

the following  $\sum_{i=k+1}^n \alpha \cdot s_{\min} \cdot r_i \cdot \left( \frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_k} \right) \leq \sum_{i=1}^k s_{\min} \cdot r_i \cdot \left( \frac{1}{r_k} - \frac{1}{r_i} \right)$  (7.3). This inequality is equivalent to

$\alpha \cdot \sum_{i=k+1}^n (1 - \frac{r_i}{r_k}) \leq \sum_{i=1}^k (\frac{r_i}{r_k} - 1)$  (7.4). So the inequality (7) is ascertained according to the following

assumption  $\alpha \leq \sum_{i=1}^k (\frac{r_i}{r_k} - 1) / \sum_{i=k+1}^n (1 - \frac{r_i}{r_k})$  (7.5). In conclusion, the improvement of the higher

limit requires making an assumption regarding the value of  $\alpha$  :  $x_{\min}$  can be substituted in inequality (5) by the  $k^{\text{th}}$  decreasing value  $r_k$  if  $A_k \leq \frac{1}{\alpha}$  (7.6) with  $A_k$  as defined in (6.7) :

$$A_k = \sum_{i=k+1}^n (\frac{r_i}{r_k} - 1) / \sum_{i=1}^k (\frac{r_i}{r_k} - 1) = \sum_{i=k+1}^n (1 - \frac{r_i}{r_k}) / \sum_{i=1}^k (\frac{r_i}{r_k} - 1).$$

The  $\alpha$  values corresponding to the substitution of the  $r_{\min}$  and the  $r_{\max}$  values are shown in table 2 for tissue C.

### **Assumption regarding the alpha maximum value**

Assessing the  $\alpha$  value requires the quantification of the target genes within all the samples. Thus, the application of the pool screening method involves an assumption regarding the  $\alpha$  value. In order to define a guideline for  $\alpha$  prediction, we have measured the real  $\alpha$  value in several experimental procedures. Higher  $\alpha$  values are observed for high  $\beta$  ratio, i.e. for significant and brief increases in mRNA levels as for immediate early gene expression (Table 3, gene 1-2) and pro-inflammatory cytokine (data not shown from [2, 5]). Thus, for the setting of the guideline, we choose to exclude gene 1 and 2 (c-jun and c-fos), which are known to be highly inducible.

Meanwhile, regarding the significant difference in mRNAs levels between groups, a rough estimation of  $\alpha$  value does not decrease the relevance of the pool screening method even for fairly inducible genes (cf Figure 1, *a priori* range for tissue A gene 4 and tissue B gene 1). More precisely in the present study, the  $\alpha$  independent *a priori* pool confidence values

ascertained using (5) is always adequate to statistically differentiate expression levels between two experimental groups with a  $\beta$  ratio equal to or higher than 3 (data not shown).

In the present experiment, excluding highly inducible genes 1 and 2, the  $\alpha$  value was  $3.6 \pm 0.2$  (Table 3). We decided to use the higher limit of the +95% confidence interval value, i.e.  $\alpha=4.0$ , as assumption regarding the maximum value of  $\alpha$ . Further, an  $\alpha=4$  corresponds to a realistic interval ranging in a geometric two-fold variation on both sides of the average value. Examples of corrected pool confidence values using  $\alpha=4$  are shown in Figure 1. Furthermore, this estimated  $\alpha$  value of 4 is compatible with previous data. For example, we observed as higher limit of the +95% confidence interval value 2.9 and 3.4 respectively for myogenic transcription factors in rat skeletal muscle [6] and inducible cytokine genes in rat hypothalamus after 8 Gy total body irradiation [2].

### **Robustness of the predicted mean range regarding the exactness of the alpha maximum value**

The accuracy of the predicted mean range value appears to be robust regarding the exactness of the  $\alpha$  value. Indeed, the  $\alpha$  values as defined in inequality (6.5) and (7.5) are the maximum values that allow for an accurate estimate of the mean, independently of the distribution of the  $s_i$  values among the increasing ranking of  $r_i$ . Though, it arises from the equation (7) that the prediction errors due to the underestimation of the  $\alpha$  value are dependent upon the distribution of the  $s_i$  values among the smallest  $i$  ranks. Precisely, the underestimation of the  $\alpha$  value tends to predict a higher limit of the pool value below the measured average value when the maximum  $s_i$  values correspond to the smallest  $i$  ranks. In parallel, it arises from the equation (6) that errors regarding the lower limit appears when the maximum  $s_i$  values correspond to the greatest  $i$  ranks. So, reasonable underestimation of the  $\alpha$  value should not involve errors in the predicted mean range value in most of the cases. As shown in table 3 of the present study,

underestimation of the  $\alpha$  value involves errors in the predicted mean range value only in approximately 20% of the cases (8/39).

### **Accuracy of the predicted mean confidence range**

Using  $\alpha=4$ , the assessed mean value (M) is included in the predicted confidence range of the P value in 79 out of 92 tests (86%) for the 12 experimental groups (Table 3, Figure 2). The 13 M values out of the predicted confidence range value correspond to 9 experimental groups (Table 3, Figure 3A). In most of these cases, both the upper and the lower limits are close to the assessed mean value, suggesting a relevant prediction of M from P. Though, in one experimental group (tissue C, group a), the predicted upper limit is high, close to the *a priori* limit. For this group, the  $\alpha$  maximum value for the upper limit decreases dramatically between the ranks 2 and 3 (275 to 3, Table 2). This pitfall is due to a large difference in cDNA content among the samples between the ranks 2 and 3 (0.46 vs 0.79). Consequently, the accuracy of this prediction depends dramatically on the quality of standardization of both RNA extraction and reverse-transcription.

### **Prediction accuracy for low expressed genes**

Low expressed genes are determined by a high Cp value, i.e., above 30. This is the case observed for 5 of the 13 wrong predictions (38%, Table 3, A8a, B5a, B5c, B5d, B6a). The error of prediction could be attributed to the low gene expression since the proportion of the errors is significantly higher in the groups with Cp value above 30 than in the groups with Cp value below 30 (respectively, 5/16 vs 8/76, Phi-2= 0.051, p=0.046). Only one group out of 92 (B6d) exhibits concomitantly an erroneous prediction,  $\alpha$  below 4 (3.6) and a Cp value below 30. However, the B6d Cp value is very close to 30 (29.8) suggesting that the application of an  $\alpha$  assumption above 4 must increase the prediction accuracy in case of high Cp values. We

choose to test an  $\alpha$  maximum value of 16, corresponding to a large geometric four fold variation around the average value. Such a value allows a right prediction for 4 of the 5 cases (Figure 3: A8a, B5a, B5c and B6a). Only the prediction concerning the group which exhibits the highest  $\alpha$  value, remains erroneous (B5d,  $\alpha=7.3$ ). The accuracy of the prediction remained nevertheless acceptable for this group regarding the mRNA level variations between groups (Figure 3B, left panel).

### **Prediction accuracy for highly inducible genes**

A measured  $\alpha$  value above 4 is observed for 8 of the 13 wrong predictions (61%). Particularly, the greatest portion of the errors (6/8) are related to only one gene with very high  $\alpha$  values (Table 3, A2b, A2d, B2c, C2a, C2b and C2c). Correcting the  $\alpha$  value as for low expressed genes could increase the prediction accuracy. Indeed, using an  $\alpha$  maximum value of 16 allows a correct confidence range for 4/6 cases (Figure 3: A2d, B2c, C2b, C2c). Inasmuch the real  $\alpha$  value is unknown at the screening time, high  $\alpha$  values could be expected using the  $\beta$  ratio calculated from the pool value of the extreme groups. However, due to the large variation in mRNA levels, weak prediction errors do not decrease the screening interest for highly inducible genes and consequently, an  $\alpha$  maximum value of 4 appears to be an adequate compromise (Figure 1: A4 and B1).

### **Guideline for the pool screening method**

The quantification of both potential target gene levels in each pool and house-keeping genes in each sample allows (i) to obtain an estimate of the normalized mean value ( $M \approx P$ ) and (ii) to calculate a confidence range of  $M$  using the inequality  $\frac{P_T}{r_j} \leq M \leq \frac{P_T}{r_k}$  (8). The values  $r_j$  and  $r_k$  are ascertained with the inequalities (6.5) and (7.5) using an assumption regarding the fold-change  $\alpha$  between the minimum and the maximum target gene normalized values within any

experimental group. Briefly,  $r_j$  is the smallest  $r_i$  value as  $\alpha \leq A_j$  (6.6) where

$$A_j = \sum_{i=j+1}^n \left( \frac{r_i}{r_j} - 1 \right) / \sum_{i=1}^j \left( 1 - \frac{r_i}{r_j} \right) \quad (6.7).$$

Likewise,  $r_k$  is the greatest  $r_i$  value as  $A_k \leq \frac{1}{\alpha}$  (7.6) where

$$A_k = \sum_{i=k+1}^n \left( \frac{r_i}{r_k} - 1 \right) / \sum_{i=1}^k \left( 1 - \frac{r_i}{r_k} \right) \quad (6.7).$$

Setting  $\alpha=4$  is suitable in most cases regarding the robustness of the prediction. However, an  $\alpha=16$  setting appears to be preferable for low expressed target genes, i.e. with Cp near or above 30. Calculation can be done using Excel data sheet in online supplementary material.

## Conclusions

In conclusion, the pool quantification method allows a fast and accurate assessment of mRNA levels in any given experimental groups provided that i) the normalization values are ascertained for each sample, ii) a realistic assumption is done regarding the fold-change between the extreme values within each experimental group ( $\alpha$  value). An  $\alpha$  value of 4 appears to be suitable for most of the cases. However, an  $\alpha$  value of 16 allows most accurate predictions for the low expressed genes (Cp >30).

Importantly, this method allows choosing relevant target genes to analyze pathways at the transcriptional level, avoiding the quantification of all samples for many genes. However, this screening method does not allow the ability to perform any statistical analysis. It only affords qualitative information on the gene expression variation among experimental groups. The estimation accuracy is largely dependent on both the standardization and the normalization. The size of the *a priori* range and the subsequent corrected confidence range will be smaller if the standardization and normalization were correctly performed. Moreover, this method is usable for the proteins assays provided that the fold-change  $\alpha$  between maximum and minimum sample normalized values is determined.

## References

- [1] V. Michel, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, and F. Canini, Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment, *Neuroscience* 147 (2007) 522-531.
- [2] A. Peinnequin, C. Mouret, O. Birot, A. Alonso, J. Mathieu, D. Clarencon, D. Agay, Y. Chancerelle, and E. Multon, Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green, *BMC Immunol.* 5 (2004) 3.
- [3] K. J. Livak, and T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method, *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [4] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002) RESEARCH0034.
- [5] S. Banzet, N. Koulmann, N. Simler, O. Birot, H. Sanchez, R. Chapot, A. Peinnequin, and X. Bigard, Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: association with calcineurin activity, *J. Physiol.* 566 (2005) 839-847.
- [6] A. C. Durieux, A. Amirouche, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, M. Padeloup, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin, and D. Freyssenet, Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression, *Endocrinology* 148 (2007) 3140-3147.

## Figures

**Figure 1:** Comparison between P values and real M values. Both *a priori* range and corrected range ( $\alpha=4$ ) are represented. Values are expressed as percentage of the mean of the four groups a, b, c and d. Groups a (■), b (■), c (■) and d (■).

**Figure 2:** P values expressed as percentage of the M values in each of the 79 validated cases. P values (—), corrected P range (■) and M values (—).

**Figure 3:** Effect of the  $\alpha$  maximum assumption value on the accuracy of the prediction in the 13 initially non-validated cases.

**Panel A.** Corrected range of the P values using  $\alpha$  maximum values set at 4 (■) and 16 (■). Values are expressed as percentage of the M values (—).

**Panel B.** Prediction accuracy for both a low-expressed gene (B5) and a high-expressed gene, (C2). M values (■), P values using  $\alpha$  maximum values set at 4 (■) and 16 (■). For each gene, values are expressed as percentage of the mean of the four groups a, b, c and d.

# Figure 1

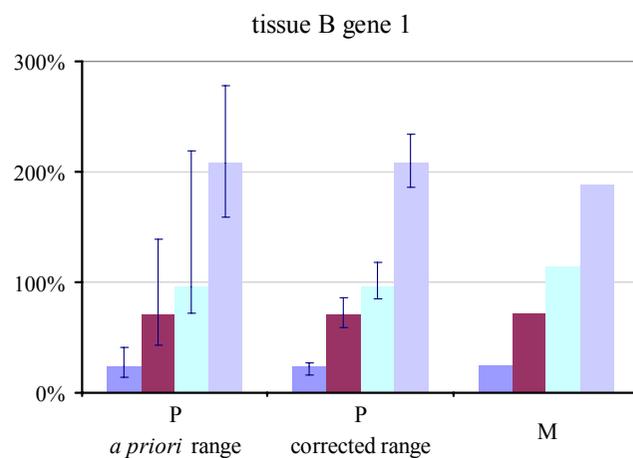
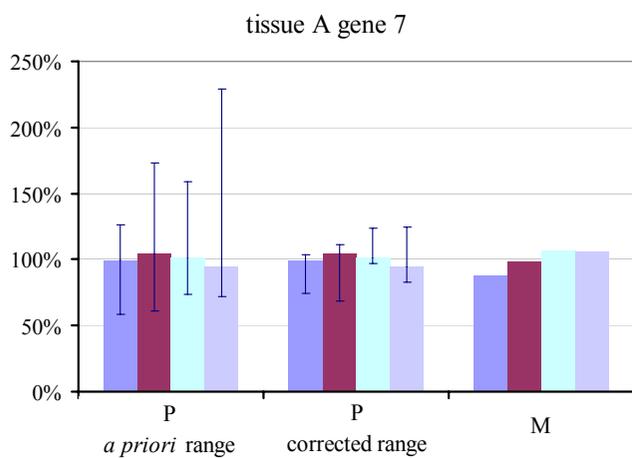
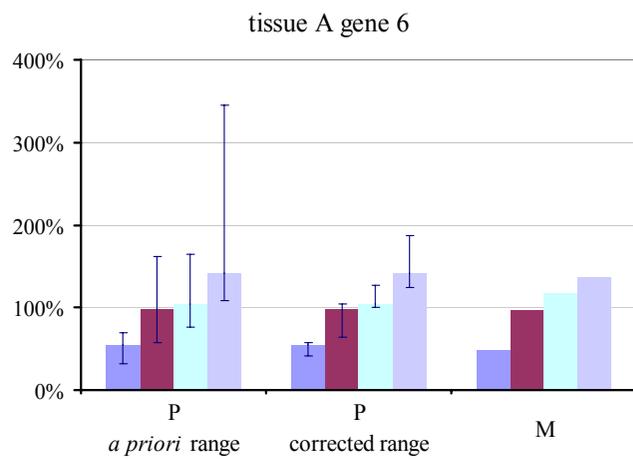
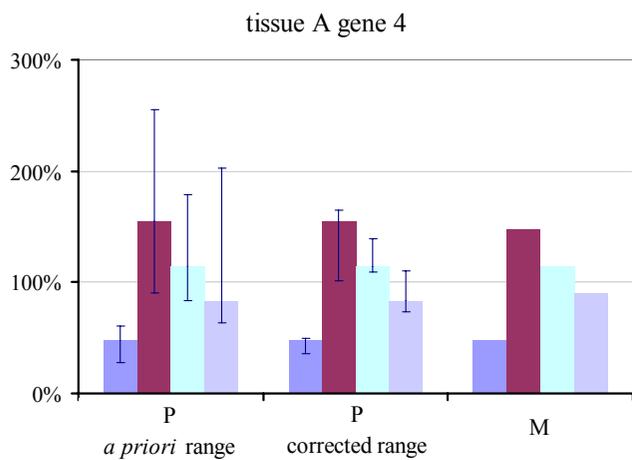
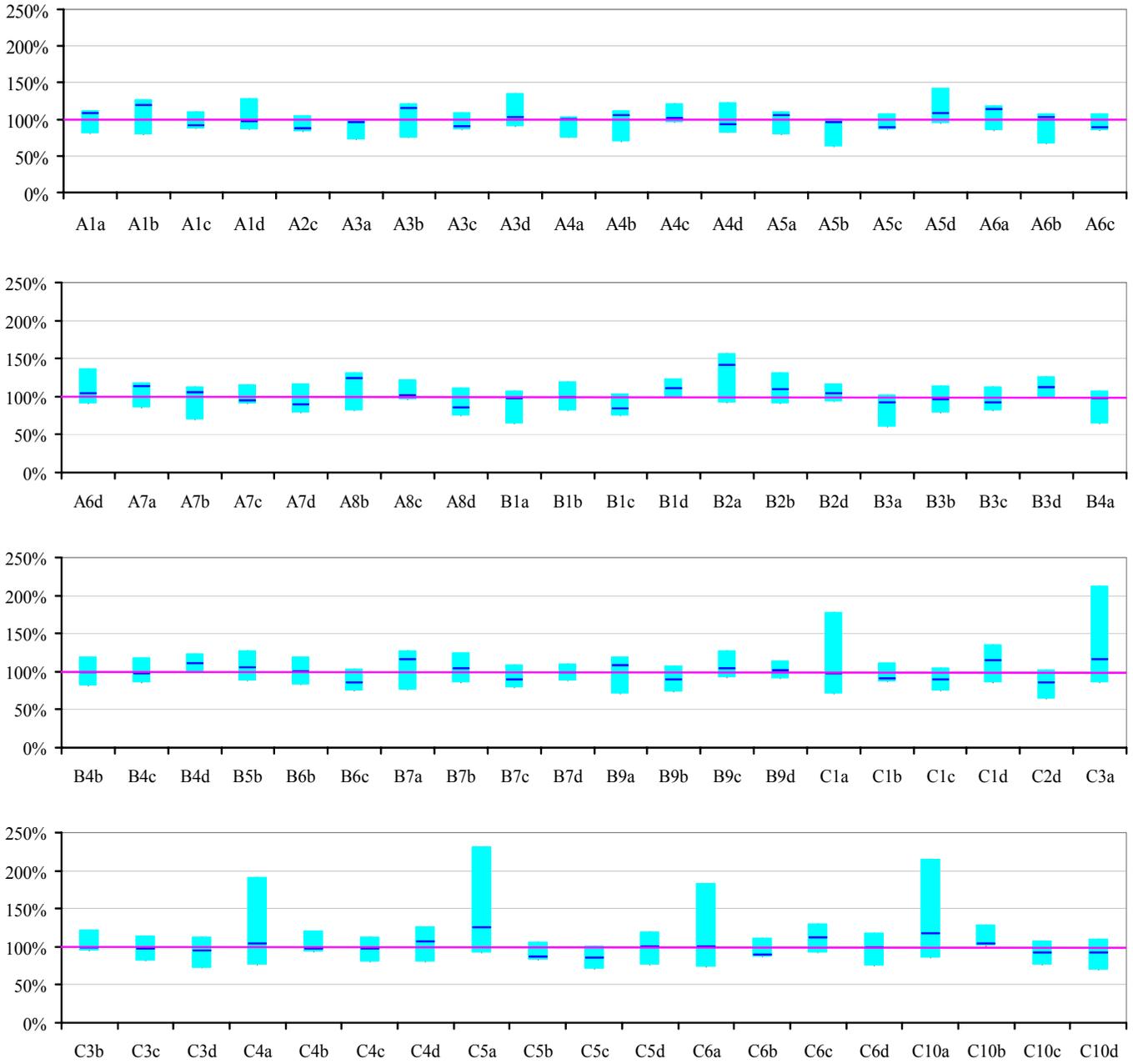
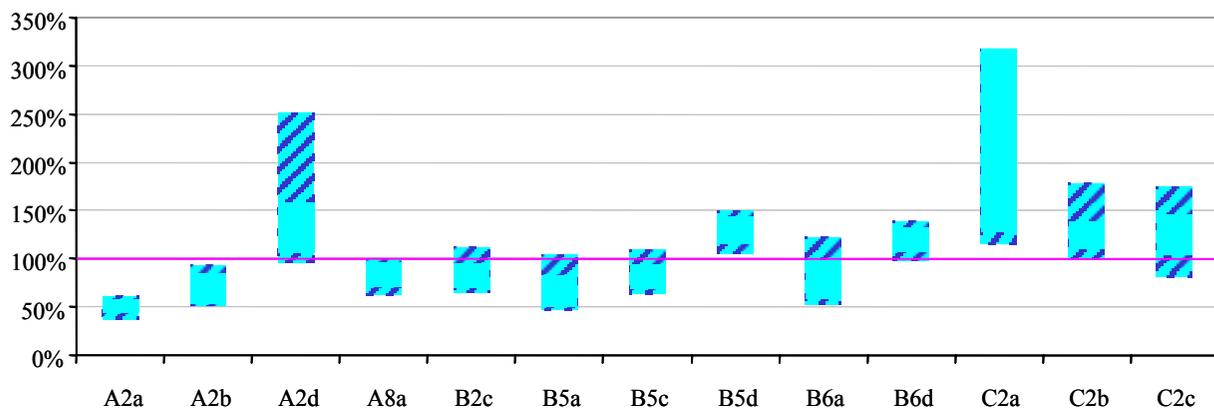


Figure 2

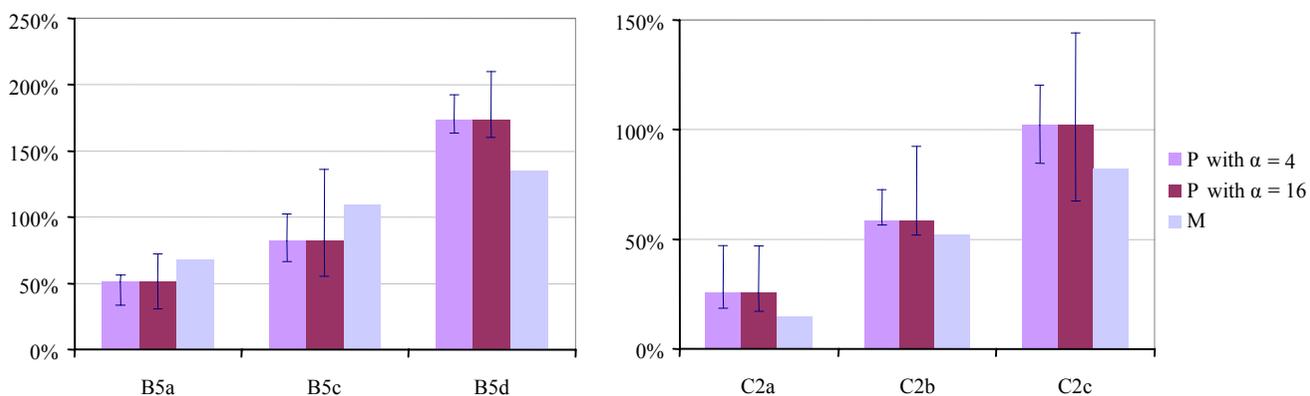


# Figure 3

A



B



**Table 1****Table 1.** Forward (FW) and reverse (RW) primer sequences used for quantitative PCR assays

gene	target gene number	Accession number		5'-3' primer sequence	Product size (base pairs)	Annealing temperature (°C)
CycA <sup>a</sup>		<u><a href="#">NM_017101</a></u>	FW	GGCAAATGCTGGACCAAACAC	94	56
			RW	CTCCCAAAGACCACATGCTTG		
$\beta$ -actin <sup>a</sup>		<u><a href="#">NM_031144</a></u>	FW	TCAGGTCATCACTATCGGCAATG	95	54
			RW	TTTCATGGATGCCACAGGATTC		
HPRT <sup>b</sup>		<u><a href="#">NM_012583</a></u>	FW	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	123	60
			RW	GCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAGCC		
ARBP <sup>c</sup>		<u><a href="#">NM_02240</a></u>	FW	CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG	74	57
			RW	CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG		
c-fos	gene 1	<u><a href="#">NM_022197</a></u>	FW	CGGAGAATCCGAAGGAAAG	136	55
			RW	TGGCAATCTCGGTCTGCAAC		
c-jun	gene 2	<u><a href="#">NM_021835</a></u>	FW	CAATGGGCACATCACCACTACAC	122	61
			RW	TCTGGCTATGCAGTTCAGCTAGG		
EGR1	gene 3	<u><a href="#">NM_012551</a></u>	FW	CGAGCGAACAACCCTACGA	63	53
			RW	CGTTATTCAGAGCGATGTCAGAA		
IkB $\alpha$	gene 4	<u><a href="#">XM_343065</a></u>	FW	AGCTGACCCTGGAAAATCTTCAG	115	57
			RW	CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG		
SOCS3	gene 5	<u><a href="#">NM_053565</a></u>	FW	CCTCCAGCATCTTTGTGCGGAAGAC	99	65
			RW	TACTGGTCCAGGAACTCCCGAATG		
MCIP1	gene 6	<u><a href="#">NM_153724</a></u>	FW	GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT	80	60
			RW	TTGGCCCTGGTCTCACTTC		
S100B	gene 7	<u><a href="#">NM_013191</a></u>	FW	TTGGACACCGAAGCCAGAGA	101	54
			RW	AAGACATCAATGAGGGCAACCAT		
CRF	gene 8 in tissue A	<u><a href="#">NM_031019</a></u>	FW	TGGATCTCACCTTCCACCTCTG	85	58
			RW	TTCTGTTGCTGTGAGCTTGC		
CaMKII	gene 8 in tissue B	<u><a href="#">NM_012920</a></u>	FW	AGATGTGCGACCCTGGAATGAC	103	54
			RW	CGGGACCACAGGTTTTCAAATAG		
POMC	gene 8 in tissue C	<u><a href="#">NM_139326</a></u>	FW	TCACCACGAAAGCAACCTG	108	57
			RW	TTTCAGTCAAGGGCTGTTTCATCTC		

<sup>a</sup> House-keeping gene for tissue A, B and C <sup>b</sup> House-keeping gene for tissue A and C <sup>c</sup> House-keeping gene for tissue B

**Table 2**Limits of  $\alpha$  maximum values according to the substituted rank

<i>alpha maximum value tissue C</i>	Group a (n=12)		Group b (n=19)		Group c (n=30)		Group d (n=19)	
	<i>lower limit</i>	<i>upper limit</i>						
<b>rank</b>								
2	95.8	274.9	32.4	348.6	190.1	103.3	27.1	112.5
3	12.5	3.1	12.5	40.3	26.4	28.3	9.7	40.1
4	2.1	1.8	10.2	7.1	12.7	25.0	3.6	9.1
5	2.0	1.8	9.2	5.2	4.4	23.2	2.9	8.9
6	2.0	1.5	8.3	3.4	4.4	17.2	2.4	6.2
7	0.6	0.5	7.1	2.5	3.9	6.9	1.8	1.3
8	0.6	0.5	2.7	1.9	2.9	6.7	1.6	1.3
9	0.5	0.5	1.4	0.9	2.6	6.1	1.1	1.3
10	0.3	0.1	1.1	0.7	2.3	5.1	1.1	0.9
11	0.0	0.0	1.1	0.7	2.0	4.1	0.8	0.9
12			0.5	0.4	1.8	2.1	0.8	0.6
13			0.4	0.1	1.5	1.9	0.7	0.6
14			0.3	0.1	1.1	1.3	0.2	0.4
15			0.2	0.1	0.9	1.1	0.1	0.3
16			0.1	0.1	0.9	1.1	0.1	0.3
17			0.0	0.1	0.8	0.9	0.0	0.1
18			0.0	0.0	0.5	0.6	0.0	0.0
19					0.5	0.6		
20					0.2	0.5		
<b>substituted rank</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>6</b>

The limits are calculated using the inequalities (6.5) and (7.5) for respectively the lower and the upper limit. The ranks corresponding to the lowest  $\alpha$  values greater than the assumption value  $\alpha = 4$  are underlined.

**Table 3**

Accuracy of the predicted ranges of the P values.

<i>gene</i>	<i>group</i>	<i>tissue A</i>			<i>tissue B</i>			<i>tissue C</i>		
		validation <sup>a</sup>	C <sub>p</sub> <sup>b</sup>	$\alpha$ value <sup>c</sup>	validation <sup>a</sup>	C <sub>p</sub> <sup>b</sup>	$\alpha$ value <sup>c</sup>	validation <sup>a</sup>	C <sub>p</sub> <sup>b</sup>	$\alpha$ value <sup>c</sup>
gene 1	a	+	+	3.5	+	+	3.8	+	++	4.5
	b	+	+	2.9	+	+	5.5	+	++	5.7
	c	+	+	3.9	+	+	5.6	+	++	5.6
	d	+	++	4.7	+	+	6.6	+	++	8.3
gene 2	a	-	+	2.2	+	+	3.2	-	+	5.4
	b	-	+	6.8	+	+	4.0	-	+	10.5
	c	+	+	7.7	-	+	7.9	-	+	10.8
	d	-	+	5.9	+	+	5.4	+	+	13.0
gene 3	a	+	+	4.4	+	+	2.7	+	++	5.5
	b	+	+	2.0	+	+	4.6	+	++	3.6
	c	+	+	4.4	+	+	3.3	+	++	5.8
	d	+	+	5.9	+	+	3.2	+	++	7.1
gene 4	a	+	+	1.4	+	+	2.5	+	++	2.2
	b	+	++	2.7	+	+	2.6	+	++	2.5
	c	+	++	3.3	+	+	3.5	+	++	2.7
	d	+	+	2.4	+	+	3.9	+	++	2.7
gene 5	a	+	-	4.3	-	-	3.4	+	+	4.5
	b	+	-	3.2	+	-	2.6	+	+	4.6
	c	+	-	2.6	-	-	5.0	+	-	7.7
	d	+	-	5.2	-	-	7.3	+	+	10.2
gene 6	a	+	+	2.2	-	-	2.7	+	+	3.8
	b	+	+	3.0	+	-	2.1	+	+	4.7
	c	+	+	2.9	+	-	4.2	+	+	4.7
	d	+	+	2.6	-	+	3.6	+	+	4.8
gene 7	a	+	++	1.8	+	++	2.6			
	b	+	++	2.6	+	++	2.1			
	c	+	++	2.0	+	++	2.6			
	d	+	++	2.9	+	++	3.7			
genes 8	a	-	-	2.0	+	++	4.9	+	++	5.7
	b	+	-	3.0	+	++	1.9	+	++	3.1
	c	+	-	2.7	+	++	3.3	+	++	2.4
	d	+	-	5.2	+	++	2.6	+	++	3.4

<sup>a</sup> M value belongs (+) or does not belongs (-) to the predicted range. <sup>b</sup> Value of the pool crossing point : (++) . Cp<25. (+). 25<Cp<30. (-) Cp>30. <sup>c</sup> Measured  $\alpha$  values calculated using the equation (1.3).



## **Discussion générale**



## ***I. Introduction***

Nous nous proposons de discuter nos résultats selon trois points. Dans un premier temps, la validité méthodologique de notre travail sera discutée, en particulier pour la pré-expérimentation et l'expérimentation 1 dans lesquelles entrent en jeu des éléments stressants autres que la chaleur tels que l'insertion du thermocouple et les effets secondaires des produits pharmacologiques. Ceci nous conduira à vérifier la cohérence des différents signes pathologiques caractérisant un animal intolérant à la chaleur au travers de la pré-expérimentation et des expérimentations 1 et 2.

Dans un second temps, nous discuterons des mécanismes impliqués dans l'émergence d'une intolérance selon l'analyse des réponses de stress cellulaire et systémique.

Enfin, nous essaierons de replacer nos résultats dans la logique théorique du stress et de proposer des perspectives théoriques et pratiques.

## ***II. Aspects méthodologiques***

L'analyse de la validité des résultats suppose que l'on fasse la part des choses entre les effets du stress chaud et ceux des conditions expérimentales, en particulier le stress de mesure de  $T_{co}$  et l'usage de produits pharmacologiques. Pour cela, deux stratégies ont été suivies : (i) la discussion des interactions entre exposition au chaud et biais expérimentaux ; (ii) l'évaluation de la cohérence entre des expérimentations visant le même objectif (définir un sujet vulnérable) avec des méthodes distinctes (séparation des animaux par la pharmacologie ou la variabilité inter-individuelle).

### **A. Effets des conditions expérimentales**

Le suivi de la température corporelle des animaux par l'insertion d'un thermocouple rectal constitue une contrainte non négligeable, induisant un stress juste avant l'exposition à la chaleur. Il peut donc constituer un facteur confondant.

Les animaux PEG peuvent être considérés en état de stress psychologique avant l'exposition à la chaleur dans la mesure où ils présentent certains signes. (i) Ils présentent une hyperthermie couramment observée lors d'un stress psychologique chez de nombreuses espèces comme l'homme [308], la souris [62, 170, 367, 494], le cochon [376] et le rat [54, 132]. Cette hyperthermie est aspécifique du stresser puisqu'elle survient dans des conditions comme le changement de cage, les pincements de la queue et les interactions sociales [54, 239]. Elle est donc appelée hyperthermie de stress et a même été proposée comme variable dans l'évaluation de l'anxiété chez la souris (Stress-Induced-Hyperthermia paradigm) [494]. (ii) Les animaux PEG présentent des taux élevés de corticostérone plasmatique, suggérant l'activation de l'axe HPA. (iii) Les animaux PEG présentent une activation cérébrale comme en témoignent les niveaux relativement élevés des ARNm c-fos. Une telle induction est observée dans le cortex après exposition à un environnement nouveau [369], l'immersion et la contention [98] et le foot-shock [210]. L'absence d'augmentation de l'expression des ARNm Hsp70 suggère que l'intensité du stress n'ait pas été suffisante pour induire des Hsp [144, 219] *via* une dénaturation protéique ou que l'hyperthermie est restée en deçà du seuil d'induction des ARNm Hsp70 (notre étude et [334]).

L'exposition au chaud s'est donc effectuée sur des animaux stressés et une interaction a pu exister entre les deux stressers. Comme les animaux des deux groupes de pharmacologie ont été soumis à la même contrainte, on peut penser que l'on a obtenu un contraste avec des animaux stressés ayant ou non des concentrations de glucocorticoïdes élevées.

### **B. Effets secondaires de la pharmacologie**

L'utilisation de produits pharmacologiques induit des effets secondaires attribuables au solvant PEG et/ou à la métyrapone. L'usage de PEG a pu modifier la contrainte chaude et modifier la tolérance à la chaleur, rendant les résultats difficiles à confronter avec ceux de la littérature. Par ailleurs, l'usage d'un

produit pharmacologique pour inhiber la sécrétion de glucocorticoïdes peut engendrer des effets adjacents indésirables susceptibles d'entraver l'interprétation des résultats.

### ***1. Effets du solvant PEG***

Les effets de l'injection du solvant PEG ont pu être appréciés en comparaison des animaux contrôles. Le solvant a induit une hémococoncentration suggérée par l'augmentation des protéines, de la créatinine et de l'albumine dans le plasma (résultats partiellement présentés). Cette hémococoncentration est restée modérée puisque l'hématocrite ne varie pas de manière significative. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui décrivent des hypovolémies suite à l'injection sous-cutanée de ce même solvant, solution hypertonique séquestrant le liquide extracellulaire dans un compartiment sous-cutané [478, 514]. Ces modifications ont cependant concerné les deux groupes de traitements (PEG et métyrapone) de la même manière. L'association du stress et de l'hémococoncentration explique sans doute la rapidité de l'augmentation de  $T_{co}$  au cours de ces expérimentations avec des durées d'exposition à la chaleur plus courtes que celles habituellement décrites [135, 366].

### ***2. Effets de la métyrapone***

L'usage de la métyrapone a pu interagir avec les deux paramètres clés de l'expérimentation que sont la thermorégulation et la réactivité aux stressseurs (chaleur et thermocouple). Les animaux métyrapone sont-ils donc dans le même état que les animaux PEG, (i) quant à la thermorégulation et (ii) au niveau du stress ?

#### ***a. La thermorégulation***

En condition basale, durant les deux heures suivant l'injection, les valeurs de  $T_{re}$  des animaux métyrapone sont inférieures de 1,2°C à celles des niveaux de base usuellement observés avec la même méthode de mesure de température [168]. Cet effet hypothermiant a été décrit uniquement chez le cobaye [518]. Comme l'isolement cutané ( $T_{cut}$  et HLI) est similaire chez les animaux PEG et métyrapone, l'hypothermie ne peut venir que d'une réduction de production de chaleur non défendue par un mécanisme d'isolement. En effet, la mise en place d'un mécanisme d'isolement médiée par une vasoconstriction cutanée est habituellement reflétée par une diminution de la  $T_{cut}$  et du HLI [399]. Cette hypothermie a été pratiquement supprimée par la stabulation des animaux métyrapone à  $T_a=29^\circ\text{C}$  durant les deux heures après l'injection comme le suggère l'identité des  $T_{re}$  durant la première minute de mesure de  $T_{re}$  entre les animaux PEG et métyrapone (expérimentation 1, résultats non présentés), c'est-à-dire avant que ne se développe l'hyperthermie de stress.

Contrairement aux animaux PEG, les animaux métyrapone ne présentent pas d'hyperthermie de stress. Les animaux métyrapone ont perçu le stressseur puisque  $T_{cut}$  et HLI diminuent de manière comparable aux animaux PEG, suggérant un même niveau d'activation sympathique. L'inhibition de l'hyperthermie de stress n'est donc pas le fait d'une absence de perception du stressseur mais plutôt la

conséquence d'une inhibition de la thermogenèse [518]. Par ailleurs, si l'hypothermie a pu être combattue par la stabulation des animaux métyrapone à  $T_a=29^\circ\text{C}$  (valeur de la première minute, expérimentation 1), l'inhibition de l'hyperthermie de stress n'a pas été supprimée comme le suggèrent les plus basses  $T_{re}$  au cours de la totalité de la période de référence chez les rats métyrapone par rapport aux rats PEG (expérimentation 1).

Cette modification de la thermorégulation à  $T_a=22^\circ\text{C}$  peut faire suspecter une différence de thermorégulation des animaux sous métyrapone lors du stress chaud. Ils présentent effectivement des variations de  $T_{re}$  entre le début et la fin de l'exposition à la chaleur plus élevées que les animaux PEG. Cette différence peut être expliquée (i) soit par une réelle différence de thermorégulation à la chaleur, (ii) soit par l'augmentation du gradient thermique entre l'animal et l'environnement, les  $T_{re}$  de début d'exposition étant plus basses chez les animaux métyrapone.

Finalement, les modifications de thermorégulation induites par la métyrapone n'ont probablement pas eu de répercussions majeures sur les conditions expérimentales (expérimentation 1) puisque (i) il n'y a pas de différence de distribution entre les animaux PEG et métyrapone dans les différents groupes de charges thermiques ; (ii) les  $T_{re}$  finales, les durées d'exposition et les  $AUC_{40,4}$  sont similaires entre les animaux PEG et métyrapone dans les groupes de charges thermiques HL<sub>1</sub> et HL<sub>2</sub>. L'agression thermique subie par les organismes est donc similaire entre les animaux PEG et métyrapone, ce qui autorise une comparaison concernant les autres variables.

### *b. Sur le stress*

La métyrapone a été considérée comme une substance stressante [405]. Elle a donc pu modifier la perception du stress et/ou le développement de la réaction de stress *per se*. Les modifications biologiques et comportementales observées chez nos animaux métyrapone sont-elles en relation avec le stress ? Les animaux ont présenté un stress puisque la réaction vasoconstrictrice observée d'après les données de la thermorégulation suggère une activation de l'axe sympathique. De plus, cette activation est analogue à celle observée chez les animaux PEG, indiquant une réaction « d'amplitude normale ».

#### ➤ Les signes biologiques du stress

L'injection de métyrapone provoque une hyperglycémie (nos résultats et [106, 405, 518]) classiquement causée par les glucocorticoïdes et les catécholamines lors du stress [176]. Elle ne peut pas s'expliquer par une augmentation des glucocorticoïdes, obligeant à proposer des hypothèses alternatives : (i) une activation du système sympathique, conduisant à la libération d'adrénaline et de noradrénaline par la zone médullaire des glandes surrénales. Cette hypothèse est en faveur d'un effet stressant de la métyrapone en conditions basales, mais reste peu probable en raison des variations similaires de  $T_{cut}$  et HLI entre animaux PEG et métyrapone. (ii) Une modification profonde du métabolisme glucidique avec glycolyse hépatique et musculaire [327], mobilisation des lipides pour la néoglycogénèse et une

moindre utilisation du glucose circulant par les cellules [255, 256]. Cette hyperglycémie ne peut être assimilée à une marque de stress [405], mais plutôt à une intolérance au glucose assez analogue au diabète.

Au-delà de l'inhibition de la synthèse de glucocorticoïdes, l'injection de métyrapone modifie profondément d'autres paramètres de l'axe HPA. Elle entraîne (i) une augmentation de la concentration plasmatique d'ACTH chez le rat [107, 191, 404, 405] et l'homme [9, 227, 295] ; (ii) une augmentation de libération hypothalamique d'AVP et de CRF [95], ainsi qu'une augmentation de la transcription du CRF dans la région parvo-cellulaire du PVN [191] ; (iii) une activation du PVN suggérée par l'induction des ARNm c-fos [191] ; (iv) une modification de la dynamique de l'axe HPA suite à une injection unique [404]. Ces modifications de l'axe HPA peuvent être liées à une levée du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes agissant aux deux niveaux hypothalamique et hypophysaire, mais aussi à une activation directe de la libération de CRF cérébral [216]. Seul ce dernier mécanisme est en faveur d'un stress accru, à condition que la libération de CRF soit équivalente à stress.

L'exposition au stress est usuellement suivie d'une activation cérébrale dont la marque est une augmentation de la transcription de c-fos [98, 369]. De fait, l'injection de métyrapone est suivie d'une augmentation de l'immunofluorescence de c-fos dans les cortex cingulaire et frontal, l'amygdale, l'hypothalamus et le locus coeruleus [405]. Cette activation correspond à l'augmentation non significative d'ARNm c-fos dans le cortex frontal chez les animaux métyrapone de notre pré-expérimentation. Elle s'explique par (i) le retrait du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes *via* les GR [423] jouant à la fois sur l'axe HPA et sur le cortex frontal [320]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la dexaméthasone, un agoniste GR, réduit l'augmentation de l'expression des ARNm de c-fos dans le cortex induite par le stress [323]. (ii) Le maintien de l'activation MR chez les animaux traités par métyrapone. En effet, les concentrations de glucocorticoïdes après injection de métyrapone sont toujours à un niveau compatible avec une saturation des récepteurs MR sans saturation des récepteurs GR. Ceci suppose qu'il existe un équilibre entre activation MR et inhibition GR, hypothèse soutenue par le fait que l'adrénalectomie, annulant toute présence de glucocorticoïdes, ne modifie pas l'augmentation d'expression corticale des ARNm c-fos après stress de contention aigu ou chronique [326].

#### ➤ Les signes comportementaux du stress

Sur un plan comportemental, la métyrapone réduit plutôt la perception du stress comme le suggèrent les données de la littérature montrant (i) un effet anti-dépresseur de la métyrapone lors de situations stressantes. Ainsi, l'administration de métyrapone réduit le temps d'immobilité au cours d'un test de nage forcée [17] et favorise l'adaptation comportementale face à des immobilisations répétées [228] ; (ii) un effet anxiolytique puisqu'elle réduit les comportements anxiogènes dans le labyrinthe en croix surélevé induits par un stress de contention [64]. Le mécanisme pourrait être lié à la déplétion glucocorticoïdérique puisque l'adrénalectomie et l'infusion d'antagonistes aux récepteurs GR et MR suppriment les comportements anxiogènes observés dans le labyrinthe en croix surélevé après un stress de contention [65]. Alternativement, on ne peut exclure que l'activation de l'axe HPA que suscite la métyrapone

n'induit une accumulation du précurseur de la corticostérone, la 11-DOC et ses dérivés, la 5 $\alpha$ -dihydrodésoxycorticostérone (5 $\alpha$ -DHDOC) et la 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -tétrahydrodésoxycorticostérone (3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THDOC) [409]. Ces métabolites facilitent la transduction des récepteurs GABA<sub>A</sub> par modulation allostérique [387, 388, 408, 409] et potentialisent l'inhibition induite par la libération endogène de GABA [387, 408]. Ainsi, l'étifoxine, modulateur positif des récepteurs GABA<sub>A</sub>, présentent un effet anti-dépresseur et anxiolytique chez le rongeur et l'homme [35, 428, 441] et atténue l'hyperthermie induite par la manipulation [496].

### ➤ Conclusion

La réalité d'une interaction de la métyrapone sur le stress est donc complexe avec des arguments pour une action stressante comme l'induction de marqueurs biologiques de stress et des arguments contre comme les comportements témoignant d'une réduction du stress psychogène. Cet aspect très contrasté explique peut-être pourquoi le groupe des animaux à risque comporte autant d'animaux ayant reçu la métyrapone que d'animaux ayant reçu le PEG. Même si la métyrapone agit sur le stress, le résultat ne provoque pas de perturbation majeure sur la réponse à la chaleur, ce qui autorise une comparaison des groupes PEG et métyrapone.

## C. La cohérence inter-expérimentations

### 1. Introduction

La validité des résultats obtenus peut également s'apprécier sur la base de la cohérence entre les expérimentations menées selon des modèles différant par les caractères suivants : (i) modulation pharmacologique *vs* utilisation de la variabilité inter-individuelle, (ii) exposition au chaud d'animaux stressés *vs* animaux non stressés, (iii) charge thermique croissante par utilisation de durées différentes d'exposition au chaud *vs* durée identique et utilisation de la variabilité inter-individuelle. Cette cohérence entre expérimentations peut se juger sur deux points que sont la définition de l'intolérance à la chaleur et le mécanisme d'interaction entre stress et tolérance à la chaleur. Le premier point sera traité dans le chapitre ci-dessous et le second point dans la partie de discussion relative aux mécanismes en cause.

### 2. Tableau de l'intolérance à la chaleur

Les deux modèles expérimentaux apportent des résultats concordants concernant la caractérisation d'un animal intolérant à la chaleur. Pourtant, les critères du jugement utilisés ont évolué d'une expérimentation à l'autre, mais entrent toujours dans les critères fiables proposés dans les hypothèses de recherche (III.C., page 80) : (i) animaux dont la charge thermique a dépassé les 20°C.min (apparition du risque de mortalité dans les 24 heures selon [203]) dans la pré-expérimentation et l'expérimentation 1, (ii) et animaux dont la T<sub>abd</sub> est la plus élevée (qualifiés de HE ou intolérants) dans l'expérimentation 2. En dépit de ces différences de critères et des différences de méthodes expérimentales, c'est bien la même réalité qui a été appréhendée comme le suggèrent les différentes variables biologiques mesurées.

### *a. Déshydratation et thermorégulation*

Les animaux intolérants présentent une déshydratation caractérisée par une augmentation de l'hématocrite et de la concentration en protéines plasmatiques. Cette déshydratation est probablement la conséquence d'une mauvaise économie des processus thermorégulateurs mis en œuvre pour lutter contre l'augmentation de la température interne. La thermolyse se fait par vasodilatation cutanée, miction suivie d'évaporation, halètement [167]. L'inefficacité de la thermorégulation s'observe par des températures centrales plus élevées et donc, des charges thermiques plus fortes. La différence de pente de stockage thermique observée en télémétrie selon le groupe est de ce point de vue édifiante. Il est toutefois difficile de savoir si cette situation est la conséquence d'une insuffisance de thermolyse ou d'un excès de stockage de chaleur, que se soit par production endogène (forte activité locomotrice, défaut d'inhibition de la thermogenèse) ou par défaut de thermolyse (vasodilatation insuffisante) [167].

### *b. Métabolisme*

Les animaux intolérants à la chaleur présentent une forte augmentation du lactate sanguin dont l'accumulation laisse suggérer l'existence d'un déséquilibre métabolique. Dans des conditions de stress thermique et de déshydratation, l'augmentation du lactate sanguin est directement liée à l'augmentation de la température corporelle [552]. Une origine cérébrale du lactate peut être suspectée dans la mesure où les animaux sont au repos et que des augmentations de lactate cérébral ont été observées chez le rat en CC, associées à des élévations de glycérol, radicaux libres et glutamate [83].

Les animaux intolérants présentent aussi une forte mobilisation énergétique, témoignée par la diminution de la concentration plasmatique de triglycérides associée à l'augmentation de celle du glycérol. Cette mobilisation des triglycérides reflète probablement une libération de catécholamines, faisant suspecter une activation sympathique médullo-surrénale [96]. Cette même situation est observée lors d'un stress d'immobilisation chez le rat, accompagnée d'une augmentation de la glycémie [393]. L'hyperglycémie n'étant pas observée chez nos rats intolérants, une augmentation de la consommation tissulaire en glucose peut être suspectée à la chaleur. Cette hypothèse est soutenue par l'élévation de la lactatémie, évocatrice d'une bascule vers un métabolisme anaérobie [552].

### *c. Inflammation*

Aucune inflammation systémique n'a été détectée puisqu'on ne retrouve pas de cytokines IL-1 $\beta$  (expérimentations 1 et 2) ou TNF- $\alpha$  (expérimentation 2) dans le sang (résultats non montrés). Cette absence d'augmentation s'explique par la brièveté de l'exposition à la chaleur, entre 60 et 90 min, insuffisante pour laisser une néosynthèse s'installer. En effet, les délais d'apparition des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  observés dans la littérature sont généralement supérieurs à 60 min lors d'une exposition à la chaleur [91, 284, 288, 291, 358, 522]. A l'extrême, aucune augmentation d'IL-1 $\beta$  n'est observée chez la souris après 252 min d'exposition à la chaleur, alors que leur température corporelle atteint 42,7°C, ce qui

correspond à un stress chaud intense avec 8% de mortalité. En revanche, l'augmentation est présente 115 min après l'arrêt de l'exposition, soit environ 6 heures après le début de l'exposition [266].

Pour autant, les ARNm d'IL-1 $\beta$  sont augmentés dans le cerveau, laissant penser que les mécanismes de l'inflammation ont été lancés. Cette augmentation a été observée après 60 min et/ou 90 min d'exposition à la chaleur dans l'hypothalamus et le cortex frontal avec une forte cohérence dans ce dernier entre les expérimentations 1 et 2 puisque les augmentations sont respectivement 2,4 et 2,5 fois plus élevées chez les animaux à risque et les animaux intolérants par rapport à leur témoins respectifs. Pour le TNF- $\alpha$ , l'induction est moins marquée puisqu'une augmentation des ARNm est observée (i) dans le cortex frontal uniquement chez les animaux métyrapone du groupe à risque léthal après 60 min d'exposition à la chaleur et (ii) seulement dans l'hypothalamus des animaux intolérants après 90 min d'exposition à la chaleur. Ces augmentations cérébrales sont en accord avec la littérature puisque (i) les protéines IL-1 $\beta$  [284] et TNF- $\alpha$  [283] sont augmentées dans le tissu cérébral après CC (soit 80 min après le début d'exposition à la chaleur de rats anesthésiés), suggérant l'induction des ARNm en amont ; (ii) les ARNm IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  augmentent dans le cortex, avec un pic une heure après ischémie-reperfusion [510].

Cette activation des processus pro-inflammatoires apparaît avant les premières manifestations cliniques de CC, puisque les animaux sont tous conscients et leur T<sub>co</sub> finale reste en dessous du CTM défini par Erskine [135]. Elle constitue donc un marqueur pré-clinique de vulnérabilité à la chaleur. L'augmentation des ARNm TNF- $\alpha$  est moins franche, laissant suggérer une induction plus tardive du TNF- $\alpha$  en rapport à l'IL-1 $\beta$  dans l'évolution physiopathologique du CC. Les ARNm TNF- $\alpha$  peuvent donc être considérés comme un marqueur de souffrance cellulaire plus avancé que les ARNm IL-1 $\beta$  dans la genèse du CC. Le dosage des ARNm de ces deux cytokines n'est donc pas redondant mais complémentaire car il amène un critère de gravité dans le développement de la pathologie du CC.

Cette présence d'ARNm de cytokines cérébrales et leurs cinétiques d'apparition rapides ne peuvent valider l'exclusivité de l'origine périphérique des cytokines, que ce soit par traversée passive ou active de la barrière hémato-encéphalique (BHE), par libération de NO et prostanoïdes ou par stimulation du nerf vague (I.C.4., page 39). L'hypothèse immuno-inflammatoire périphérique [342] ne peut donc constituer le fondement de l'émergence du CC. Pour autant, si la translocation des endotoxines digestives n'est pas à l'origine du CC, elle intervient dans la genèse du SRIS. Nous apportons donc ici une preuve d'activation de processus inflammatoires locaux au niveau du tissu cérébral. Il est probable que cette activation existe aussi dans d'autres organes.

#### *d. Activation cérébrale*

Les animaux contrôles présentent des quantités d'ARNm des trois IEGs détectables dans le cortex frontal et l'hypothalamus, renforçant l'hypothèse d'une présence constitutive de ces ARNm, non systématiquement détectée, en particulier pour c-fos [98, 192, 205] (Pré-requis, I.B.1., page 86). A la chaleur, leur expression augmente faiblement chez les animaux tolérants et augmente d'avantage chez les animaux intolérants, quelque soit la région cérébrale. Cette activation cérébrale à la chaleur est en accord

avec l'augmentation des ARNm c-fos dans l'hypothalamus observée dès 20 min d'exposition à la chaleur de rats anesthésiés [290, 482]. Les variations les plus importantes entre tolérants et intolérants sont observées pour c-jun (multipliée par 3,7 et 2,6 respectivement dans l'hypothalamus et le cortex frontal) et pour c-fos (multipliée par 3,0 et 2,8 respectivement dans l'hypothalamus et le cortex frontal) et les plus faibles pour EGR1 (multipliée par 1,5 et 1,4 respectivement dans l'hypothalamus et le cortex frontal). La discrimination des animaux intolérants à la chaleur est donc plus difficile par le dosage de EGR1 que par celui de c-fos et c-jun, ces deux derniers apportant des informations similaires.

Cette différence de patron d'expression entre les IEGs laisse suggérer des mécanismes d'induction différents à la chaleur. Comme abordé dans les pré-requis (I.B.2., page 87), les glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle différentiel sur les IEGs : leur action inhibitrice s'exercerait principalement sur c-fos et c-jun et dans une moindre mesure sur EGR1 [390, 439, 485]. Ceci peut en partie expliquer la moindre variation des ARNm EGR1 entre tolérants et intolérants, comparativement à celle des ARNm c-fos et c-jun.

#### *e. Agression cérébrale*

Dans la pré-expérimentation, l'expression corticale des ARNm Hsp70 est augmentée chez les animaux en hyperthermie et l'est davantage chez les animaux en CC. Dans l'expérimentation 1, l'expression corticale des ARNm Hsp70 est déjà augmentée chez les animaux dont la charge thermique est inférieure à 20°C.min, mais l'est bien d'avantage chez les animaux dépassant les 20°C.min. Des résultats analogues ont été observés dans l'expérimentation 2 à la fois dans le cortex frontal, l'hypothalamus et l'hypophyse : l'expression des ARNm Hsp70 est faiblement augmentée chez les animaux tolérants, l'est un peu plus chez les médians et l'est bien d'avantage chez les intolérants. Ainsi, une forte cohérence d'expression d'ARNm Hsp70 existe entre les trois expérimentations et l'expérimentation 1 permet de modéliser l'induction des ARNm Hsp70 à la chaleur chez l'animal naïf.

L'augmentation des ARNm Hsp70 est très précoce (45 min d'exposition à la chaleur) et concerne les deux types d'Hsp70. Une telle réactivité a déjà été observée [32, 312], mais encore jamais décrite pour les deux types d'Hsp70. En revanche, nos résultats ne montrent pas d'induction différentielle à la chaleur. La modélisation de l'expression d'ARNm Hsp70 en fonction de la  $T_{re}$  de l'animal à la fin de l'exposition a permis d'identifier un caractère exponentiel de l'induction des ARNm Hsp70 et de calculer leur seuil d'apparition (**Figure 22**). Celui-ci se situerait aux alentours de 39°C pour les deux types d'Hsp70, ce qui confirme les données de [32], montrant une induction pour des températures corporelles inférieures à 40°C. Les mécanismes sous-jacents de cette relation seront abordés dans le chapitre suivant (III.A.3., page 128).

La présence d'une agression cérébrale est corroborée par les augmentations des ARNm MCIP1, relativement faibles chez les tolérants et plus marquées chez les intolérants. Les animaux intolérants présentent donc des signes de forte activation calcique en relation avec la quantité de protéines dénaturées.

## *f. Conclusion*

Ainsi, malgré les différences de méthodes expérimentales et les biais qui en découlent, les différences de critères de jugement utilisés, l'un basé sur la charge thermique et le risque léthal et l'autre sur la  $T_{abd}$  finale, nous aboutissons à une forte cohérence de caractérisation d'un animal intolérant à la chaleur.

L'évolution progressive, voire exponentielle pour les Hsp70, de tous les paramètres étudiés entre les animaux contrôles, les animaux à faibles risques ou tolérants, et les animaux à hauts risques ou intolérants est en faveur d'un continuum d'évolution physiopathologique vers le CC.

**Tableau 8 :** Résumé des caractéristiques des animaux tolérants et intolérants à la chaleur au niveaux systémique et cérébral.

	<i>TOLERANTS</i>	<i>INTOLERANTS</i>
<i>niveau systémique</i>	Déshydratation modérée Activation sympathique modérée Faible activation métabolique Concentrations élevées d'ACTH et de glucocorticoïdes Absence d'inflammation systémique	Déshydratation sévère Hyperactivation sympathique Déséquilibre métabolique Moindres concentrations d'ACTH et de glucocorticoïdes Absence d'inflammation systémique
<i>niveau cérébral</i>	Faible activation cellulaire ↗ ARNm Hsp70 avec corrélation à la charge thermique Signes d'agression cellulaire faibles Absence d'activation des processus inflammatoire (ARNm IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$ ) Activation processus anti-inflammatoire (↗ ARNm I $\kappa$ B $\alpha$ )	Hyperactivation cellulaire ↗↗ ARNm Hsp70 avec disparition de la corrélation à la charge thermique Signes d'agression cellulaire Activation des processus inflammatoires (↗ ARNm IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$ ) Absence d'activation processus anti-inflammatoire (ARNm I $\kappa$ B $\alpha$ )

### ***III. Les mécanismes de la vulnérabilité à la chaleur***

#### **A. Rôle du stress cellulaire dans la vulnérabilité à la chaleur**

##### ***1. Hypothèse originelle***

Les données de la littérature permettaient de supposer que la vulnérabilité à la chaleur pouvait être liée à un défaut d'induction en Hsp70. Chez l'homme, la sévérité du CC est positivement corrélée à la quantité d'anticorps anti-Hsp70 [511, 527]. Chez l'animal, la surexpression d'Hsp70 conduit à une amélioration de la réponse physiologique à la chaleur [263, 508, 534]. Ce caractère protecteur des Hsp70 à la chaleur légitime l'hypothèse d'un défaut de production d'Hsp70 chez les intolérants.

##### ***2. La relation Hsp70-risque de CC***

Cette hypothèse initiale est réfutée par les résultats concordants apportés par les deux modèles expérimentaux. Les animaux les moins tolérants à la chaleur présentent les niveaux d'expression d'ARNm Hsp70 les plus élevés et inversement, les animaux les plus tolérants sont ceux présentant les taux les plus réduits d'expression d'ARNm d'Hsp70. Les animaux vulnérables à la chaleur ne présentent donc pas de défaut de production d'ARNm Hsp70.

Il est clair que les ARNm Hsp70 ne portent pas en eux-mêmes de valeur protectrice puisque celle-ci repose sur l'expression de protéines fonctionnelles, lesquelles ne sont détectées seulement quatre heures après le début de l'exposition à la chaleur [312, 520]. Si les protéines Hsp70 agissent, ce ne peut être que dans la phase de récupération après exposition à la chaleur. Le niveau d'expression des protéines Hsp70 pourrait alors éventuellement être corrélé à l'étendue des lésions ou au taux de survie après le CC. Or, nos travaux sont focalisés sur la phase d'induction de la pathologie thermique. Il est donc peu probable que les protéines Hsp70 néosynthétisées interviennent dans la vulnérabilité à la chaleur. Tout au plus peut-on incriminer les taux d'expression de protéines Hsc72 constitutives ou Hsp70 préinduites par un conditionnement préalable. Les ARNm Hsp70 transcrits lors de la phase précoce ne peut être prédictive du niveau de tolérance à la chaleur, mais intervient néanmoins dans les chances de survie après le CC s'ils sont traduits en protéines fonctionnelles.

Il existe donc une phase intermédiaire durant laquelle les protéines Hsp70 sont en cours d'expression sans être pleinement opérationnelles. Pendant cette phase sans protection, il existe une agression environnementale chaude et une consommation énergétique du fait de la synthèse protéique en cours. C'est une phase de vulnérabilité, insérée entre l'absence de risque et l'apparition d'une protection. Sa durée peut être réduite au maximum chez les animaux tolérants par une induction rapide des Hsp70 aboutissant à une protection avant que la situation physiologique ne se dégrade, mais aussi chez les animaux intolérants par une dégradation rapide de la situation physiologique avant que la protection ne puisse apparaître. Le risque de CC s'inscrit donc dans le cadre d'une cinétique avec une compétition entre

l'enclenchement des mécanismes lésionnels et l'induction des mécanismes protecteurs. Cette cinétique n'est pas linéaire mais exponentielle, suggérant l'existence d'une véritable course contre la montre entre mécanismes délétères cellulaires et protecteurs.

### ***3. Les ARNm Hsp70 comme marqueurs de stress cellulaire***

Pour considérer la production d'ARNm d'Hsp70 comme marqueur de l'agression cellulaire, il faut déterminer la quantité d'ARNm Hsp70 transcrits en réponse à un niveau de contrainte identique chez tous les animaux. Or, le niveau de contrainte extérieure ( $T_a$ ) appliqué à l'animal ne reflète pas nécessairement le niveau de contrainte réel subi par les cellules exprimant les Hsp. Comme dans le cadre du stress psychologique, le niveau de stresser appliqué n'a pas de rapport direct avec le niveau de stresser biologique perçu et donc de stress généré. Il existe une transformation non linéaire du stresser physique en un stresser biologique.

Cette remarque contraint à réfléchir en termes de stresser biologique et non en termes de stresser physique. Le niveau de contrainte cellulaire ne peut pas être contrôlé mais on peut supposer que le niveau de  $T_{co}$ , ou la charge thermique soit un indice suffisant, la chaleur étant le principal stimulus de l'induction des Hsp [244]. Nos résultats montrent que cette relation n'est valable que pour de faibles charges thermiques, autrement dit à des niveaux encore physiologiques. Une analyse de corrélation effectuée dans l'expérimentation 1 au sein de chacun des deux groupes de charges thermiques permet de préciser les inducteurs potentiels des ARNm Hsp70. Pour de faibles charges thermiques, on observe une forte corrélation entre expression d'Hsp70 et  $AUC_{40,4}$ , ce qui suggère que la température locale soit l'inducteur principal et direct des ARNm Hsp70. Ce résultat corrobore les études reliant le niveau d'ARNm Hsp70 à la température corporelle et la durée d'exposition [32] et considérant la chaleur comme le principal inducteur d'Hsp70 [244]. L'induction modérée des ARNm Hsp70 peut alors être considérée comme un marqueur précoce de la réactivité cellulaire cérébrale à la chaleur, non pathologique.

Dans la zone d'intérêt pathologique, à la contrainte thermique s'ajoute d'autres modifications cellulaires potentiellement inducteurs des Hsp70. En effet, les mêmes études de corrélation montrent que, pour de fortes charges thermiques, la corrélation entre expression d'Hsp70 et  $AUC_{40,4}$  disparaît, suggérant l'apparition d'autres facteurs inducteurs. Ces facteurs additionnels pourraient inclure : (i) le déséquilibre métabolique [244], révélé par l'accumulation de lactate sanguin [552] ; (ii) des facteurs-tiers activant à la fois la transcription d'IL-1 $\beta$  et Hsp70 comme les activateurs de PKC, des concentrations élevées d'AMPc et de radicaux libres, une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ , la formation de complexes AP-1 [244, 513]. Ainsi, lorsque l'expression des ARNm Hsp70 n'est plus directement reliée à la charge thermique, son niveau peut être considéré comme un marqueur de souffrance cellulaire, à un moment où l'organisme entre dans un état pathologique. Le stress perçu par la cellule devient la somme du stresser appliqué (la chaleur locale) et du stresser né de la dysfonction cellulaire. Ceci est en accord avec la relation exponentielle entre expression d'ARNm Hsp70 et  $T_{re}$  finale.

#### **4. L'ambiguïté du pré-conditionnement**

Pour autant cette analyse ne peut se tenir que dans la mesure où les animaux sont exposés naïvement à la chaleur. Les modèles basés sur la pré-induction des Hsp70 ne permettent que de mettre en évidence le rôle neuroprotecteur des Hsp70 et d'analyser les mécanismes empruntés. Toute modification des conditions de la cinétique de compétition entre facteurs délétères et protecteurs décale les seuils de zones vers des niveaux d'agression physique plus intense. Pour une cellule, posséder des taux « constitutifs » plus élevés d'Hsp70 permet de se protéger contre des quantités plus élevées de protéines dénaturées de manière synchronique mais aussi de déclencher la néosynthèse avec une cinétique plus grande. En effet, l'apparition de protéines dénaturées mobilise les molécules d'Hsp70 constitutives, entraînant un clivage des HSF qui conduit à l'activation de la transcription. Les quantités de protéines dénaturées prises en charge ainsi que d'HSF activés induisant la néosynthèse d'Hsp seront donc d'autant plus importantes que la quantité de protéines Hsp70 constitutives est élevée (III.D.2., page 66). C'est donc la relation entre stress physique et stress biologique qui est affectée.

Or l'utilisation d'un modèle naïf, comme nous l'avons fait, permet de mieux coller à la réalité de l'intolérance à la chaleur chez l'homme. En effet, dans le CCC, il n'y a généralement pas de pré-conditionnement possible. Ce pré-conditionnement peut éventuellement exister chez des sujets pratiquant des exercices intenses et prolongés dans le cadre du risque de CCE. En effet l'exercice favorise l'expression d'Hsp70 dans le cerveau [66, 506], le cœur [66, 359] et le muscle [459] et est associée à une protection contre le CC [207]. Dans ce cas, on peut considérer que les sportifs sont moins vulnérables à la chaleur, comme le suggère l'excellente tolérance à la chaleur des marathoniens capables de continuer leur course à des niveaux de  $T_{co}$  très élevés sans signes cliniques de CC [311].

#### **5. Conséquences thérapeutiques potentielles**

Le fait qu'il puisse exister une période de vulnérabilité entre production d'ARNm et de protéines Hsp70 et que les taux de protéines Hsp70 puissent être protecteurs lors de la phase de SIRS, indique qu'une voie thérapeutique puisse exister. Cette voie double repose sur (i) une accélération de l'expression des Hsp70 par des composés ayant la capacité d'induire *per se* les Hsp comme l'herbimycine A, un inhibiteur des TR [413], le geldanamycine et ses dérivés, la cyclosporine, la doxorubicine, les glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens [379]; (ii) une réduction de la pression en protéines dénaturées par traitement en inhibiteurs de NO synthase [235, 306], en anti-radicaux libres comme le magnolol [84], l' $\alpha$ -tocophérol [358] et le EGB-761 [448], améliorant tous la tolérance à la chaleur. Il ne faut toutefois pas perdre de vue que cette néosynthèse est coûteuse en énergie et qu'elle survient dans un contexte cellulaire de fragilité métabolique. Il importe donc de l'associer à une véritable réanimation cellulaire limitant la néosynthèse à ce qui est utile par la réduction de la demande.

## **6. Conclusion**

En conclusion, la valeur accordée au taux d'ARNm Hsp70 doit être appréciée en terme de zones, ces zones étant parfaitement bien définies par le caractère exponentiel de leur induction. Pour de faibles valeurs d'ARNm Hsp70, il s'agit d'une zone de fonctionnement allostasique dont le coût n'a pas dépassé les capacités cellulaires. Pour de fortes valeurs, il s'agit d'une zone de fonctionnement allostasique pour laquelle le coût a dépassé les capacités cellulaires, générant en lui-même un coût induit. Le stress cellulaire, lorsqu'il est dépassé induit un cercle vicieux auto-catalytique que reflète bien le mécanisme d'induction des Hsp70, agissant à une multitude de niveaux (III.D.3., page 67) et la courbe exponentielle qui en découle (Figure 22).

## **B. Rôle du stress systémique dans la vulnérabilité à la chaleur**

### **1. Hypothèse originelle**

En dépit de la faiblesse des données de la littérature relative à la tolérance à la chaleur suggérant qu'une insuffisance du stress soit à l'origine du CC, nous avons fait l'hypothèse d'un défaut de sécrétion de glucocorticoïdes chez les animaux les plus vulnérables à la chaleur. Cette hypothèse était basée sur les données de la littérature liant un déficit en glucocorticoïdes à une gravité des pathologies reliées (II.D.2.c, page 59).

Les deux modèles expérimentaux apportent des arguments en faveur d'un déficit en glucocorticoïdes associé à une plus grande vulnérabilité à la chaleur : (i) les animaux déplétés en glucocorticoïdes de manière pharmacologique sont ceux dont l'activation pro-inflammatoire cérébrale est la plus avancée ; (ii) les animaux les moins tolérants (niveau de  $T_{co}$  final élevé, déséquilibre métabolique, inflammation cérébrale plus avancée) pour un niveau de contrainte environnemental identique présentent un niveau de corticostérone plasmatique inférieur à celui des animaux les plus tolérants (Concentration plasmatique de corticostérone (en  $ng \cdot mL^{-1}$ ) dans : (a) expérimentation 1 :  $518 \pm 55$  vs  $88 \pm 29$  chez animaux PEG vs animaux métyrapone des groupes à risque léthal ; (b) expérimentation 2 :  $695 \pm 28$  vs  $461 \pm 29$  chez animaux tolérants vs animaux intolérants). Ce déficit en glucocorticoïdes n'est donc pas absolu. Il s'agit davantage d'un déséquilibre entre les besoins et la sécrétion, déséquilibre dont la valeur heuristique est posée par l'émergence de la pathologie. Ce n'est pas la valeur en soi de la corticostéronémie qui est indicative mais la coïncidence de cette valeur et de la pathologie concomitante.

Elle ouvre une discussion technique relative à la topographie fonctionnelle d'hyporéactivité de l'axe HPA et aux mécanismes conduisant à l'émergence d'une vulnérabilité à la contrainte chaude.

### **2. Analyse topographique de la dégradation de l'axe HPA**

En amont de la sécrétion de glucocorticoïdes, peut-on identifier un ou des niveaux de déficience de mobilisation de la chaîne HPA ? Cette analyse ne peut bien évidemment se faire uniquement qu'en

conditions naturelles de moindre sécrétion de glucocorticoïdes, excluant de ce fait toute manipulation pharmacologique et toute modulation de la réactivité de stress. Cette démonstration ne peut se faire que chez des animaux naïfs face au stress et au chaud.

L'analyse de la chaîne HPA en amont de la sécrétion des glucocorticoïdes n'a pas permis de mettre en évidence un déficit majeur à un niveau donné de l'axe (cortex surrénalien, hypophyse, hypothalamus). Cette absence de résultats peut être imputable à plusieurs facteurs confondants dont aucun ne peut être exclu *a priori* : (i) la faiblesse de l'effet observé. Si les résultats sont statistiquement clairs pour les dosages biologiques, en partie en raison de l'importance des variations hormonales induites par le stress chaud, il n'en va pas de même pour les dosages de biologie moléculaire. La modestie de l'effet s'explique par la modération du stress n'allant pas jusqu'à la dérégulation thermique et *a fortiori* l'ischémie cérébrale. Les animaux ne sont pas en CC ; (ii) la grande variabilité des résultats obtenus en biologie moléculaire. Elle s'explique par la relative faible spécificité des prélèvements notamment pour les ARNm CRF dans l'hypothalamus et dans une moindre mesure pour les ARNm POMC dans l'hypophyse. En particulier, les prélèvements hypothalamiques auraient pu être ciblés sur le PVN, par punch de zone, posant alors un autre problème de technique d'extraction en raison du faible poids des échantillons ; (iii) l'existence de pools pré-existants d'ARNm CRF. Cette expression constitutive [191] peut masquer les modifications d'expression relativement faibles en rapport avec la quantité pré-existante relativement élevée. Un dosage des ARN hétéronucléaires (transcrits primaires) aurait pu fournir un meilleur reflet de la réactivité transcriptionnelle du gène CRF [162, 191, 210].

En revanche, il existe chez les animaux intolérants à la chaleur un contraste saisissant entre l'absence de modification de synthèse d'ARNm CRF et POMC objectivables et l'importance de l'activation cellulaire des zones. L'analyse de l'expression des autres gènes au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse suggère (i) une forte activation cellulaire sous-tendue par l'exacerbation de l'expression des IEGs, (ii) une augmentation de la stimulation calcique cellulaire comme le suggère l'augmentation de MCIP1, (iii) une agression cellulaire suggérée par l'augmentation d'Hsp70 et (iv) une libération de l'inflammation locale témoignée par l'induction des ARNm IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ . Ce contraste suggère qu'une activation hypothalamique et hypophysaire existe, mais sans augmentation de la production de neuropeptides. Une telle hypothèse demande à être validée par des expérimentations de même nature, en environnement moins contraignant (35°C durant 24h par exemple) afin de laisser le temps aux nouvelles protéines CRF et POMC d'être synthétisées.

### ***3. Conséquences mécanicistes d'un déficit en glucocorticoïdes***

Plusieurs éléments caractérisent les animaux intolérants à la chaleur, les liens mécanicistes qui les relient existent et sont cohérents mais restent partiels. Plusieurs pistes hypothétiques et non exclusives peuvent être évoquées, reliant la moindre quantité de glucocorticoïdes à l'activation des processus inflammatoires et à l'induction des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$ .

### *a. Interaction entre hypoglucocorticoïdergie et inflammation*

L'existence d'un effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur les mécanismes inflammatoires a largement été abordée dans les rappels bibliographiques (II.C.4., page 54). Leurs effets sur l'induction des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  passent (i) par voie génomique en (a) activant la synthèse de protéines anti-inflammatoires comme IL-1ra, (b) inhibant la transcription des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  par interaction entre GR et facteurs de transcription [20, 21, 463] et (c) réduisant la stabilité des ARNm IL-1 et TNF- $\alpha$  [467] et (ii) par voie non génomique en activant des protéines anti-inflammatoires dans le cytosol [391].

Ainsi, lors d'une exposition à la chaleur, les glucocorticoïdes retardent certainement la mise en place de la réaction inflammatoire. Les situations d'hypoglucocorticoïdergie apparaissent donc défavorables à une bonne tolérance à la chaleur par une réduction d'inhibition des processus pro-inflammatoires. Cette hypothèse est soutenue par (i) nos résultats puisque les animaux déplétés ou déficients en glucocorticoïdes sont les plus vulnérables et ceux dont l'activation inflammatoire est la plus avancée ; (ii) les données de la littérature montrant qu'un traitement en dexaméthasone avant exposition au chaud conduit à l'amélioration de la survie associée à la réduction de l'IL-1 $\beta$  plasmatique [276, 291].

Le rôle des cytokines dans la genèse du CC se voit complètement recadré avec les arguments soutenant (i) une production locale multi-tissulaire et non une origine seulement périphérique ; (ii) une importance non négligeable dans la physiopathologie du CC ; (iii) une forte interaction avec le stress systémique. La néosynthèse de cytokines dans le tissu nerveux lors de l'exposition à la chaleur les fait donc entrer de bon droit dans la physiopathologie du CC.

### *b. L'impact des glucocorticoïdes sur l'induction des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$*

#### ➤ La valeur d'I $\alpha$ B $\alpha$ comme protéine de choc thermique

Nous avons vu que la protéine I $\alpha$ B $\alpha$  était considérée comme une nouvelle protéine de choc thermique en raison de sa forte induction suite à l'exposition au chaud [117, 129, 380, 523, 524]. Elle ferait donc partie des mécanismes protecteurs au même titre que les Hsp. On aurait donc pu s'attendre à un patron d'activation similaire des ARNm Hsp70 et des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$  chez nos animaux exposés à la chaleur. Ce n'est clairement pas le cas. Les patrons d'expression sont opposés : (i) les animaux tolérants à la chaleur présentent une augmentation de l'expression des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$  associée à une légère élévation de l'expression des ARNm Hsp70 ; (ii) les animaux intolérants ne présentent pas d'augmentation des ARNm I $\alpha$ B $\alpha$  mais une très forte élévation des ARNm Hsp70. Ces deux facteurs potentiellement protecteurs répondent donc de manière totalement différente au stress chaud selon le degré de tolérance. L'opposition des patrons d'expression peut s'expliquer par une différence d'inducteurs : les Hsp70 sont moins sensibles au signal stimulateur des glucocorticoïdes mais plus sensibles aux modifications cellulaires induites directement par la chaleur alors que I $\alpha$ B $\alpha$  serait plus sensible aux glucocorticoïdes et moins sensible aux modifications cellulaires. Ceci suggère que, si les Hsp70 représentent un système suiveur comme nous

l'avons montré précédemment, I $\kappa$ B $\alpha$  est le système cellulaire réellement couplé au stress systémique. Il faudrait donc reformuler nos hypothèses en utilisant ce marqueur et non les Hsp70.

➤ La valeur d'I $\kappa$ B $\alpha$  comme inhibitrice d'inflammation

L'expression des ARNm I $\kappa$ B $\alpha$ , élevée chez les animaux tolérant à la chaleur, est stable chez les animaux intolérants. Le rôle inhibiteur d'I $\kappa$ B $\alpha$  sur la voie de NF- $\kappa$ B, et le rôle activateur de NF- $\kappa$ B sur TNF- $\alpha$  [531] suggère que les animaux tolérants aient développé une voie de contrôle inhibitrice de l'expression de TNF- $\alpha$ . Cette hypothèse est en accord avec la réduction des ARNm de TNF- $\alpha$  observée chez les animaux tolérants à la chaleur.

➤ Les interactions entre I $\kappa$ B $\alpha$  et les glucocorticoïdes

Les mécanismes d'activation d'I $\kappa$ B $\alpha$  soulèvent une difficulté d'interprétation. L'induction d'I $\kappa$ B $\alpha$  est stimulée par (i) les glucocorticoïdes [186, 425]; (ii) l'activation de la voie NF- $\kappa$ B étant donné que le promoteur du gène I $\kappa$ B $\alpha$  contient des sites de liaison NF- $\kappa$ B [214]. Le degré d'implication de ces deux activateurs est difficile à déterminer. Une forte implication des glucocorticoïdes est cohérente avec nos résultats puisque les animaux présentant l'expression la plus élevée d'ARNm I $\kappa$ B $\alpha$  sont ceux qui ont les plus hauts niveaux de glucocorticoïdes plasmatiques. Ainsi, les animaux intolérants présentent un défaut d'activation de ce mécanisme protecteur exercé par I $\kappa$ B $\alpha$  *via* l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B pro-inflammatoire. En revanche, l'implication de NF- $\kappa$ B est plus délicate à interpréter étant donné que son niveau d'activation n'est pas connu. Toutefois, on peut supposer que les animaux intolérants présentent la plus forte intensité des stimuli d'activation de NF- $\kappa$ B (radicaux libres, augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Une augmentation d'expression des ARNm I $\kappa$ B $\alpha$  aurait du alors être observée chez les animaux intolérants, ce qui n'est pas le cas. Ce résultat contradictoire peut être expliqué par (i) une réelle moindre activation de NF- $\kappa$ B, peu probable compte-tenu de l'élévation de l'expression des ARNm cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  qui témoigne de l'action du facteur de transcription NF- $\kappa$ B [531]; (ii) une déficience dans la boucle de rétrocontrôle négative, se situant au niveau de la transcription d'I $\kappa$ B $\alpha$ .

En conclusion, chez les animaux intolérants à la chaleur, la boucle de régulation négative de la voie NF- $\kappa$ B n'est pas effective et les niveaux de glucocorticoïdes sont relativement bas. Une des voies d'activation pro-inflammatoire semble donc dans un état d'activation élevé, non régulée négativement, alors que l'une des voies anti-inflammatoires, donc protectrice, est moins efficace. Il en résulte une importante activation des ARNm cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  chez les intolérants.

## ***IV. Relation entre stress et CC***

### **A. Généralités**

Le retentissement de ce déficit de mobilisation du produit terminal de l'axe HPA sur la tolérance à la chaleur entre dans un cadre plus général et complet d'un possible syndrome d'état de stress dépassé. Les expérimentations ont suggéré que les individus dont la sécrétion en glucocorticoïdes était altérée avaient une propension plus grande à développer une activation inflammatoire et une intolérance à la chaleur. La question qui émerge est donc : Dans quel cadre peut-on observer une telle coïncidence ? S'agit-il d'individus dont l'activation lors du stress est insuffisante ou excessive ? d'individus dont l'évolution vers l'épuisement de stress est plus rapide ?

Il faut donc replacer le problème dans une double dimension fonctionnelle et biologique. L'adéquation entre le stress et la contrainte appliquée durant tout le temps où celle-ci existe pour l'individu est la condition du maintien de la structure et donc de la survie. Cette adéquation repose sur (i) la capacité fonctionnelle biologique de l'individu et (ii) l'importance de la demande fonctionnelle liée au stress, c'est-à-dire la charge allostasique. Toute altération de la capacité fonctionnelle de l'axe HPA et/ou tout excès de la charge allostasique entraîne l'apparition d'une décoaptation entre stress et demande fonctionnelle conduisant d'autant plus rapidement à l'épuisement. C'est dans ce cadre dynamique que le problème sera envisagé. Les sujets à risque sont donc ceux dont la voie corticotrope est altérée, et/ou ceux dont la charge allostasique est la plus forte.

### **B. La qualité fonctionnelle de l'axe HPA**

#### ***1. Introduction***

La modulation de l'action des glucocorticoïdes s'exerce à différents niveaux, tous susceptibles de présenter une dysfonction. Brièvement, en amont se situe l'axe HPA dont la mobilisation peut être défectueuse (i) au niveau central : défaut de stimulation et/ou sécrétion de CRF au niveau du PVN ; (ii) au niveau périphérique : défaut de synthèse de POMC et/ou de sécrétion d'ACTH au niveau de l'hypophyse antérieure, défaut de stimulation et/ou de sécrétion de corticostérone dans le cortex surrénal. En aval, la disponibilité des glucocorticoïdes aux cellules et leur activité intracellulaire (cytosolique ou nucléaire) sont modulées par la CBG, les enzymes 11 $\beta$ -HSD et les récepteurs aux glucocorticoïdes.

Le premier point sur lequel il est important d'insister est l'inadéquation fondamentale de la variable de jugement. La corticostéronémie est une variable qui ne reflète pas nécessairement la qualité de la réponse du signal des glucocorticoïdes puisque l'action de ces derniers est cellulaire et qu'une partie du métabolisme glucocorticoïdique est intracellulaire. Elle reflète le niveau d'activation de la chaîne HPA et non son efficacité. Cette dernière s'apprécie par l'émergence d'une pathologie que nous avons explicitée sous l'appellation d'intolérance à la chaleur. Le déficit de glucocorticoïdes plasmatiques n'est donc qu'un

maillon de chaîne, voire même du cercle vicieux, dont la prépondérance reste à vérifier, d'autant plus que le niveau absolu est assez élevé chez les animaux intolérants par rapport aux valeurs basales.

## ***2. La fonctionnalité de l'axe HPA***

La fonctionnalité de l'axe HPA a déjà été discutée dans le chapitre précédent (III.B.2, page 130). Aucune dysfonction majeure n'a été décelée aux différents niveaux de l'axe : la diminution de l'ACTH plasmatique est en relation avec la diminution de la corticostérone chez les animaux intolérants excluant une déficience du cortex surrénalien. Cette diminution d'ACTH n'est en revanche pas en relation avec une diminution de l'expression des ARNm de POMC ou de CRF (résultats à considérer avec précaution compte tenu des facteurs confondants précédemment évoqués). En outre, la régulation de la mobilisation de l'axe HPA est sous influence de nombreuses et complexes modulations non analysées. Néanmoins, deux hypothèses peuvent être émises quant à la diminution de sécrétion d'ACTH : (i) une intégration inadéquate des signaux de stress avec pour conséquence une réaction insuffisante en rapport à la charge allostasique générée ou (ii) une incapacité de sécréter de nouvelles protéines car une puissance de crête a déjà été atteinte (état de stress dépassé caractérisé par une évolution vers un épuisement rapide).

## ***3. Disponibilité et métabolisme cellulaire des glucocorticoïdes***

### ***a. Disponibilité cellulaire des glucocorticoïdes***

La disponibilité des glucocorticoïdes aux cellules est modulée en premier lieu par la CBG, qui, liée à la corticostérone, la maintient sous forme inactive. Peu de données sont disponibles sur les effets de la chaleur sur la CBG, une absence d'effet à 4h [194] ou une inhibition à 7 jours [189] sont observées. Il est raisonnable de suspecter dans ce cas un effet similaire à celui du stress qui réduit la concentration de la CBG 6,5 heures après « inescapable tail shock » [145] par une action des glucocorticoïdes *via* le récepteur GR [461]. Cependant, les délais d'action de cet effet inhibiteur est trop long pour que ce mécanisme soit impliqué dans une augmentation de la disponibilité des glucocorticoïdes aux cellules chez nos animaux tolérants à la chaleur. Néanmoins, les intolérants à la chaleur peuvent présenter des concentrations de CBG sanguine de base plus importante, une moindre efficacité de l'internalisation de la CBG complexée à la corticostérone ou une synthèse locale intra-cellulaire de CBG plus élevée, les trois cas aboutissant à une réduction de la signalisation glucocorticoïdérique et donc de leurs effets anti-inflammatoires.

Au niveau des cellules endothéliales des capillaires de la BHE, la P-glycoprotéine, produite par le gène « multidrug-resistance gene » (MRD) protège le SNC de l'intrusion de substances systémiques dans le cerveau *via* une exportation active [451]. L'accès des glucocorticoïdes endogènes au cerveau est aussi contrôlé par ce transporteur [344, 373]. Les souris KO pour le gène MDR montrent une réduction de la mobilisation de l'axe HPA, suggérant une augmentation du rétrocontrôle inhibiteur *via* une accumulation de glucocorticoïdes au niveau des neurones hypohalamiques [344]. L'existence d'un polymorphisme du gène MDR chez l'homme a un impact sur l'absorption de certaines substances influençant ainsi leur

concentration tissulaire et leur efficacité thérapeutique [197]. Le blocage de ces « transporteurs stéroïdiens membranaires » provoque un effet anti-dépresseur [373]. Chez nos rats intolérants à la chaleur, une surexpression de cette protéine pourrait réduire les concentrations de glucocorticoïdes au niveau du tissu cérébral, réduisant ainsi leurs effets anti-inflammatoires et du même coup la tolérance à la chaleur.

#### *b. Métabolisme cellulaire des glucocorticoïdes*

Une véritable régulation locale du taux de glucocorticoïdes libres est exercée par la présence intracellulaire des enzymes 11 $\beta$ -HSD : la 11 $\beta$ -HSD2 détruit la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone alors que la 11 $\beta$ -HSD1 la régénère [199] (II.C.2.b., page 49). Ce métabolisme est sensible au stress puisqu'en aigu, il entraîne une activation de la 11 $\beta$ -HSD1 et une augmentation de son expression [199]. Le dernier effet pourrait passer par une activation du complexe GR-glucocorticoïdes, étant donné que le gène 11 $\beta$ -HSD contient un promoteur GRE. Cependant, le délai d'apparition des protéines 11 $\beta$ -HSD1 fonctionnelles est probablement supérieur à 90 min puisqu'il est génomique. L'hypothèse d'un défaut d'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 en réponse à la chaleur reste peu probable chez les animaux intolérants, le délai d'action de ce mécanisme étant trop long. Un défaut d'activité enzymatique de la 11 $\beta$ -HSD1 peut en revanche être suspecté à l'origine de leur plus grande vulnérabilité. On peut aussi émettre l'hypothèse d'un niveau basal de 11 $\beta$ -HSD1 anormalement faible chez les animaux intolérants.

#### *c. Conclusion*

Il peut donc exister un déséquilibre entre une demande excessive et une disponibilité insuffisante. Ceci suggère qu'il puisse exister un cercle vicieux, la moindre disponibilité laissant la main aux mécanismes cellulaires délétères, ce qui entraîne une augmentation de la demande qui ne peut être satisfaite...

### **4. La fonctionnalité des récepteurs aux glucocorticoïdes**

#### *a. Conséquences biologiques d'une dysfonction*

La fonctionnalité des récepteurs aux glucocorticoïdes peut être altérée selon diverses modalités : (i) une anomalie fonctionnelle d'un des récepteurs traduisant un polymorphisme de gène, (ii) une modification du fonctionnement des récepteurs par les conditions du stress chaud. Dans tous les cas, il survient un déséquilibre des 2 voies MR/GR conduisant à un signal mal équilibré dont le tableau psychobiologique peut être esquissé sur la base des études de biologie moléculaire relatives aux animaux rendus déficients aux GR. Les souris GR<sup>+/-</sup> [394] et les souris knock-out GR [50] adoptent un comportement dépressif lorsqu'elles sont exposées à des situations environnementales aversives, représentant ainsi de bons modèles d'étude de dépression. 90% des souris knock-out GR ne sont pas viables avec une insuffisance respiratoire [94].

## *b. Isoformes GR et polymorphisme génétique*

### ➤ Isoformes GR

L'existence de différents isoformes de GR serait impliquée dans la modulation de la signalisation des glucocorticoïdes. Le gène GR contient 9 exons dont les premier et dernier sont soumis à des épissages alternatifs, générant différents variants d'ARNm, parmi lesquels les GR $\alpha$  et  $\beta$  sont les deux plus abondants. Le GR $\alpha$  est exprimé de manière ubiquitaire et fonctionnellement activé par les glucocorticoïdes. Le GR $\beta$ , incapable de se lier aux glucocorticoïdes, ne peut activer la transcription et inhibe même l'action du GR $\alpha$ . Sa distribution est en revanche plus sélective et se trouve à des concentrations généralement inférieures à celles des GR $\alpha$  [119, 128, 402, 546]. Le niveau relatif de ces isoformes influence donc la sensibilité des cellules aux glucocorticoïdes et le rendement de la transduction du signal glucocorticoïdes. Une diminution de la synthèse de GR $\beta$  pourrait être associée à une hypersensibilité aux glucocorticoïdes alors qu'une forte expression des GR $\beta$ , par exemple sous une stimulation par IL-2 et IL-4 [412], pourrait s'accompagner d'une relative résistance aux glucocorticoïdes.

### ➤ Polymorphisme génétique

Chez l'homme, certaines mutations du gène codant pour le GR sont associées à l'émergence de pathologies cardio-vasculaires et métaboliques et dépressives. A un moindre degré, ce polymorphisme est responsable de la variabilité de la sensibilité aux glucocorticoïdes observée dans la population normale par la modulation des capacités de transactivation et de transrépression des GR [119, 206, 410, 490-492, 528, 546]. Les polymorphismes N363S et BclI sont associés à une hypersensibilité aux glucocorticoïdes, conduisant à une élévation de l'index de masse corporelle, une hypersensibilité à la sécrétion d'insuline et une augmentation des taux de cholestérol (syndrome métabolique [402]). Inversement, le polymorphisme ER22/23EK est associé à une résistance aux glucocorticoïdes modérée, conduisant à un meilleur équilibre métabolique et un risque de démence réduit chez les personnes âgées [492]. Enfin, les porteurs des polymorphismes BclI et ER22/23EK sont plus susceptibles de développer un syndrome dépressif [490].

### ➤ Conséquences dans la tolérance à la chaleur

Chez nos animaux non triés génétiquement (OFA Sprague-Dawley fournis par Iffa Credo-Charles River, élevation de l'Arbresles), il est possible que les isoformes et le polymorphisme interviennent dans la modulation de la signalisation des glucocorticoïdes et donc prennent une responsabilité dans l'apparition de l'intolérance à la chaleur. En effet, une résistance aux glucocorticoïdes peut conduire à une moindre activité anti-inflammatoire (moindre activation de la transcription des ARNm I $\kappa$ B, réduction de la répression des ARNm IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  par la voie NF- $\kappa$ B et par voie directe) et donc une moindre tolérance à la chaleur. Cette hypothèse appelle une analyse des différents récepteurs exprimés par les animaux en fonction de leur statut.

### *c. Dysfonction par altération fonctionnelle*

L'exposition à la chaleur entraîne une diminution de la capacité de liaison des GR dans le cytoplasme et de l'activité de l'enzyme TAT reflétant la transactivation des GR dans le foie [499]. Pourtant, un changement de localisation intracellulaire des GR caractérisé par une translocation du cytoplasme vers le noyau est aussi observée dans les mêmes conditions [102]. Ce dernier résultat est en faveur d'une stimulation du signal glucocorticoïdérique propre au stimulus thermique puisque l'effet est plus important qu'après traitement par la dexaméthasone [102]. Le stress chaud potentialiserait donc la translocation nucléaire des GR.

La capacité de liaison des GR est dépendante du statut redox cellulaire : des conditions oxydatives inactivent les GR par formation de ponts disulfures [131]. L'exposition à la chaleur modifie ce statut redox puisque des ponts disulfures intra- et inter-moléculaires se forment [131]. Le stress chaud perturbe donc le fonctionnement des GR *via* la modification du statut redox.

En conclusion, bien que le stress chaud semble potentialiser l'activité des GR, un statut cellulaire oxydé altère son fonctionnement. On peut supposer que l'influence stimulatrice ou inhibitrice de l'exposition à la chaleur sur le fonctionnement des GR n'est qu'une question de niveau de charge allostasique. Chez les animaux intolérants, on peut suspecter une capacité fonctionnelle des GR altérée par la charge allostasique trop importante représentée par un haut niveau d'oxydation cellulaire.

## **C. Qui sont les animaux à risque**

### ***1. Les animaux à risque de l'expérimentation***

Les animaux à risque peuvent être *(i)* des animaux dont l'intensité de stress est inappropriée à l'agression, soit par une réaction insuffisante conduisant à un stress biologiquement moins actif, soit par une activation exacerbée. Dans les deux cas, un déséquilibre apparaît par une surcharge allostasique générée soit par l'agression soit par le coût biologique de l'excessivité de la réaction de l'organisme. Il en ressort une usure plus rapide sous contrainte ; *(ii)* des animaux dont l'intensité de stress est normale mais dont la capacité à tenir une forte sécrétion dans le temps est anormale. Dans ce cas, les animaux vulnérables à la chaleur présentent un stress initial normal mais dont l'épuisement se manifeste rapidement. La courbe d'évolution des variables physiologiques risque d'être biphasique, identique entre groupe dans la phase initiale puis se séparant avec une dérive intense. Dans les trois cas, l'évolution des processus délétères induits par la chaleur est mal limitée par l'évolution des processus protecteurs du stress et les animaux se trouvent plus rapidement dans une situation de stress dépassée.

Lorsque l'expérimentation a été arrêtée, nous avons des animaux intolérants à la chaleur avec un statut soit de stress inadéquat, soit de stress normal avec épuisement rapide. L'absence de cinétique de sécrétion des glucocorticoïdes ne permet pas de dire si la moindre sécrétion était le reflet *(i)* d'une sécrétion stable à niveau réduit (un stress insuffisant), *(ii)* d'une sécrétion initiale à plus fort niveau mais en

cours de décroissance (stress excessif), (iii) d'une sécrétion initiale normale et d'une décroissance trop rapide (stress normal avec épuisement rapide). Le caractère instantané de l'information ne permet pas de conclure sur une évolution.

En revanche, il peut être discuté le fait que les animaux étaient préalablement dans un état de stress approprié, ou non, dans les phases précoces. En effet, la méthode utilisée de mesure de  $T_{abd}$  et de l'activité locomotrice spontanée permet de dresser pour chaque animal sa carte d'identité comportementale avec les valeurs au début de l'exposition de la contrainte et leurs cinétiques de modification. Cette approche se base sur deux variables, l'une physiologique ( $T_{abd}$ ) et l'autre comportementale (la locomotion spontanée), les deux étant relativement (mais pas totalement) indépendantes et soumises aux fluctuations du stress.

Un animal stressé présente une hyperthermie de stress [54, 132, 367, 494] et une hyperactivité [198, 427]. L'hyperthermie de stress inappropriée dans les phases précoces d'exposition au chaud, n'est évidemment pas favorable à la lutte contre l'agression thermique. L'impact de l'hyperactivité locomotrice sur la tolérance à la chaleur est plus délicat à qualifier. L'activité locomotrice est en relation avec la  $T_{abd}$ , quoique de manière indirecte. Que ce soit en environnement frais ou chaud, l'activité locomotrice ne contribue pas de manière significative aux variations de  $T_{co}$  [169]. Cependant, une augmentation de l'activité locomotrice entraîne une augmentation du métabolisme, donc de la production de chaleur, contribuant à l'élévation de  $T_{abd}$  et sollicitant donc davantage les mécanismes de thermolyse déjà activés en environnement chaud. L'hyperactivité locomotrice apparaît donc comme une réaction comportementale inappropriée face au stress thermique. Ainsi, les animaux intolérants présentent à la fois un stockage thermique le plus important et une activité locomotrice élevée. Il est donc probable qu'hyperthermie et hyperactivité de stress aient une influence péjorative sur l'évolution de l'animal à la chaleur. Pour autant, ces deux variables sont indépendantes puisque l'effondrement de l'activité locomotrice en fin d'exposition à la chaleur chez les animaux intolérants ne s'accompagne pas d'une réduction de stockage thermique. Un comportement plus adapté passe donc par une réduction de locomotion, abaissant la production de chaleur endogène. De fait, les animaux tolérants ont une activité locomotrice spontanée minimale et un stockage thermique le plus bas. Pour autant leur activité est plus intense que celle des animaux exposés à la neutralité, validant de ce fait le lien entre stress, témoigné par les taux élevés de glucocorticoïdes à la chaleur, et niveau d'activité locomotrice spontanée.

Cette évolution distincte selon les groupes appelle deux remarques : (i) L'hyperactivité et l'hyperthermie sous contrainte sont prédictives de la vulnérabilité à la chaleur. Cette prédiction n'est possible que pour des organismes sous tension : aucune prédiction n'est apparemment réalisable avec des valeurs prélevées en situation de repos. Tout se passe comme si la susceptibilité, non visible à l'état basal ou lors de stress peu intenses, est révélée dès lors que l'organisme est mis sous contrainte suffisante, et ce de manière relativement précoce. (ii) La séparation des courbes d'activité locomotrice et de  $T_{abd}$  est effective dès le début de l'exposition au chaud (30 min environ). Ceci suggère que les animaux intolérants à la chaleur réagissent de manière inadaptée très précocement, ce qui sous-entend l'existence d'un état biologique inadaptée sous-jacent.

## ***2. Les mécanismes potentiels***

Cette cinétique d'évolution variable entre groupes suggère une base neurobiologique différente selon les groupes de risque et dont l'hyperthermie et l'hyperactivité sont des marqueurs. Le caractère double de la cinétique d'évolution suggère l'existence de deux mécanismes distincts, l'un relatif au début d'exposition et l'autre relatif à la fin d'exposition avec dissociation entre  $T_{abd}$  et locomotion.

La forte augmentation conjointe de  $T_{abd}$  et d'activité locomotrice initiale peut s'expliquer par plusieurs hypothèses non exclusives dont le point commun serait un défaut d'ajustement de la réponse aux besoins. (i) Une réaction initiale excessive de sécrétion de glucocorticoïdes est soutenue par le fait que les glucocorticoïdes reversent les perturbations de l'activité locomotrice (réduction d'activité) induite par l'adrénalectomie [361, 495]. (ii) Un excès de neurotransmission catécholaminergique, y compris dopaminergique est soutenu par le fait que (a) les antidépresseurs tels que les agonistes dopaminergiques, les inhibiteurs de recapture de la dopamine et de la noradrénaline sont connus pour réduire l'immobilité dans le test de nage forcée [476] ; (b) dans le cas de la dopamine, l'exposition au chaud induit une augmentation de libération [222] et l'inhibition  $D_1$  et  $D_2$  allonge la tolérance au chaud [69], suggérant un rôle délétère de cet excès de neurotransmission.

La seconde phase de dissociation entre  $T_{abd}$  et locomotion suggère un mécanisme différent, demandant un peu de temps pour apparaître. Il est caractérisé sur le plan comportemental par une inhibition de locomotion et une forte augmentation de la  $T_{abd}$ . Ces marques comportementales sont associées aux marques du déséquilibre métabolique (radicaux libres) et de l'inflammation (cytokines). Ce tableau suggère un état de maladie [109], pathologie usuellement observée dans le cadre de l'infection. Il est caractérisé par une fièvre, destinée à lutter contre l'infection par la stimulation des cellules immunitaires et par une immobilité, destinée à économiser l'énergie qui doit être entièrement vouée à la lutte contre l'infection. Malgré ce dernier effort adaptatif (hypoactivité) chez les animaux intolérants, la phase d'épuisement est déjà lancée et la dérive de la  $T_{abd}$  est inéluctable.

## ***3. Les animaux à risque du CC : des animaux déjà stressés ?***

En conclusion, une réaction initiale normale est peu probable compte-tenu des différences de  $T_{abd}$  et d'activité locomotrice entre tolérants et intolérants en début d'exposition. Les animaux les moins tolérants sont ceux qui présentent dès le départ une réaction de stress inadéquate. Une réaction initiale excessive sur le versant comportemental est incontestable, témoignant d'un état de stress précoce et mal géré. Ceci suggère que les animaux à risque se placent très précocement dans une situation de charge allostasique défavorable.

Cette conclusion est en accord avec les données de l'épidémiologie du CC chez l'homme qui constate que les sujets à risque sont (i) les sujets avec une charge allostasique préalable (défaut de sommeil, fatigue) [416], (ii) les sujets avec une immunodépression comme le suggèrent les infections pharyngées, (iii) les sujets présentant une surcharge pondérale ou un diabète [257].

Ces anomalies de comportement spontané trouvent un écho dans la perte de la plasticité comportementale, ou l'absence de perception de signaux de danger vitaux chez les animaux faisant un CCE. Les animaux pratiquant une course sur tapis roulant en ambiance chaude ( $T_a=34^\circ\text{C}$ , h.r.=40-50%) se répartissent en deux catégories : (i) ceux qui courent plus longtemps que les autres et font un CCE, et (ii) ceux qui s'arrêtent de courir et ne font pas de CCE [48]. Cette observation correspond au rôle de la motivation comme facteur de risque du CC. Pour autant, entre motivation professionnelle et stress secondaire à la pression qu'elle génère il y a une relation qui n'a jamais été étudiée.

## **D. Comment se structure un animal à risque ?**

### ***1. Introduction***

Existe-t-il une structuration neurobiologique spécifique pour un animal à risque ? En d'autres termes, un animal dont les mécanismes d'inhibition du stress sont insuffisants, présentant de ce fait une augmentation excessive de  $T_{abd}$  et un comportement locomoteur actif, présente-t-il une d'autres signes neurobiologiques permettant sa détection précoce. Il est en effet difficile d'extrapoler à l'homme la notion d'hyperactivité locomotrice et d'autres marqueurs de risque sont indispensables.

Faire l'hypothèse d'une structuration neurobiologique spécifique suppose que celle-ci s'articule autour d'une réaction de l'axe HPA insuffisante, en raison de l'existence de bon nombre de maladies associées à une hypogluco-corticoïdergie (II.D.2.c, page 59). En effet, les sujets à risque de développer une maladie psychiatrique sont ceux présentant un faible taux de glucocorticoïdes lors de stress physiques ou psychiques [187, 426, 431], ce qui suggère l'existence d'une analogie dans le stress chaud : les sujets à risque de CC sont ceux présentant un faible taux de glucocorticoïdes lors de l'exposition à la chaleur.

### ***2. Compensation par l'activation sympathique***

#### ***a. L'association fonctionnelle***

La validité d'une compensation de l'hyporéactivité de l'axe HPA par une augmentation de la réactivité catécholaminergique est suggérée par des données théoriques et pathologiques. Selye, dans son modèle du « Syndrome général d'adaptation » suggérait que l'activation sympathique terminale correspondrait à la réapparition des signes de la réaction d'alarme et caractériserait alors l'entrée dans la phase d'épuisement, associant alors hypoactivité de l'axe HPA et hyperactivité sympathique [435]. Cette association « hyperactivation sympathique » et « déficit d'activation de l'axe HPA » a été également isolée dans la pathologie psychiatrique. Les sujets victimes de PTSD présentent un déficit corticotrope [161] et hyperactivité catécholaminergique périphérique et centrale puisque l'augmentation de la noradrénaline est retrouvée dans le plasma [540, 542] et dans le LCR [161] et que la réactivité aux récepteurs adrénergique- $\alpha_2$  est augmentée [464]. La combinaison d'une situation d'hypogluco-corticoïdergie et de suractivation du système sympathique peut donc être considérée comme l'expression d'une surcharge allostasique [321].

### *b. Le cadre de la compensation catécholaminergique périphérique*

Dans nos expérimentations, le versant nerveux du stress a été abordé d'une manière indirecte. Les animaux intolérants pourraient présenter une activation sympathique exacerbée, suggérée par la forte lipolyse caractérisée par l'augmentation du glycérol [96, 393]. Cette lipolyse est induite par les catécholamines *in vitro* et *in vivo* via l'activation des récepteurs adrénergique- $\beta_1$  [96]. Cette hypothèse est concordante avec l'augmentation des catécholamines plasmatiques observée chez le rat anesthésié [163] et conscient [245] exposé à la chaleur, comme chez l'homme en CC [5]. Cette activation du système sympathique qui soutient la perfusion des organes vitaux en redistribuant les flux par l'exclusion de la circulation mésentérique, contribue également à l'émergence de la pathologie en entravant les mécanismes de thermolyse.

### *c. Le cadre de la compensation catécholaminergique centrale*

L'existence d'une activation catécholaminergique se retrouve également au niveau central. Elle survient dans un contexte d'activation cérébrale intense qui se fonde sur (i) l'augmentation du lactate plasmatique, dont l'origine pourrait être cérébrale [83], (ii) l'augmentation de l'expression des ARNm c-fos dont l'un des inducteurs est les catécholamines [301], (iii) l'activation comportementale [427].

L'activation catécholaminergique centrale n'est pas nécessairement délétère puisqu'elle contribue à ajuster le comportement à la contrainte environnementale. Ainsi, le traitement par la l-tyrosine, un précurseur des catécholamines, améliore les effets adverses de l'hyperthermie sur le comportement, suggérant un effet favorable sur la tolérance à la chaleur [275]. Le mécanisme par lequel l'activation catécholaminergique centrale joue son rôle est complexe. Les catécholamines peuvent participer au maintien de l'homéostasie énergétique centrale puisqu'elles stimulent la glycogénolyse astrocytaire, libérant du glucose de façon synchronique et favorisant une resynthèse glycogénique diachronique [301], et accélèrent la glycolyse [299]. Cependant, un emballement de ces mécanismes, facilitant l'évolution vers un métabolisme à prédominance anaérobie et une production accrue de lactate, peut être suspecté chez les intolérants à la chaleur. Ceci explique sans doute les augmentations de lactate, du *ratio* lactate/pyruvate, du glycérol observées dans le tissu cérébral lors du CC [83].

## **3. Compensation par la neurotransmission ?**

### *a. Cadre théorique*

D'une façon plus générale, l'activation catécholaminergique centrale se place dans un environnement d'hyperactivité cérébrale. En effet, la neurotransmission est activée lors d'une exposition à la chaleur [69, 92, 179, 222, 279, 280, 289, 446] et une activation exacerbée peut être mise en cause chez les animaux intolérants. L'induction intense des ARNm des IEGs plaide en faveur de cette hypothèse puisque les neurotransmetteurs en sont de potentiels inducteurs [205, 243, 519] (page 86). Cette hyperactivité fonctionnelle pourrait être la marque d'une insuffisance du contrôle par les glucocorticoïdes. Bien que ce

mécanisme n'ait pas été étudié dans nos expérimentations, des hypothèses peuvent être avancées avec une implication éventuelle des glucocorticoïdes.

### *b. La neurotransmission dopaminergique*

L'exposition à la chaleur s'accompagne d'une augmentation de la neurotransmission dopaminergique modérée en phase d'hyperthermie, mais forte au cours du CC [67, 222]. La forte activation dopaminergique réduit probablement la tolérance à la chaleur [69].

Les glucocorticoïdes favorisent la neurotransmission dopaminergique par (i) augmentation de synthèse par l'activation de la tyrosine hydroxylase [406] (ii) libération de dopamine par l'intermédiaire des GR [310], (iii) réduction de leur catabolisme par diminution de l'activité de la monoamine-oxydase [406], (iv) augmentation de la stase synaptique par réduction de recapture [406], (v) amélioration de l'expression des récepteurs D<sub>1</sub> [104].

### *c. La neurotransmission sérotoninergique*

L'exposition à la chaleur est associée à une activation de la transmission sérotoninergique [446] dont la résultante est une amélioration de la tolérance puisque la déplétion par la pCPA de la 5-HT cérébrale réduit la tolérance à la chaleur, alors qu'une supplémentation en 5-hydroxytryptophane tend à l'augmenter (pour revue, [67]). Pour autant, la destruction des terminaisons sérotoninergiques par la 5,7 DHT est associée à une neuroprotection [223], suggérant un effet délétère d'un excès de sérotonine. Il faut toutefois rester prudent sur les conclusions de ces études car la neuroprotection pourrait plutôt être apportée par des modifications du métabolisme du glutamate ou par une destruction de certains médiateurs comme le NO [67].

Les glucocorticoïdes sécrétés lors du stress interagissent avec la transmission sérotoninergique de manière complexe. La corticostérone entraîne une désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT<sub>1A</sub>, conduisant à une réduction du rétrocontrôle inhibiteur [136, 250, 254], et une augmentation du turnover de la sérotonine (pour revue, [88]).

### *d. La neurotransmission glutamatergique*

De la même manière que précédemment, les concentrations extracellulaires de glutamate sont stables ou modérément augmentées en phase d'hyperthermie [83], elles culminent en phase de CC [83, 357, 535]. Elles agissent sur un système de transduction du signal dont l'activité doit être encadré. Bien qu'une suractivation de la transmission glutamatergique soit à l'origine de l'excito-toxicité, l'activation du récepteur NMDA est indispensable au bon fonctionnement de la thermorégulation. Ainsi: (i) l'hyperactivation du récepteur NMDA conduit à l'excito-toxicité [414], (ii) l'inhibition du récepteur NMDA conduit à un déficit fonctionnel comme une intolérance à la chaleur [72], (iii) le préconditionnement s'accompagne outre d'une augmentation de l'expression des Hsp70 d'une augmentation de l'expression des sous-unités NR1 ou NR2A du récepteur NMDA [80].

Les glucocorticoïdes sécrétés durant le stress interviennent sur la neurotransmission glutamatergique puisque (i) la libération de glutamate suite à un stress est atténuée par l'adrénalectomie, un effet bloqué par la supplémentation en glucocorticoïdes [338], (ii) la corticostérone augmente le temps de présence du glutamate dans la synapse lors d'un stress psychogène [338]. Les glucocorticoïdes semblent donc jouer un rôle potentialisateur du signal glutamatergique.

## E. Synthèse des mécanismes impliqués dans la vulnérabilité à la chaleur

Les mécanismes engendrés par une exposition à la chaleur s'inscrivent dans le cadre général du stress. Un individu intolérant à la chaleur développe une réponse inadéquate dès qu'il est soumis à la contrainte. Cette réponse inappropriée se caractérise par (i) une insuffisance d'activation des mécanismes inhibiteurs (sécrétion de glucocorticoïdes) en regard de l'intensité des mécanismes délétères déclenchés par l'agresseur, et donc de la charge allostasique qu'ils génèrent (ii) une réaction d'alarme exacerbée (hyperactivation sympathique et comportementale), favorisant l'apparition des facteurs délétères et augmentant donc encore la charge allostasique.

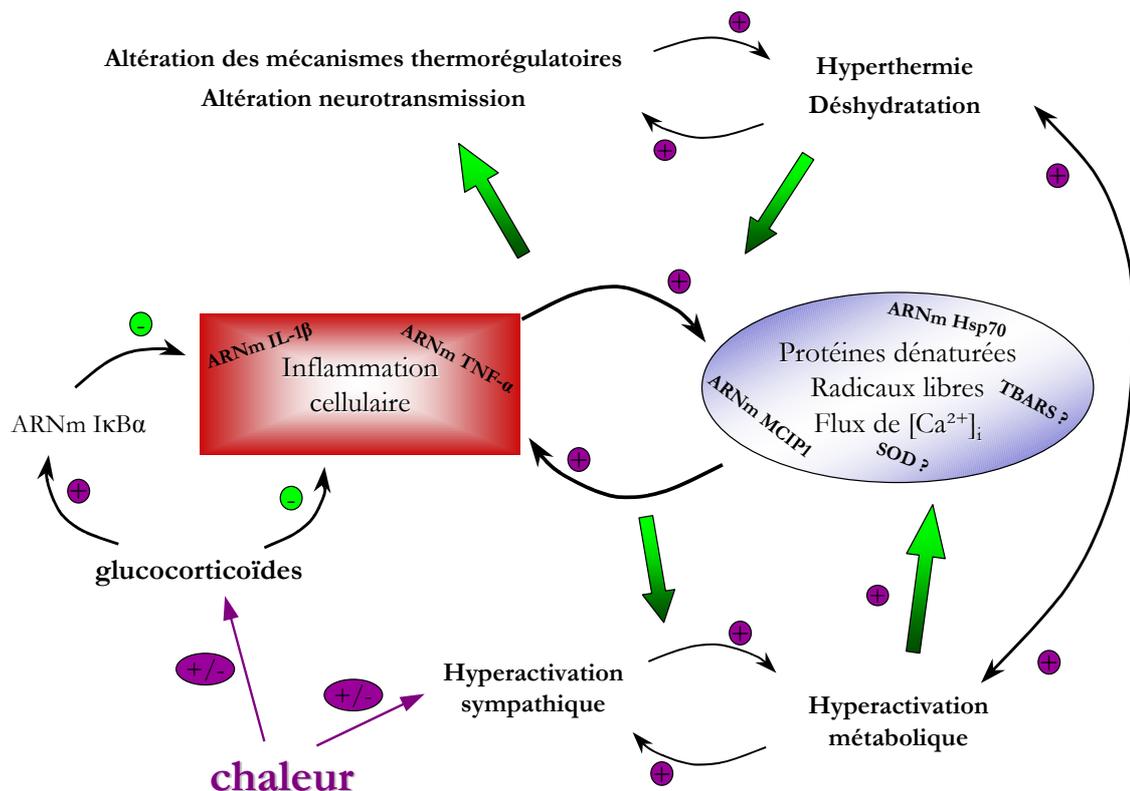


Figure 25 : Schéma de synthèse des mécanismes potentiels impliqués dans la vulnérabilité à la chaleur.

## V. Perspectives

Les perspectives de cette thèse ont pour objectif de mieux approfondir les mécanismes de vulnérabilité à la chaleur, le but ultime étant une détection précoce des sujets à risque et le développement d'une éventuelle thérapeutique initiale.

Une des caractéristiques fondamentales des animaux intolérants à la chaleur est l'association d'une moindre concentration plasmatique de glucocorticoïdes avec l'apparition de signes pathologiques. Ce niveau de glucocorticoïdes est pourtant plus élevé que le niveau basal, suggérant qu'un stress a lieu. L'émergence de la pathologie révèle une inadéquation entre le niveau de glucocorticoïdes sécrété et la demande fonctionnelle. La question est donc : pourquoi n'y a-t-il pas assez de glucocorticoïdes pour bloquer la pathologie ? Quoique le stress ait été perçu chez tous les animaux (e.g., augmentation des ARNm *c-fos*, hyperactivité locomotrice), seuls les animaux intolérants présentent un accroissement secondaire de leur activité locomotrice et une forte induction des ARNm *c-fos*. Ceci suggère le maintien d'un phénomène activateur ou un défaut d'inhibition. Dans le stress, le mécanisme d'inhibition prépondérant est apporté par les glucocorticoïdes. Quoique nous n'ayons pas mis en évidence de dysfonction dans l'induction des ARNm au niveau de l'axe HPA, il existe un contraste entre l'excès de l'hyperactivation cellulaire et la relative faible augmentation des ARNm CRF et POMC. Ce contraste peut s'expliquer par un défaut de production de protéines. Une telle hypothèse peut être examinée par une exposition plus longue ( $T_a=35^\circ\text{C}$  durant 24h) permettant l'installation d'une divergence entre charge allostasique et déficit de synthèse en protéines CRF et POMC. Indépendamment du niveau de production des glucocorticoïdes, le défaut d'inhibition peut être lié à une insuffisance d'hormone au niveau cellulaire. Ceci suppose d'aller voir chez les animaux ainsi exposés le polymorphisme d'expression des gènes de signalisation des glucocorticoïdes (récepteurs MR et surtout GR).

Une deuxième caractéristique essentielle observée chez les animaux intolérants est l'association de cette moindre production de glucocorticoïdes avec une absence d'activation de l'expression des ARNm  $I\kappa B\alpha$ . Cette protéine est manifestement l'une des clés de la tolérance à la chaleur. Il est donc indispensable de vérifier s'il existe une relation à la chaleur entre les glucocorticoïdes et l'induction d' $I\kappa B\alpha$  et s'il existe une relation entre l'absence d'activation d' $I\kappa B\alpha$  et l'apparition des signes pathologiques. Si tel était le cas, la cible mécaniciste du risque de CC résiderait dans le pivot  $I\kappa B\alpha$  entre stress et inflammation.

Pour finir, il est essentiel de faire passer dans la réalité médicale ces travaux précliniques en validant l'efficacité d'un traitement précoce par glucocorticoïdes dans le CC. Une supplémentation en glucocorticoïdes peut s'avérer protectrice, compte tenu du fort potentiel des glucocorticoïdes endogènes dans la réduction de l'activation des processus inflammatoires locaux au cours du développement physiopathologique du CC. Cependant, la difficulté est dans le choix du protocole : l'utilisation d'un glucocorticoïde naturel à des doses de stress est indispensable pour mimer fidèlement l'action des glucocorticoïdes sur les tissus par l'intermédiaire de leurs récepteurs GR.



## **Références bibliographiques**



- [1] Heat stress: physical exertion and environment. In: J.R.S. Hales, D.A.B. Richards (Eds.), Proceeding of the 1st world Conference on heat stress: physical exertion and environment, Excerpta Medica, Amsterdam, 1987, Sydney, Australia 27 april-1 may 1987, 1987.
- [2] G.C. Abrahamsen, K.D. Carr, Effects of corticosteroid synthesis inhibitors on the sensitization of reward by food restriction, *Brain Res.* 726 (1996) 39-48.
- [3] I.M. Adcock, G. Caramori, K. Ito, New insights into the molecular mechanisms of corticosteroids actions, *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 649-660.
- [4] Z. Akcetin, R. Pregla, D. Darmer, H. Heynemann, J. Haerting, H.-J. Brömme, J. Holtz, Differential expression of heat shock proteins 70-1 and 70-2 mRNA after ischemia-reperfusion injury of rat kidney, *Urol. Res.* 27 (1999) 306-311.
- [5] M.S. Al-Hadramy, F. Ali, Catecholamines in heat stroke, *Mil. Med.* 154 (1989) 263-264.
- [6] S.M. Allan, N.J. Rothwell, Cytokines and acute neurodegeneration, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 734-744.
- [7] P. Angel, K. Hattori, T. Smeal, M. Karin, The *jun* proto-oncogene is positively autoregulated by its product, *Jun/AP-1*, *Cell* 55 (1988) 875-885.
- [8] A. Armario, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors?, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5 (2006) 485-501.
- [9] E. Arvat, B. Maccagno, J. Ramunni, L. Di Vito, R. Giordano, L. Gianotti, F. Broglio, F. Camanni, E. Ghigo, The inhibitory effect of alprazolam, a benzodiazepine, overrides the stimulatory effect of metyrapone-induced lack of negative cortisol feedback on corticotroph secretion in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 2611-2615.
- [10] B. Arvin, L.F. Neville, F.C. Barone, G.Z. Feuerstein, The role of inflammation and cytokines in brain injury, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20 (1996) 445-452.
- [11] A. Asea, M. Rehli, E. Kabingu, J.A. Boch, O. Baré, P.E. Auron, M.A. Stevenson, S.K. Calderwood, Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 15028-15034.
- [12] E. Assia, Y. Epstein, A. Magazanik, E. Sohar, Plasma-cortisol levels in experimental heatstroke in dogs, *Int. J. Biometeor.* 33 (1989) 85-88.
- [13] M.G. Austin, J.W. Berry, Observations on one hundred cases of heatstroke, *J. A. M. A.* 161 (1956) 1525-1529.
- [14] J. Auwerx, B. Staels, P. Sassone-Corsi, Coupled and uncoupled induction of *fos* and *jun* transcription by different second messengers in cells of hematopoietic origin, *Nucleic Acids Res.* 18 (1989) 221-228.
- [15] S.P. Avis, W.E. Pryse-Phillips, Sudden death in multiple sclerosis associated with sun exposure: a report of two cases, *Can. J. Neurol. Sci.* 22 (1995) 305-307.
- [16] B.N. Axelrod, J.L. Woodard, Neuropsychological sequelae of heatstroke, *Int. J. Neurosci.* 70 (1993) 223-232.
- [17] M. Baez, M. Volosin, Corticosterone influences forced swim-induced immobility, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49 (1994) 729-736.
- [18] N. Bakshi, R.A. Maselli, Absence of F waves in heat stroke, *Muscle Nerve* (1998) 263-264.
- [19] C.M. Bamberger, H.M. Schulte, G.P. Chrousos, Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids, *Endocrine Rev.* 17 (1996) 245-261.
- [20] P.J. Barnes, Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms, *Clin. Sci.* 94 (1998) 557-572.
- [21] P.J. Barnes, Corticosteroid effects on cell signalling, *Eur. Respir. J.* 27 (2006) 413-426.
- [22] C.S. Barr, L.A. Dokas, Glucocorticoids regulate the synthesis of HSP27 in rat brain slices, *Brain Res.* 847 (1999) 9-17.
- [23] S. Basu, R.J. Binder, R. Suto, K.M. Anderson, P.K. Srivastava, Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway, *Int. Immunol.* 12 (2000) 1539-1546.

- [24] H.M. Beere, D.R. Green, Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis, *Trends Cell Biol.* 11 (2001).
- [25] H.M. Beere, B.B. Wolf, K. Cain, D.D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R.I. Morimoto, G.M. Cohen, D.R. Green, Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 469-475.
- [26] K. Bellmann, A. Wenz, J. Radons, V. Burkart, R. Kleemann, H. Kolb, Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2840-2845.
- [27] D. Bendahan, G. Kozak-Ribbens, S. Confort-Gouny, A non-invasive investigation of muscle energetics supports similarities between exertional heat stroke and malignant hyperthermia, *Anesth. Analg.* 93 (2001) 683-689.
- [28] E.N. Benveniste, B.S. Huneycutt, P. Shrikant, M.E. Ballestas, Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system, *Brain Behav. Immun.* 9 (1995) 304-314.
- [29] M.W. Bergmann, K.J. Staples, S.J. Smith, P.J. Barnes, R. Newton, Glucocorticoids inhibition of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor from T cells is independent of control by nuclear factor- $\kappa$ B and conserved lymphokine element o, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004) 555-563.
- [30] R.V. Bhat, A.J. Cole, J.M. Baraban, Role of monoamine systems in activation of *c-fos* by cocaine, *J. Psychiatr. Neurosci.* 17 (1992) 94-102.
- [31] N. Biary, M.M. Madkour, H. Sharif, Post-heatstroke parkinsonism and cerebellar dysfunction, *Clin. Neurol. Neurosurg.* (1995) 55-57.
- [32] M.J. Blake, D. Gershon, J. Fagnoli, N.J. Holbrook, Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 15275-15279.
- [33] M.J. Blake, R. Udelsman, G.J. Feulner, D.D. Norton, N.J. Holbrook, Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 9873-9877.
- [34] R.-M. Bluthé, V. Walter, P. Parnet, S. Layé, J. Lestage, D. Verrier, S. Poole, B.E. Stenning, K.W. Kelley, R. Dantzer, Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism, *C. R. Acad. Sci. III, Sci. vie* 317 (1994) 499-503.
- [35] J.-R. Boissier, P. Simon, M. Zaczinskaa, J. Fichelle, Etude psychopharmacologique expérimentale d'une nouvelle substance psychotrope, la 2-éthylamino-5-chloro-4-méthyl-4-phényl-4 H-3,1-benzoxazine, *Thérapie* 27 (1972) 325-338.
- [36] A.N. Boone, M.M. Vijayan, Glucocorticoid-mediated attenuation of the hsp70 response in trout hepatocytes involves the proteasome, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 283 (2002) R680-R687.
- [37] A. Bouchama, Heatstroke: a new look at an ancient disease, *Intensive Care Med.* 21 (1995) 623-625.
- [38] A. Bouchama, F. Al Mohanna, R. El-Sayed, A. Eldali, E. Saussereau, S. Chollet-Martin, V. Ollivier, D. de Prost, G. Roberts, Experimental heatstroke in baboon: analysis of the systemic inflammatory response, *Shock* 24 (2005) 332-335.
- [39] A. Bouchama, S. Al-Sedairy, S. Siddiqui, E. Shail, M. Rezeig, Elevated pyrogenic cytokines in heatstroke, *Chest* 104 (1993) 1498-1502.
- [40] A. Bouchama, E.B. De Vol, Acide-base alterations in heatstroke, *Intensive Care Med.* 27 (2001) 680-685.
- [41] A. Bouchama, J.P. Knochel, Heat stroke, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1978-1988.
- [42] A. Bouchama, A. Kwaasi, M. Dehbi, F. Al Mohanna, A. Eldali, R. El-Sayed, A. Tbakhi, A.S. Alzahrani, G. Roberts, Glucocorticoids do not protect against the lethal effects of experimental heatstroke in baboons, *Shock* 27 (2007) 578-583.
- [43] A. Bouchama, R.S. Parhar, A. El-Yazigi, S. Kirkitant, S. Al-Sedairy, Endotoxemia and release of tumor necrosis factor and interleukin 1 $\alpha$  in acute heatstroke, *J. Appl. Physiol.* 70 (1991) 2640-2644.
- [44] A. Bouchama, G. Roberts, F. Al Mohanna, R. El-Sayed, B. Lach, S. Chollet-Martin, V. Ollivier, R. Al Baradei, A. Loualich, S. Nakeeb, A. Eldali, D. de Prost, Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke, *J. Appl. Physiol.* 98 (2005) 697-705.

- [45] L. Bourdon, F. Canini, On the nature of the link between malignant hyperthermia and exertional heatstroke, *Med. Hypotheses* 45 (1995) 268-270.
- [46] L. Bourdon, F. Canini, M. Aubert, B. Melin, F. Flocard, N. Koulman, R. Petrognani, C. Brosset, A.-X. Bigard, Le coup de chaleur d'exercice revisité, *Med. Armees* 30 (2002) 431-438.
- [47] L. Bourdon, F. Canini, M. Aubert, B. Melin, N. Koulmann, J.M. Saissy, A.-X. Bigard, Le coup de chaleur d'exercice : I-Aspects cliniques et prévention, *Sci. Sports* 18 (2003) 228-240.
- [48] L. Bourdon, P. D' Aléo, H. Perrault, N. Pouzeratte, M. Curé, Exercise heat stress in rats: performance and biochemical effects, *J. Wilderness Med.* 5 (1994) 153-162.
- [49] A.G. Bowie, I.R. Haga, The role of Toll-like receptors in the host response to viruses, *Mol. Immunol.* 42 (2005) 859-867.
- [50] M.P. Boyle, J.A. Brewer, M. Funatsu, D.F. Wozniak, J.Z. Tsien, Y. Izumi, L.J. Muglia, Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 473-478.
- [51] C.W. Breuner, S.E. Lynn, G.E. Julian, J.M. Cornelius, B.J. Heidinger, O.P. Love, R.S. Sprague, H. Wada, B.A. Whitman, Plasma-binding globulins and acute stress response, *Horm. Metab. Res.* 38 (2006) 260-268.
- [52] C.W. Breuner, M. Orchinik, Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates, *J. Endocrinol.* 175 (2002) 99-112.
- [53] E. Briese, Normal body temperature of rats: the setpoint controversy, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22 (1998) 427-436.
- [54] E. Briese, M.G. De Quijada, Colonic temperature of rats during handling, *Act. Physiol. Lat. Amer.* 20 (1970) 97-102.
- [55] H. Brinell, M. Cabanac, J.R.S. Hales, Critical upper levels of body temperature, tissue thermosensitivity and selective brain cooling in hyperthermia, In: J.R.S. Hales, D.A.B. Richards (Eds.), *Heat Stress. Physical Exertion and Environnement*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1987.
- [56] J.C. Buckingham, Glucocorticoids, role in stress, In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of stress*, Vol. 2, Academic press, 2000, pp. 261-269.
- [57] J.J. Buffat, Coups de chaleur d'exercice, In: E. Techniques (Ed.), *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, Vol. 24-116-A-30, Paris, 1994, pp. 1-5.
- [58] M. Buttini, K. Appel, A. Sauter, P.-J. Gebicke-Haerter, H.W.G.M. Boddeke, Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rat, *Neuroscience* 71 (1996) 1-16.
- [59] M. Buttini, A. Sauter, H.W.G.M. Boddeke, Induction of interleukin-1 $\beta$  mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat, *Mol. Brain Res.* 23 (1994) 126-134.
- [60] G. Bynum, J. Patton, W. Bowers, I. Leav, D. Wolfe, M. Hamlet, M. Marsili, An anesthetized dog heatstroke model, *J. Appl. Physiol.* 43 (1977) 292-296.
- [61] G.D. Bynum, K.B. Pandolf, W.H. Schuette, R.F. Goldman, D.E. Lees, J. Whang-Peng, E.R. Atkinson, J.M. Bull, Induced hyperthermia in sedated humans and the concept of critical thermal maximum, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 235 (1978) R228-R236.
- [62] A. Cabanac, E. Briese, Handling elevates the colonic temperature of mice, *Physiol. Behav.* 51 (1992) 95-98.
- [63] C.M. Cahill, W.R. Wayne, Y. Xie, P.E. Auron, S.K. Calderwood, Transcriptional repression of the prointerleukin 1 $\beta$  gene by heat shock factor 1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24874-24879.
- [64] N. Calvo, I.D. Martijena, V.A. Molina, M. Volosin, Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress, *Brain Res.* 800 (1998) 227-235.
- [65] N. Calvo, M. Volosin, Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint, *Horm. Behav.* 73 (2001) 261-271.
- [66] J. Campisi, T.H. Leem, B.N. Greenwood, M.K. Hansen, A. Moraska, K. Higgins, T.P. Smith, M. Fleshner, Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 284 (2002) 520-530.
- [67] F. Canini, Mécanismes centraux du coup de chaleur. *Neuroscience*, Claude Bernard, Lyon, 1998, p. 259.

- [68] F. Canini, L. Bourdon, Brain excitotoxic networks in heatstroke, In: J. Moravec, N. Takeda, P.K. Singal (Eds.), *Adaptation biology and Medicine*, Vol. 3, Narosa Publishing House, New Delhi, 2002, pp. 239-246.
- [69] F. Canini, L. Bourdon, Dopamine involvement in thermoregulatory responses to heat in rats, *Neurosci. Lett.* 241 (1998) 91-94.
- [70] F. Canini, L. Bourdon, Quelle place pour le système nerveux central dans le coup de chaleur?, *Med. Armees* 34 (2006) 57-62.
- [71] F. Canini, L. Bourdon, R. Cespuglio, A. Buguet, Voltametric assessment of brain nitric oxide during heatstroke in rats, *Neurosci. Lett.* 231 (1997) 67-70.
- [72] F. Canini, N. Simler, L. Bourdon, MK801 impairs thermoregulation in the heat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (2002) 226-232.
- [73] W.B. Cannon, Organization for physiological homeostasis, *Physiol. Rev.* 9 (1929) 399-431.
- [74] M. Caputa, K. Dokladny, B. Kurowicka, Behavioral approach to the study of the upper limit of temperature tolerance in rats, *Physiol. Behav.* 65 (1998) 183-189.
- [75] A. Cardenas, M.A. Moro, J.C. Leza, E. O'Shea, A. Davalos, J. Castillo, P. Lorenzo, I. Lizasoain, Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 1297-1302.
- [76] C. Carlsson, M. Hägerdal, B.K. Siesjö, The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex, *J. Neurochem.* 26 (1976) 1001-1006.
- [77] M.D. Carmichael, J.M. Davis, E.A. Murphy, A.S. Brown, J.A. Carson, E.P. Mayer, A. Ghaffar, Role of brain IL-1 $\beta$  on fatigue after exercise-induced muscle damage, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 291 (2006) R1344-R1348.
- [78] J.R. Caso, I. Lizasoain, P. Lorenzo, M.A. Moro, J.C. Leza, The role of tumor necrosis factor-alpha in stress-induced worsening of cerebral ischemia in rats, *Neuroscience* 142 (2006) 59-69.
- [79] C. Cearley, L. Churchill, J.M. Krueger, Time of day differences in IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  mRNA levels in specific regions of the rat brain, *Neurosci. Lett.* 352 (2003) 61-63.
- [80] S.H.H. Chan, K. Chang, C. Ou, J.Y.H. Chan, Up-regulation of glutamate receptors in nucleus tractus solitarii underlies potentiation of baroreceptor reflex by heat shock protein 70, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1097-1104.
- [81] S.H.H. Chan, L.-L. Wang, K.-F. Chang, C.-C. Ou, J.Y.H. Chan, Altered temporal profile of heat shock factor 1 phosphorylation and heat shock protein 70 expression induced by heat shock in nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats, *Circulation* 107 (2003) 339-345.
- [82] S.H.H. Chan, L.-L. Wang, C.-C. Ou, J.Y.H. Chan, Contribution of peroxynitrite to fatal cardiovascular depression induced by overproduction of nitric oxide in rostral ventrolateral medulla of the rat, *Neuropharmacology* 43 (2002) 889-898.
- [83] C.-K. Chang, W.-T. Chiu, C.-P. Chang, M.-T. Lin, Effect of hypervolaemic haemodilution on cerebral glutamate, glycerol, lactate and free radicals in heatstroke rats, *Clin. Sci.* 106 (2004) 501-509.
- [84] C.P. Chang, Y.C. Hsu, M.T. Lin, Magnolol protects against cerebral ischaemic injury of rat heatstroke, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (2003) 387-392.
- [85] D.M. Chang, The role of cytokines in heat stroke, *Immunol. Invest.* 22 (1993) 553-561.
- [86] L.-S. Chang, Y.-H. Huang, M.-T. Lin, Local cerebral glucose utilization decreases after heatstroke onset in rats, *Neurosci. Lett.* 308 (2001) 206-208.
- [87] T.C. Chao, R. Sinniah, J.E. Pakiam, Acute heat stroke deaths, *Pathology* 13 (1981) 145-156.
- [88] F. Chaouloff, Serotonin, stress and corticoids, *J. Psychopharmacol.* 14 (2000) 139-151.
- [89] S.-H. Chen, K.-C. Niu, M.-T. Lin, Cerebrovascular dysfunction is an attractive target for therapy in heat stroke, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (2006) 663-672.
- [90] Y.-Z. Chen, J. Qiu, Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2 (1999) 145-149.

- [91] B.-C. Cheng, C.-P. Chang, M.-T. Lin, C.-C. Lee, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase causes attenuation of cerebrovascular dysfunction in experimental heatstroke, *Neuropharmacology* (2006) 1-9.
- [92] W.-T. Chiu, T.-Y. Kao, M.-T. Lin, Interleukin-1 receptor antagonist increases survival in rat heatstroke by reducing hypothalamic serotonin release, *Neurosci. Lett.* 202 (1995) 33-36.
- [93] H. Christensen, G. Boysen, H.H. Johannesen, Serum-cortisol reflects severity and mortality in acute stroke, *J. Neurol. Sci.* 217 (2003) 175-180.
- [94] T.J. Cole, K. Myles, J.F. Purton, P.S. Brereton, N.M. Solomon, D.I. Godfrey, J.W. Funder, GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant, *Mol. Cell. Endocrinol.* 28 (2001) 193-202.
- [95] B. Conte-Delvox, V. Guillaume, F. Boudouresque, N. Graziani, E. Magnan, M. Grino, N. Empeaire, K. Nahoul, M. Cataldi, C. Olivier, Effects of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams, *Acta Endocrinol.* 127 (1992) 534-440.
- [96] S.W. Coppack, M.D. Jensen, J.M. Miles, In vivo regulation of lipolysis in humans, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 177-193.
- [97] D.R. Crawford, K.P. Leahy, N. Abramova, L. Lan, Y. Wang, K.J.A. Davies, Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* 342 (1997) 6-12.
- [98] W.E. Cullinan, J.P. Herman, D.F. Battaglia, H. Akil, S.J. Watson, Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress, *Neuroscience* 64 (1995) 477-505.
- [99] M. Curé, Plasma corticosterone response in continuous versus discontinuous chronic heat exposure in rat., *Physiol. Behav.* 45 (1989) 1117-1122.
- [100] R.W. Currie, R.M. Tanguay, J.G. Kingma, Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts, *Circulation* 87 (1993) 963-971.
- [101] A. Cvoro, J. Dundjerski, D. Trajkovic, G. Matic, The level and phosphorylation of HSP70 in the rat liver cytosol after adrenalectomy and hyperthermia, *Cell Biol. Int.* 23 (1999) 313-320.
- [102] A. Cvoro, A. Korac, G. Matic, Immunocytochemical study of the glucocorticoid receptor in rat liver nuclei after hyperthermic stress, *Cell Biol. Int.* 27 (2003) 403-407.
- [103] A.M. Czarnecka, C. Campanella, G. Zummo, F. Capello, Heat shock protein 10 and signal transduction: a "capsula eburnea" of carcinogenesis?, *Cell Stress Chaperones* 11 (2006) 287-294.
- [104] A. Czyrak, K. Wedzony, B. Michalska, K. Fijał, M. Dziedzicka-Wasylewska, M. Mackowiak, The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone decreases dopamine D1 receptors in the rat brain, *Neuroscience* 79 (1997) 489-495.
- [105] F. D'Acquisto, M.J. May, S. Ghosh, Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies, *Mol. Interv.* 2 (2002) 22-35.
- [106] S. Dagogo-Jack, G. Tykodi, I. Unmamaheswaran, Inhibition of cortisol biosynthesis decreases circulating leptin levels in obese humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 5333-5335.
- [107] S. Dal-Zotto, O. Marti, A. Armario, Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Psychoneuroendocrinology* 28 (2003) 992-1009.
- [108] Z.A. Damanhour, O.S. Tayeb, Animal models of heat stroke studies, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 28 (1992) 119-127.
- [109] R. Dantzer, Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity, *Eur. J. Pharmacol.* 500 (2004) 399-411.
- [110] C.A. Davies, S.A. Loddick, S. Toulmond, R.P. Stroemer, J. Hunt, N.J. Rothwell, The progression and topographic distribution of interleukin-1 $\beta$  expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19 (1999) 87-98.
- [111] M.G. Davies, P.O. Hagen, Systemic inflammatory response syndrome, *Br. J. Surg.* 85 (1997) 920-935.

- [112] S.F. De Boer, S.J. Koopmans, J.L. Slangen, J. van der Gugten, Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length, *Physiol. Behav.* 47 (1990) 1117-1124.
- [113] K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, G. Haegeman, The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression, *Endocrine Rev.* 24 (2003) 488-522.
- [114] E.R. De Kloet, Brain Corticosteroid receptor balance and homeostatic control, *Front. Neuroendocrinol.* 12 (1991) 95-164.
- [115] S. Delhalle, R. Blasius, M. Dicato, M. Diederich, A beginner's guide to NF- $\kappa$ B signaling pathways, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030 (2004) 1-13.
- [116] J.E. Dematte, K. O'Mara, J. Buescher, C.G. Whitney, S. Forsythe, T. McNamee, R.B. Adiga, I.M. Ndukwu, Near-fatal heat stroke during the 1995 heat wave in Chicago, *Ann. Intern. Med.* 129 (1998) 173-181.
- [117] S.L. DeMeester, T.G. Buchman, Y. Qiu, A.K. Jacob, K. Dunnigan, R.S. Hotchkiss, I. arl, J.P. Cobb, Heat shock induces I $\kappa$ B- $\alpha$  and prevents stress-induced endothelial cell apoptosis, *Arch. Surg.* 132 (1997) 1283-1288.
- [118] C.C. Deocaris, S.C. Kaul, R. Wadhwa, On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60, *Cell Stress Chaperones* 11 (2006) 116-128.
- [119] R.H. DeRijk, M. Schaaf, E.R. de Kloet, Glucocorticoid receptor variants: clinical implications, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81 (2002) 103-122.
- [120] S. Di, R. Malcher-Lopes, K.C. Halmos, J.G. Tasker, Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism, *J. Neurosci.* 23 (2003) 4850-4857.
- [121] R. Dingleline, K. Borges, D. Bowie, S.F. Traynelis, The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 7-61.
- [122] B.D. Dinman, S.M. Horvath, Heat disorders in industry, *J. Occup. Med.* 26 (1984) 489-495.
- [123] D. Diorio, V. Viau, M.J. Meaney, The role of the prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress, *J. Neurosci.* 13 (1993) 3839-3847.
- [124] J. Djordjevic, G. Cvijic, V. Davidovic, Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats, *Physiol. Res.* 52 (2003) 67-72.
- [125] I.A.S. Drummond, S.A. McClure, M. Poenie, R.Y. Tsien, R.A. Steinhardt, Large changes in intracellular pH and calcium observed during heat shock are not responsible for the induction of heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 1767-1775.
- [126] R.W. Duan, M. Ito, Y. Park, E.T. Maizels, M. Hunzicker-Dunn, L.J. Jameson, GnRH regulates early growth response protein transcription through multiple promoter elements, *Mol. Endocrinol.* 16 (2002) 221-233.
- [127] D.A. DuBose, J. Balcius, D. Morehouse, Heat stress and/or endotoxin effects on cytokine expression by human whole blood, *Shock* 17 (2002) 217-221.
- [128] D. Duma, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski, Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-transcriptional modification, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102 (2006) 11-21.
- [129] K.E. Dunsmore, A.G. Denenberg, K. Page, H.R. Wong, Mechanism and function of heat shock-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  expression, *Inflamm. Res.* 55 (2006) 254-259.
- [130] D.P. Easton, Y. Kaneko, J.R. Subjeck, The Hsp110 and Grp 170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s, *Cell Stress Chaperones* 5 (2000) 276-290.
- [131] D. Elez, S. Vidovic, G. Matic, The influence of hyperthermic stress on the redox state of glucocorticoid receptor, *Stress* (2000) 247-255.
- [132] Y. Endo, K. Shiraki, Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure, *Physiol. Behav.* 71 (2000) 263-268.
- [133] M. Engelmann, R. Landgraf, C.T. Wotjak, The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited, *Front. Neuroendocrinol.* 25 (2004) 132-149.

- [134] G. Ermak, T.E. Morgan, K.J.A. Davies, Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38787-38794.
- [135] D.J. Erskrine, V.H. Hutchison, Critical thermal maxima in small mammals, *J. Mammal.* 63 (1982) 267-273.
- [136] A. Evrard, N. Barden, M. Hamon, J. Adrien, Glucocorticoid receptor-dependent desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors by sleep deprivation: studies in GR- $\alpha$  transgenic mice, *Sleep* 29 (2006) 31-36.
- [137] E. Falkenstein, A.W. Norman, M. Wehling, Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 2072-2075.
- [138] J.D. Faunt, T.J. Wilkinson, P. Alpin, P. Henschke, M. Webb, R.K. Penhall, The effete in the heat: heat-related hospital presentations during a ten day heat wave, *Aust. N. Z. J. Med.* 25 (1995) 117-121.
- [139] M.E. Feder, G.E. Hofmann, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Ann. Rev. Physiol.* 61 (1999) 243-282.
- [140] E. Fehrenbach, A.M. Niess, K. Voelker, H. Northoff, F.C. Mooren, Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72, *Int. J. Sports Med.* 26 (2005) 552-557.
- [141] G.Z. Feuerstein, X. Wang, F.C. Barone, The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma, *Neuroimmunomodulation* 5 (1998) 143-159.
- [142] P.D. Fish, G.C.J. Bennett, P.H. Millard, Heatwave morbidity and mortality in old age, *Age Ageing* 14 (1985) 243-245.
- [143] S.W. Flanagan, A.J. Ryan, C.V. Gisolfi, P.L. Moseley, Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) R28-R32.
- [144] M. Fleshner, J. Campisi, L. Amiri, D.M. Diamond, Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones, *Psychoneuroendocrinology* 29 (2004) 1142-1152.
- [145] M. Fleshner, T. Deak, R.L. Spencer, M.L. Laudenslager, L.R. Watkins, S.F. Maier, A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure, *Endocrinology* 136 (1995) 5336-5342.
- [146] M. Fleshner, L.E. Goehler, B.A. Schwartz, M. McGorry, D. Martin, S.F. Maier, L.R. Watkins, Thermogenic and corticosterone response to intravenous cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy, *J. Neuroimmunol.* 86 (1998) 134-141.
- [147] M. Fleshner, L.R. Watkins, L.L. Lockwood, R.E. Grahn, G. Gerhardt, M.J. Meaney, M.L. Laudenslager, S.F. Maier, Blockade of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress by intraventricular injection of dexamethasone: a method for studying the stress-induced peripheral effects of glucocorticoids, *Psychoneuroendocrinology* 18 (1993) 251-263.
- [148] J.A. Foster, I.R. Brown, Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia, *Mol. Brain Res.* 45 (1997) 207-218.
- [149] W. Freeman, E. Dumoff, Cerebellar syndrome following heat stroke, *Arch. Neurol. Psychiatry* 51 (1944) 67-72.
- [150] U. Freo, H.W. Holloway, K. Kalogeras, S.I. Rapoport, T.T. Soncrant, Adrenalectomy or metyrapone-pretreatment abolishes cerebral metabolic responses to the serotonin agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) in the hippocampus, *Brain Res.* 586 (1992) 256-264.
- [151] S. Fukudo, K. Abe, M. Hongo, A. Utsumi, Y. Itoyama, Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats, *Brain Res.* 757 (1997) 146-148.
- [152] S. Fukudo, K. Abe, M. Hongo, A. Utsumi, Y. Itoyama, Psychophysiological stress induces heat shock cognate protein (HSC)70 mRNA in the cerebral cortex and stomach of rats, *Brain Res.* 675 (1995) 98-102.
- [153] A.M.A. Gader, S.A. Al-Mashhadani, S.S. Al-Harthy, Direct activation of platelets by heat is the possible trigger of the coagulopathy of heat stroke, *Br. J. Haematol.* 74 (1990) 86-92.
- [154] J. Galea-Lauri, A.J. Richardson, D.S. Latchman, D.R. Katz, Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF- $\alpha$  and cycloheximide, *J. Immunol.* 157 (1996) 4109-4118.
- [155] C. Garrido, J.-M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A.P. Arrigo, E. Solary, HSP27 inhibits cytochrome  $c$ -dependent activation of procaspase-9, *FASEB J.* 13 (1999) 2061-2070.

- [156] C. Garrido, S. Gurbuxani, L. Ravagnan, G. Kroemer, Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (2001) 433-442.
- [157] P. Gathiram, S.L. Gaffin, J.G. Brock-Utne, M.T. Wells, Prophylactic corticosteroid suppresses endotoxemia in heat-stressed primates, *Aviat. Space Environ. Med.* 59 (1988) 142-145.
- [158] P. Gathiram, M.T. Wells, J.G. Brock-Utne, S.L. Gaffin, Antilipopolysaccharide improves survival in primates subjected to heat stroke, *Circ. Shock* 23 (1987) 157-164.
- [159] P. Gathiram, M.T. Wells, D. Raidoo, J.G. Brock-Utne, S.L. Gaffin, Portal and systemic plasma lipopolysaccharide concentrations in heat-stressed primates, *Circ. Shock* 25 (1988) 223-230.
- [160] U. Gehring, Steroid hormone receptors and heat shock proteins, *Vitam. Horm.* 54 (1998) 167-205.
- [161] T.D. Geraciotti, D.G. Baker, N.N. Ekhtator, S. West, K.K. Hill, A.B. Bruce, D. Schmidt, B. Rounds-Kluger, R. Yehuda, P.E. Keck, J.W. Kasckow, CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder, *Am. J. Psychiatry* 158 (2001) 1227-1230.
- [162] A.B. Ginsberg, S. Campeau, H.E. Day, R.L. Spencer, Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or Fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *J. Neuroendocrinol.* 15 (2003) 1075-1083.
- [163] C.V. Gisolfi, R.D. Matthes, K.C. Kregel, R. Oppliger, Splanchnic sympathetic nerve activity and circulating catecholamines in the hyperthermic rat, *J. Appl. Physiol.* 70 (1991) 1821-1806.
- [164] J.-M. Goldbach, J. Roth, E. Zeisberger, Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 272 (1997) R675-R681.
- [165] D.S. Goldstein, B.S. McEwen, Allostasis, homeostats, and the nature of stress, *Stress* 5 (2002) 55-58.
- [166] M.F. Gonzalez, K. Shiraishi, K. Hisanaga, S.M. Sagar, M. Mandabach, F.R. Sharp, Heat shock proteins as markers of neural injury, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6 (1989) 93-100.
- [167] C.J. Gordon, *Temperature regulation in laboratory rodents*, Vol. 1, Cambridge University Press, New York, 1993, 276 pp.
- [168] C.J. Gordon, Thermal biology of the laboratory rat, *Physiol. Behav.* 47 (1990) 963-991.
- [169] C.J. Gordon, Y. Yang, Contribution of spontaneous motor activity to the 24 hour control of body temperature in male and female rats, *J. Therm. Biol.* 22 (1997) 59-68.
- [170] L. Groenink, J. van der Gugten, T. Zethof, J. van der Heyden, B. Olivier, Stress-induced hyperthermia in mice: hormonal correlates, *Physiol. Behav.* 56 (1994) 747-749.
- [171] L. Guerrini, F. Blasi, S. Denis-Donini, Synaptic activation of NF- $\kappa$ B by glutamate in cerebellar granule neurons *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 9077-9081.
- [172] I. Guzhova, K. Kislyakova, O. Moskalovia, I. Fridlanskaya, M. Tytell, M. Cheetham, B. Margulis, In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance, *Brain Res.* 914 (2001) 66-73.
- [173] A. Hafezi-Moghadam, T. Simoncini, Z. Yang, F.P. Limbourg, J.-C. Plumier, M.C. Rebsamen, C.-M. Hsieh, D.-S. Chui, K.L. Thomas, A.J. Prorock, V.E. Laubach, M.A. Moskowitz, B.A. French, K. Ley, J.K. Liao, Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase, *Nat. Med.* 8 (2002) 473-479.
- [174] D.J. Haleem, G. Kennet, G. Curzon, Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis, *Brain Res.* 458 (1988) 339-347.
- [175] J.R. Hales, L.B. Rowell, R.B. King, Regional distribution of blood flow in awake heat-stressed baboons, *Am. J. Physiol.* 237 (1979) H705-H712.
- [176] J.B. Halter, J.C. Beard, D. Porte, Islet function and stress hyperglycemia: plasma glucose and epinephrine interaction, *Am. J. Physiol.* 247 (1984) E47-E52.
- [177] M.M. Hammami, A. Bouchama, S. Al-Sedairy, E. Shail, Y. Al-Ohaly, G.E.D. Mohamed, Concentrations of soluble tumor necrosis factor and interleukin-6 receptors in heatstroke and heatstress, *Crit. Care Med.* 25 (1997) 1314-1319.

- [178] F. Han, H. Ozawa, K.-i. Matsuda, M. Nishi, M. Kawata, Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus, *Neurosci. Res.* 51 (2005) 371-381.
- [179] N. Harikai, K. Tomogane, M. Miyamoto, K. Shimada, S. Onodera, S.-I. Tashiro, Dynamic responses to acute heat stress between 34°C and 38.5°C, and characteristics of heat stress response in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 701-708.
- [180] H.J. Harris, Y. Kotelevtsev, J.J. Mullins, J.R. Seckl, M.C. Holmes, Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11 $\beta$ -HSD-1-deficient mice, *Endocrinology* 142 (2001) 114-120.
- [181] G.R. Hart, R.J. Anderson, C.P. Crumpler, A. Shulkin, G. Reed, J.P. Knochel, Epidemic classical haet stroke: clinical characteristics and course of 28 patients, *Medicine* 61 (1982) 189-197.
- [182] L.E. Hart, B.P. Egier, A.G. Shimizu, P.J. Tandan, J.R. Sutton, Exertional heat stroke: the runner's nemesis, *Can. Med. Assoc. J.* 122 (1980) 1144-1150.
- [183] F.W. Hartman, Lesions of the brain following fever therapy. Etiology and pathogenesis, *J. A. M. A.* 109 (1937) 2116-2120.
- [184] T. Hassanein, A. Razack, J.S. Gavalier, D.H. Van Thiel, Heat stroke: its clinical and pathological presentation, with particular attention to the liver, *Am. J. Gastroenterol.* 87 (1992) 1382-1389.
- [185] R.J. Heads, D.M. Yellon, D.S. Latchman, Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27 (1995) 1669-1678.
- [186] S. Heck, K. Bender, M. Kullmann, M. Göttlicher, P. Herrlich, A.C.B. Cato, I $\kappa$ B $\alpha$ -independent downregulation of NF- $\kappa$ B activity by glucocorticoid receptor, *EMBO J.* 16 (1997) 4698-4707.
- [187] C. Heim, U. Ehlert, D.H. Hellhammer, The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders, *Psychoneuroendocrinology* 25 (2000) 1-35.
- [188] D. Hémon, E. Jouglà, Surmortalité liée à la canicule d'août 2003 - Rapport d'étape, In: Française Ld (ed). INSERM, Paris (2003) pp 57.
- [189] J. Heo, H.G. Kattesh, M.P. Roberts, J.L. Morrow, J.W. Dailey, A.M. Saxton, Hepatic corticosteroid-binding globulin (CBG) messenger RNA expression and plasma CBG concentrations in young pigs in response to heat and social stress, *J. Anim. Sci.* 83 (2005) 208-215.
- [190] J.P. Herman, H. Figueiredo, N.K. Mueller, Y. Ulrich-Lai, M.M. Ostrander, D.C. Choi, W.E. Cullinan, Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness, *Front. Neuroendocrinol.* 24 (2003) 151-180.
- [191] J.P. Herman, M.K.H. Schafer, R.C. Thompson, S.J. Watson, Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo, *Mol. Endocrinol.* 6 (1992) 1061-1069.
- [192] D.G. Herrera, H.A. Robertson, Activation of c-fos in the brain, *Prog. Neurobiol.* 50 (1996) 83-107.
- [193] C. Hervé, C. Colard, S. Grillon, D. Fellmann, B. Griffond, Polyethylene glycol-induced hypovolemia affects the expression of MCH mRNA, but not dynorphin or secretogranin II MRNAs, in the rat lateral hypothalamus, *Neurosci. Lett.* 248 (1998) 133-137.
- [194] T.A. Hicks, J.J. McGlone, C.S. Whisnant, H.G. Kattesh, R.L. Norman, Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress, *J. Anim. Sci.* 76 (1998) 474-483.
- [195] B. Hinz, R. Hirschelmann, Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats, *Pharmacol. Res.* 17 (2000) 1273-1277.
- [196] G.E. Hoffman, D. Lyo, Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are well all 'Fos-ed out' ?, *J. Neuroendocrinol.* 14 (2002) 259-268.
- [197] S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter, H.P. Arnold, J. Brockmüller, A. Johné, Functional polymorphism of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 3473-3478.
- [198] S. Hogg, L. Michan, M. Jessa, Prediction of anti-panic properties of escitalopram in the dorsal periqueductal grey model of panic anxiety, *Neuropharmacology* 51 (2006) 141-145.

- [199] M.C. Holmes, J.R. Seckl, The role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain, *Mol. Cell. Endocrinol.* 248 (2006) 9-14.
- [200] J. Honkaniemi, J. Kononen, T. Kainu, I. Pyykönen, M. Peltö-Huikko, Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress, *Mol. Brain Res.* 25 (1994) 234-241.
- [201] L. Huang, N.F. Mivechi, D. Moskophidis, Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the *hsp70.1* or *hsp70.3* gene, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 8575-8591.
- [202] R.W. Hubbard, Heatstroke pathophysiology: the energy depletion model, *Med. Sci. Sports Exerc.* 22 (1989) 19-28.
- [203] R.W. Hubbard, W.D. Bowers, W.T. Matthew, F.C. Curtis, Rat model of acute heatstroke mortality, *J. Appl. Physiol.* 42 (1977) 809-816.
- [204] R.W. Hubbard, C.B. Matthew, M.J. Durkot, R.P. Francesconi, N. Massachusetts, Novel approaches to the pathophysiology of heatstroke: the energy depletion model, *Ann. Emerg. Med.* 16 (1987) 1066-1075.
- [205] P. Hughes, M. Dragunow, Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system, *Pharmacol. Rev.* 47 (1995) 133-178.
- [206] N.A.T.M. Huizenga, J.W. Koper, P. De Lange, H.A.P. Pols, R.P. Stolk, H. Burger, D.E. Grobbee, A.O. Brinkmann, F.H. De Jong, S.W.J. Lamberts, A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 144-151.
- [207] C.-H. Hung, N.-C. Chang, B.-C. Cheng, M.-T. Lin, Progressive exercise preconditioning protects against circulatory shock during experimental heatstroke, *Shock* 23 (2005) 426-433.
- [208] O. Hurtado, A. Cardenas, I. Lizasoain, L. Bosca, J.C. Leza, P. Lorenzo, M.A. Moro, Up-regulation of TNF- $\alpha$  convertase (FACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices, *Neuropharmacology* 40 (2001) 1094-1102.
- [209] O. Hurtado, I. Lizasoain, P. Fernandez-Tomé, A. Alvarez-Barrientos, J.C. Leza, P. Lorenzo, M.A. Moro, FACE/ADAM17-TNF- $\alpha$  pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 576-585.
- [210] T. Imaki, T. Shibasaki, M. Hotta, H. Demura, Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces *c-fos* mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of *c-fos* mRNA induction after stress, *Brain Res.* 616 (1993) 114-125.
- [211] N.H. Ing, Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs, *Biol. Reprod.* 72 (2005) 1290-1296.
- [212] Y. Inoue, Y. Tanaka, K. Omori, Y. Ogura, H. Ueda, Sex- and menstrual cycle-related differences in sweating and cutaneous blood flow in response to passive heat exposure, *Eur. J. Appl. Physiol.* 94 (2005) 323-332.
- [213] M. Isosaki, T. Nakashima, Psychological stress induces heat shock protein 70 expression in rat aorta, *Jpn. J. Pharmacol.* 76 (1998) 305-308.
- [214] C.Y. Ito, A.G. Kazantsev, A.S. Baldwin, Three NF- $\kappa$ B sites in the I $\kappa$ B- $\alpha$  promoter are required for induction of gene expression by TNF $\alpha$ , *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 3787-3792.
- [215] M. Jäättelä, D. Wissing, Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 231-236.
- [216] M.R. Jain, P. Patil, N. Subhedar, Direct action of metyrapone on brain: implication in feeding, *NeuroReport* 5 (1993) 69-71.
- [217] S. Jarcho, A Roman experience with heat stroke in 24 B.C., *Bull. NY Acad. Med.* 43 (1967) 767-768.
- [218] K. Kaarniranta, N. Oksala, H.M. Karjalainen, T. Suuronen, L. Sistonen, H.J. Helminen, A. Salminen, M.J. Lammi, Neuronal cells show regulatory differences in the hsp70 gene response, *Mol. Brain Res.* 101 (2002) 136-140.
- [219] N. Kagawa, Y. Mugiya, Brain HSP70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator, *Zool. Sci.* 19 (2002) 735-740.

- [220] J. Kalita, U.K. Misra, Neurophysiological studies in a patient with heat stroke, *J. Neurol.* 248 (2001) 993-995.
- [221] C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF- $\kappa$ B in primary neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 9618-9622.
- [222] T.Y. Kao, C.C. Chio, M.-T. Lin, Hypothalamic dopamine release and local cerebral blood flow during onset of heatstroke in rats, *Stroke* 25 (1994) 2483-2487.
- [223] T.Y. Kao, M.T. Lin, Brain serotonin depletion attenuates heatstroke-induced cerebral ischemia and cell death in rats, *J. Appl. Physiol.* 80 (1996) 680-684.
- [224] L.P. Kapcala, J.R. He, Y. Gao, J.O. Pieper, L.J. DeTolla, Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1 $\beta$  stimulation of adrenocorticotropin secretion, *Brain Res.* 728 (1996) 247-254.
- [225] N. Katayama, E. Iwata, H. Sakurai, T. Tsuchiya, M. Tsuda, Additive induction of Egr-1 (zif/268) mRNA expression in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells via cholinergic muscarinic,  $\alpha$ 2-adrenergic, and bradykinin receptors, *J. Neurochem.* 60 (1993) 902-907.
- [226] A.L. Kellermann, K.H. Todd, Killing heat, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 126-127.
- [227] M. Kellner, C. Otte, A. Yassouridis, M. Schick, H. Jahn, K. Wiedemann, Overnight metyrapone and combined dexamethasone/metyrapone tests in post-traumatic stress disorder: preliminary findings, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14 (2004) 337-339.
- [228] G.A. Kennet, S.L. Dickinson, G. Curzon, Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone, *Eur. J. Pharmacol.* 119 (1985) 143-152.
- [229] J.A. Kern, R.J. Lamb, J.C. Reed, R.P. Daniele, P.C. Nowell, Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes: posttranscriptional mechanisms, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 237-244.
- [230] M. Kew, I. Bersohn, H. Seftel, G. Kent, Liver damage in heat stroke, *Am. J. Med.* 49 (1970) 192-202.
- [231] M.C. Kew, C. Abrahams, N.W. Levin, H.C. Seftel, A.H. Rubenstein, I. Bersohn, The effects of heatstroke on the function and structure of the kidney, *Q. J. Med.* 36 (1967) 277-300.
- [232] M. Khogali, Epidemiology of heat illnesses during the Makkah Pilgrimages in Saudi Arabia, *Int. J. Epidemiol.* 12 (1983) 267-273.
- [233] M. Khogali, G. Elkhatab, M. Attia, M.K.Y. Mustafa, K. Gumaa, A.N. El-Din, M.S. Al-Adnani, Induced heat stroke: a model in sheep, In: M. Khogali, J.R.S. Hales (Eds.), *Heatstroke and temperature regulation*, Vol. 1, Academic press, Sydney, 1983, pp. 253-261.
- [234] J.G. Kiang, F.E. Carr, M.R. Burns, D.E. McClain, HSP-72 synthesis is promoted by increase in  $[Ca^{2+}]_i$  or activation of G proteins but not pH $_i$  or cAMP, *Am. J. Physiol.* 267 (1994) C104-C114.
- [235] J.G. Kiang, S.C. Kiang, Y.-T. Juang, G.C. Tsokos, N-nitro-L-arginine inhibits inducible HSP-70 via  $Ca^{2+}$ , PKC, and PKA in human intestinal epithelial T84 cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282 (2002) G415-G423.
- [236] J.G. Kiang, G.C. Tsokos, Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology, *Pharmacol. Therapeut.* 80 (1998) 183-201.
- [237] S.-W. Kim, J.-K. Lee, NO-induced downregulation of HSP10 and HSP60 expression in the postischemic brain, *J. Neurosc. Res.* 85 (2007) 1252-1259.
- [238] S.J. Kish, R. Keinert, M. Minauf, J. Gilbert, G.F. Walter, C. Slimovitch, E. Mauer, Y. Rezvani, R. Myers, O. Hornykiewicz, Brain neurotransmitter changes in three patients who had a fatal hyperthermia syndrome, *Am. J. Psychiatry* 147 (1990) 1358-1363.
- [239] E.A. Kiyatkin, L.P. Brown, R.A. Wise, Brain temperature fluctuation: a reflection of functional neural activation, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 164-168.
- [240] V. Koko, J. Djordjeviae, G. Cvijiae, V. Davidoviae, Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study, *J. Exp. Biol.* 207 (2004) 4225-4230.
- [241] T. Kondo, Y. Habara, T. Kanno, E. Kano, Thermosensitization and modification of cytosolic calcium concentration by verapamil and diltiazem in mouse mammary carcinoma cells, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29 (1994) 511-517.

- [242] M. Koratich, S.L. Gaffin, Mechanisms of calcium transport in human endothelial cells subjected to hyperthermia, *J. Therm. Biol.* 24 (1999) 245-249.
- [243] K.J. Kovacs, c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map, *Neurochem. Int.* 33 (1998) 287-297.
- [244] K.C. Kregel, Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *J. Appl. Physiol.* 92 (2002) 2177-2186.
- [245] K.C. Kregel, J.M. Overton, D.G. Johnson, C.M. Tipton, D.R. Seals, Mechanism for pressor response to nonexertional heating in the conscious rat, *J. Appl. Physiol.* 71 (1991) 192-196.
- [246] K.C. Kregel, P.T. Wall, C.V. Gisolfi, Peripheral vascular responses to hyperthermia in the rat, *J. Appl. Physiol.* 64 (1988) 2582-2588.
- [247] H.J. Krugers, R.H.A. Kemper, J. Korf, G.J. Ter Horst, S. Knollema, Metirapone reduces rat brain damage and seizures after hypoxia-ischemia: an effect independent of modulation of plasma corticosterone levels?, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 (1998) 386-390.
- [248] H.J. Krugers, S. Maslam, J. Korf, M. Joëls, The corticosterone synthesis inhibitor metirapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus, *Stroke* 31 (2000) 1162-1172.
- [249] A. Kurz, D.I. Sessler, F. Tayefeh, R. Goldberger, Poikilothermia syndrome, *J Intern Med* 244 (1998) 431-436.
- [250] N. Laaris, S. Haj-Dahmane, M. Hamon, L. Lanfumey, Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus, *Neuropharmacology* 34 (1995) 1201-1210.
- [251] N. Laflamme, S. Lacroix, S. Rivest, An essential role of interleukin-1 $\beta$  in mediating NF- $\kappa$ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10923-10930.
- [252] G.I. Lancaster, M.A. Febbraio, Exosome-dependent trafficking of HSP70, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 23349-23355.
- [253] J. Landry, D. Bernier, P. Chrétien, L.M. Nicole, R.M. Tanguay, N. Marceau, Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance, *Cancer Res.* 42 (1982) 2457-2461.
- [254] L. Lanfumey, C. Mannoury La Cour, N. Froger, M. Hamon, 5-HT-HPA interactions in two models of transgenic mice relevant to major depression, *Neurochem. Res.* 25 (2000) 1199-1206.
- [255] D. Langin, Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome, *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 482-491.
- [256] D. Langin, Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis, *C. R. Acad. Sci. Paris* 329 (2006) 598-607.
- [257] A. Larcen, H. Lambert, M.C. Laprevote-Heully, P. Alexandre, M. Simon, Coup de chaleur et coagulopathie de consommation. A propos de deux observations, *Sem. Hôp. Paris* 54 (1978) 603-619.
- [258] G. Laroia, R. Cuesta, G. Brewer, R.J. Schneider, Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway, *Science* 284 (1999) 499-502.
- [259] M. Lasa, M. Brook, J. Saklatvala, A.R. Clark, Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 771-780.
- [260] J.N. Lavoie, H. Lambert, E. Hickey, L.A. Weber, J. Landry, Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 505-516.
- [261] K.-H. Lee, Y.-H. Hwang, C.-T. Lee, Y.W. Kim, S.K. Han, Y.-S. Shim, C.-G. Yoo, The heat-shock-induced suppression of I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B cascade is due to inactivation of upstream regulators of I $\kappa$ B $\alpha$  through insolubilization, *Exp. Cell Res.* 299 (2004) 49-56.
- [262] S.W. Lee, A.-P. Tsou, H. Chan, J. Thomas, K. Petrie, E.M. Eugui, A.C. Allison, Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 $\beta$  gene and decrease the stability of interleukin 1 $\beta$  mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 1204-1208.

- [263] W.C. Lee, H.C. Wen, C.P. Chang, M.Y. Chen, M.T. Lin, Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke, *J. Appl. Physiol.* 100 (2006) 2073-2082.
- [264] T. Lehmann, C. Murphy, D.G. Zahra, M.L. Handel, Reduction of tumor necrosis factor induced nuclear factor- $\kappa$ B nuclear translocation and DNA binding by dexamethasone in human osteoarthritic synovial tissue explants, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 787-795.
- [265] L.R. Leon, The thermoregulatory consequences of heat stroke: are cytokines involved?, *J. Therm. Biol.* 31 (2006) 67-81.
- [266] L.R. Leon, M.D. Blaha, D.A. DuBose, Time course of cytokine, corticosterone and tissue injury response in mice during heat strain recovery, *J. Appl. Physiol.* 100 (2006) 1400-1409.
- [267] L.R. Leon, D.A. DuBose, C.W. Mason, Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 288 (2005) 197-204.
- [268] D.A. Lepore, J.V. Hurley, A.G. Stewart, W.A. Morrison, R.L. Anderson, Prior heat stress improves survival of ischemic-reperfused skeletal muscle in vivo, *Muscle Nerve* 23 (2000) 1847-1855.
- [269] D.A. Lepore, K.R. Knight, R.L. Anderson, W.A. Morrison, Role of priming stresses and Hsp70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle, *Cell Stress Chaperones* 6 (2001) 93-96.
- [270] T.K.C. Leung, M.Y. Rajendran, C. Monfries, C. Hall, L. Lim, The human heat-shock protein family, *Biochem. J.* 267 (1990) 125-132.
- [271] J.A. Levine, Heat stroke in the aged, *Am. J. Med.* 47 (1969) 251-257.
- [272] J. Lewis, A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers, Z.-G. Liu, Disruption of Hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10519-10526.
- [273] P.-L. Li, Y.-M. Chao, S.H.H. Chan, J.Y.H. Chan, Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarii confers cardiovascular protection during heatstroke, *Circulation* 103 (2001) 2114-2119.
- [274] A.C. Liberman, J. Druker, M.J. Perone, E. Arzt, Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis, *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (2007) 45-56.
- [275] H.R. Lieberman, J.H. Georgelis, T.J. Maher, S.K. Yeghiayan, Tyrosine prevents effects of hyperthermia on behavior and increases norepinephrine, *Physiol. Behav.* 84 (2005) 33-38.
- [276] C.L. Lim, G. Wilson, L. Brown, J.S. Coombes, L.T. Mackinnon, Pre-existing inflammatory state compromises heat tolerance in rats exposed to heat stress, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 292 (2005) 186-194.
- [277] M.K. Lim, Occupational heat stress, *Ann. Acad. Med. Singap.* 23 (1994) 719-724.
- [278] H.Y. Lin, H.J. Michtalik, S. Zhang, T.T. Andersen, D.A. Van Riper, K.K.J.A. Davies, G. Ermak, L.M. Petti, S. Nachod, A.V. Narayan, N. Bhatt, D.R. Crawford, Oxidative and calcium stress regulate DSR1 (Adapt78/MCIP1) protein, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 528-539.
- [279] M.-T. Lin, Brain monoamines and body temperature regulation, *Asia Pac. J. Pharmacol.* 9 (1994) 49-65.
- [280] M.-T. Lin, Heatstroke-induced cerebral ischemia and neuronal damage. Involvement of cytokines and monoamines, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 813 (1997) 572-580.
- [281] M.-T. Lin, Pathogenesis of an experimental heatstroke model, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (1999) 826-827.
- [282] M.T. Lin, T.Y. Kao, C.C. Chio, Y.T. Jin, Dopamine depletion protects striatal neurons from heatstroke-induced ischemia and cell death in rats, *Amer. J. Physiol.* 269 (1995) H487-H490.
- [283] M.T. Lin, T.Y. Kao, Y.T. Jin, C.F. Chen, Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the heat stroke-induced neuronal damage by reducing the cerebral ischemia in rats, *Brain Res. Bull.* 37 (1995) 595-598.
- [284] M.T. Lin, T.Y. Kao, C.F. Su, S.F. Hsu, Interleukin-1 $\beta$  production during the onset of heat stroke in rabbits, *Neurosci. Lett.* 174 (1994) 17-20.
- [285] M.-T. Lin, K.W. Lin, M.S. Young, Effects of body temperature on cardiovascular functional parameters in rats, *J. Therm. Biol.* 19 (1994) 123-128.

- [286] M.T. Lin, S.Z. Lin, Cerebral ischemia is the main cause for the onset of heat stroke syndrome in rabbits, *Experientia* 48 (1992) 225-227.
- [287] M.T. Lin, S.Z. Lin, Decentralization of superior cervical ganglia attenuates heat stroke formation in rabbits, *Chin. J. Physiol.* 33 (1990) 247-253.
- [288] M.T. Lin, H.H. Liu, Y.L. Yang, Involvement of interleukin-1 receptor mechanisms in development of arterial hypotension in rat heatstroke, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) H2072-H2077.
- [289] M.-T. Lin, W.-H. Su, Z. Szreder, Microdialysis measurement of monoamine release from the preoptic anterior hypothalamus of rats in response to heat or cold exposure, In: K. Pleschka, R. Gerstberger (Eds.), *Integrative and cellular aspects of autonomic functions: temperature and osmoregulation*, John Libbey Eurotext, Paris, 1994, pp. 225-230.
- [290] M.-T. Lin, Y.L. Yang, H.-J. Tsay, C-fos expression in rat brain during heat stress, *J. Therm. Biol.* 24 (1999) 423-427.
- [291] C.-C. Liu, C.-H. Chien, M.-T. Lin, Glucocorticoids reduce interleukin-1 $\beta$  concentration and result in neuroprotective effects in rat heatstroke, *J. Physiol.* 527 (2000) 333-343.
- [292] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> method, *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [293] S.-M. Lucas, N.J. Rothwell, R.M. Gibson, The role of inflammation in CNS injury and disease, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) S232-S240.
- [294] S.J. Lupien, B.S. McEwen, The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies, *Brain. Res. Rev.* 24 (1997) 1-27.
- [295] S.J. Lupien, C.W. Wilkinson, S. Brière, C. Ménard, N.M.K. Ng Ying Kin, N.P.V. Nair, The modulatory effects of corticosteroids on cognition: studies in young human populations, *Psychoneuroendocrinology* 27 (2002) 401-416.
- [296] J.E. Madl, D.L. Allen, Hyperthermia depletes adenosine triphosphate and decreases glutamate uptake in rat hippocampal slices, *Neuroscience* 69 (1995) 395-405.
- [297] J.L.M. Madrigal, B. Garcia-Bueno, J.R. Caso, B.G. Pérez-Nievas, J.C. Leza, Stress-induced oxidative changes in brain, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5 (2006) 561-568.
- [298] J.L.M. Madrigal, O. Hurtado, M.A. Moro, I. Lizasoain, P. Lorenzo, A. Castrillo, L. Bosca, J.C. Leza, The increase in TNF- $\alpha$  levels is implicated in NF- $\kappa$ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilisation stress, *Neuropsychopharmacology* 26 (2002) 155-163.
- [299] P.J. Magistretti, Neuron-glia metabolic coupling and plasticity, *J. Exp. Biol.* 209 (2006) 2304-2311.
- [300] P.J. Magistretti, L. Pellerin, Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354 (1999) 1155-1163.
- [301] P.J. Magistretti, O. Sorg, Y. Naichen, L. Pellerin, S. de Rham, J.-L. Martin, Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters, *Ren. Physiol. Biochem.* 17 (1994) 168-171.
- [302] M.R. Mainous, W. Ertel, I.H. Chaudry, E.A. Deitch, The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation?, *Shock* 4 (1995) 193-199.
- [303] G.B. Makara, J. Haller, Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications, *Prog. Neurobiol.* 65 (2001) 367-390.
- [304] N. Malamud, W. Haymaker, R.P. Custer, Heat stroke. A clinico-pathologic study of 125 fatal cases, *Mil. Surg.* 99 (1946) 397-449.
- [305] T.J. Malkinson, W.L. Veale, K.E. Cooper, Experimental characterization and applications of an anesthetized animal model for thermoregulatory investigations, *Biomed. Sci. Instrum.* 29 (1993) 369-376.
- [306] I.Y. Malyshev, E.B. Manukhina, V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, A.F. Vanin, Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation, *FEBS Letters* 370 (1995) 159-162.
- [307] P. Manzerra, S.J. Rush, I.R. Brown, Temporal and spatial distribution of heat shock mRNA and protein (hsp70) in the rabbit cerebellum in response to hyperthermia, *J. Neurosc. Res.* 36 (1993) 480-490.
- [308] D. Marazziti, A. Di Muro, P. Castrogiovanni, Psychological stress and body temperature changes in humans, *Physiol. Behav.* 52 (1992) 393-395.

- [309] M. Marinelli, M. Le Moal, P.V. Piazza, Acute pharmacological blockade of corticosterone secretion reverses food restriction-induced sensitization of the locomotor response to cocaine, *Brain Res.* 724 (1996) 251-255.
- [310] M. Marinelli, P.V. Piazza, Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 387-394.
- [311] M.B. Maron, J.A. Wagner, S.M. Horvath, Thermoregulatory responses during competitive marathon running, *J. Appl. Physiol.* 42 (1977) 909-914.
- [312] P. Maroni, P. Dandinelli, L. Tiberio, F. Rovetta, R. Piccoletti, L. Schiaffonati, In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation, *Mol. Brain Res.* 119 (2003) 90-99.
- [313] M.P. Massett, D.G. Johnson, K.C. Kregel, Cardiovascular and sympathoadrenal responses to heat stress following water deprivation in rats, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 270 (1996) R652-R659.
- [314] M.P. Massett, S.J. Lewis, K.C. Kregel, Effect of heating on the hemodynamic responses to vasoactive agents, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 44 (1998) R844-R853.
- [315] M.P. Massett, S.J. Lewis, H.M. Stauss, K.C. Kregel, Vascular reactivity and baroreflex function during hyperthermia in conscious rats, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 279 (2000) R1282-R1289.
- [316] J.S. McCarty, A. Buchberger, J. Reinstein, B. Bukau, The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system, *J. Mol. Biol.* 249 (1995) 126-137.
- [317] B.S. McEwen, Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1032 (2004) 1-7.
- [318] B.S. McEwen, Protective and damaging effects of stress mediators, *N. Engl. J. Med.* 174 (1998) 171-179.
- [319] B.S. McEwen, Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840 (1998) 33-44.
- [320] B.S. McEwen, E.R. De Kloet, W. Rostene, Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system, *Physiol. Rev.* 66 (1986) 1121-1188.
- [321] B.S. McEwen, E. Stellar, Stress and the individual. Mechanisms leading to disease, *Arch. Intern. Med.* 153 (1993) 2093-2101.
- [322] B.S. McEwen, J.C. Wingfield, The concept of allostasis in biology and biomedicine, *Horm. Behav.* 43 (2003) 2-15.
- [323] M.A. Medeiros, L.C. Reis, L.E. Mello, Stress-induced c-fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine, *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 1246-1256.
- [324] P. Meerlo, S.F. de Boer, J.M. Koolhaas, S. Daan, R.H. van den Hoofdakker, Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats, *Physiol. Behav.* 59 (1996) 735-739.
- [325] P. Mehlen, C. Kretz-Remy, X. Prévaille, A.-P. Arrigo, Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human  $\alpha$ B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins againsts TNF- $\alpha$ -induced cell death, *EMBO J.* 15 (1996) 2695-2706.
- [326] K.R. Melia, A.E. Ryabinin, R. Schroeder, F.E. Bloom, M.C. Wilson, Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress, *J. Neurosci.* 14 (1994) 5929-5938.
- [327] E. Møllerup, Brain glycogen after intracisternal injection of some corticosteroids, *J. Neurochem.* 17 (1970) 607-611.
- [328] A.C. Metha, R.N. Baker, Persistent neurological deficits in heat stroke, *Neurology* 20 (1970) 336-340.
- [329] G.A. Metz, N.M. Jadavji, L.K. Smith, Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 1190-1200.
- [330] V. Michel, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, F. Canini, Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment, *Neuroscience* 147 (2007) 522-531.
- [331] V. Michel, A. Peinnequin, A. Alonso, A. Buguet, R. Cespuglio, F. Canini, Effect of glucocorticoid depletion on heat-induced Hsp70, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene expression, *Brain Res.* 1164 (2007) 64-71.
- [332] E. Mikics, B. Barsy, B. Barsvari, J. Haller, Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field, *Horm. Behav.* 48 (2005) 152-162.

- [333] R.B. Mikkelsen, L. Reinlib, M. Donowitz, D. Zahniser, Hyperthermia effects on cytosolic  $[Ca^{2+}]$ : analysis at the single cell level by digitized imaging microscopy and cell survival, *Cancer Res.* 51 (1991) 359-364.
- [334] K.E. Miller, J.D. Raese, M. Morrison-Bogorad, Expression of heat shock protein 70 and heat shock cognate 70 messenger RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment, *J. Neurochem.* 56 (1991) 2060-2071.
- [335] M. Minami, Y. Kuraishi, M. Satoh, Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and LIF in the rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176 (1991) 593-598.
- [336] C. Mirabel, *Le coup de chaleur. Essai d'analyse épidémiologique, clinique et physiopathologique à partir d'un cas clinique, d'une enquête épidémiologique en milieu militaire et d'une revue de la littérature.* Université Claude Bernard-Lyon I, (1983).
- [337] K. Mizoguchi, A. Ishige, M. Aburada, T. Tabira, Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus, *Neuroscience* 119 (2003) 887-897.
- [338] B. Moghaddam, M.L. Bolinao, B. Stein-Behrens, R. Sapolsky, Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate, *Brain Res.* 655 (1994) 251-254.
- [339] B. Möpert, Z. Herbert, J.D. Caldwell, G.F. Jirikowski, Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus, *Horm. Metab. Res.* 38 (2006) 246-252.
- [340] R.I. Morimoto, P.E. Kroeger, J.J. Cotto, The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory, In: U. Feige, R.I. Morimoto, I. Yahara, B. Polla (Eds.), *Stress-inducible cellular responses*, Vol. 77, Birkhäuser, Basel, 1996, pp. 139-163.
- [341] P.L. Moseley, C. Gapen, E.S. Wallen, M.E. Walter, M.W. Peterson, Thermal stress induces epithelial permeability, *Am. J. Physiol.* 267 (1994) C425-C434.
- [342] P.L. Moseley, C.V. Gisolfi, New frontiers in thermoregulation and exercise, *Sports Med.* 16 (1993) 163-167.
- [343] P.J. Muchowski, J.L. Wacker, Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones, *Nat. Neurosci.* 6 (2005) 11-22.
- [344] M.B. Müller, M.E. Keck, E.B. Binder, A.E. Kresse, T.P. Hagemeyer, R. Landgraf, F. Holsboer, M. Uhr, ABCB1 (MDR1)-type P-glycoproteins at the blood-brain barrier modulate the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: implications for affective disorder, *Neuropsychopharmacology* 28 (2003) 1991-1998.
- [345] A. Munck, P.M. Guyre, N.J. Holbrook, Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions, *Endocrine Rev.* 5 (1984) 25-44.
- [346] A. Munck, A. Naraj-Fejes-Toth, The ups and downs of glucocorticoid physiology: permissive and suppressive effects revisited, *Mol. Cell. Endocrinol.* 90 (1992) C1-C4.
- [347] C. Munhoz, J.L.M. Madrigal, B. Garcia-Bueno, J.M. Pradillo, M.A. Moro, I. Lizasoain, P. Lorenzo, C. Scavone, J.C. Leza, TNF- $\alpha$  accounts for short-term persistence of oxidative status in rat brain after two weeks of repeated stress, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 1125-1130.
- [348] N. Nagai, M. Hosokawa, S. Itohara, E. Adachi, T. Matsushita, N. Hosokawa, K. Nagata, Embryonic lethality of molecular chaperone Hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 1499-1505.
- [349] K. Nagata, Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, *Matrix Biol.* 16 (1998) 379-386.
- [350] K. Nagata, S. Saga, K.M. Yamada, A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 223-229.
- [351] K. Nagata, K.M. Yamada, Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7531-7536.
- [352] A. Nakai, M. Tanabe, Y. Kawazoe, J. Inazawa, R.I. Morimoto, K. Nagata, HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 469-481.
- [353] Y. Nakajima, H. Nose, A. Takamata, Plasma hyperosmolality and arterial pressure regulation during heating in dehydrated and awake rats, *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 275 (1998) 1703-1711.

- [354] A.V. Narayan, R. Stadel, A.B. Hahn, D.L. Bhoiwala, G. Cornielle, E. Sarazin, I. Koleilat, D.R. Crawford, Redox response of the endogenous calcineurin inhibitor Adapt78, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 719-727.
- [355] Y. Nezu, M. Tagawa, Y. Sakaue, Y. Hara, S. Tsuchida, R. Ogawa, Kinetics of endotoxin concentration and tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 activities in the systemic and portal circulation during small intestinal ischemia and reperfusion in dogs, *Am. J. Vet. Res.* 63 (2002) 1680-1686.
- [356] B. Nielsen, L. Nybo, Cerebral changes during exercise in the heat, *Sports Med.* 33 (2003) 1-11.
- [357] C.-S. Niu, M.-T. Lin, I.-M. Liu, J.-T. Cheng, Role of striatal glutamate in heatstroke-induced damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurosci. Lett.* 348 (2003) 77-80.
- [358] K.C. Niu, K.C. Lin, C.Y. Yang, M.T. Lin, Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and mannitol in both circulatory shock and cerebral ischemia injury in rat heatstroke., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (2003) 745-751.
- [359] E.G. Noble, A. Moraska, R.S. Mazzeo, D.A. Roth, M.C. Olsson, R.L. Moore, M. Fleshner, Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training, *J. Appl. Physiol.* 86 (1999) 1696-1701.
- [360] A.W. Norman, M. Mizwicki, D.P.G. Norman, Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 27-41.
- [361] C.S. Nyakas, E.R. de Kloet, H.D. Veldhuis, B. Bohus, Hippocampal corticosterone receptors and novelty-induced behavioral activity: effect of kainic acid lesions in the hippocampus, *Brain Res.* 288 (1983) 219-228.
- [362] L. Nybo, N.H. Secher, Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise, *Prog. Neurobiol.* 72 (2004) 223-261.
- [363] T.F. O'Donnell, The hemodynamic and metabolic alterations associated with acute heat stress injury in marathon runners, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 301 (1977) 262-269.
- [364] H.J. Oh, X. Chen, J.R. Subjeck, Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31636-31640.
- [365] H.J. Oh, D. Easton, M. Murawski, Y. Kaneko, J.R. Subjeck, The chaperoning activity of hsp110, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15712-15718.
- [366] K. Ohara, F. Furuyama, Y. Isobe, Prediction of survival time of rats in severe heat, *J. Appl. Physiol.* 38 (1975) 724-729.
- [367] B. Olivier, T. Zethof, T. Pattij, M. van Boogaert, R. van Oorschot, C. Leahy, R. Oosting, A. Bouwknecht, J. Veening, J. van der Gugten, L. Groenink, Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 117-132.
- [368] L. Osborn, S. Kunkel, G.J. Nabel, Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor  $\kappa$ B, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 2336-2340.
- [369] T.W.W. Pace, R. Gaylord, F. Topczewski, M. Girotti, B. Rubin, R.L. Spencer, Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experience is not directly related to the stressfulness of that experience, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 1679-1690.
- [370] P. Pandey, A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S.M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E.S. Alnemri, D. Kufe, S. Kharbanda, Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90, *EMBO J.* 19 (2000) 4310-4322.
- [371] A. Parcellier, S. Gurbuxani, E. Schmitt, E. Solary, C. Garrido, Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 505-512.
- [372] S. Pardue, K. Groshan, J.D. Raese, M. Morrison-Bogorad, Hsp70 mRNA induction is reduced in neurons of aged rat hippocampus after thermal stress, *Neurobiol. aging* 13 (1992) 661-672.
- [373] C.M. Pariante, A. Makoff, S. Lovestone, S. Feroli, A. Heyden, A.H. Miller, R.W. Kerwin, Antidepressant enhance glucocorticoid receptor function *in vitro* by modulating the membrane steroid transporters, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 1335-1343.
- [374] H.-S. Park, J.-S. Lee, S.-H. Huh, J.-S. Seo, E.-J. Choi, Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase, *EMBO J.* 20 (2001) 446-456.

- [375] P. Parnet, K.W. Kelley, R.-M. Bluthé, R. Dantzer, Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior, *J. Neuroimmunol.* 125 (2002) 5-14.
- [376] R.F. Parrott, D.M. Llyod, Restraint, but not frustration, induces prostaglandin-mediated hyperthermia in pigs, *Physiol. Behav.* 57 (1995) 1051-1055.
- [377] A. Pavlik, I.S. Aneja, J. Lexa, B.A. Al-Zoabi, Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp70 following heat stress in the rat, *Brain Res.* 973 (2003) 179-189.
- [378] A. Peinnequin, C. Mouret, O. Birot, A. Alonso, J. Mathieu, D. Clarençon, D. Agay, Y. Chancerelle, E. Multon, Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green, *BMC Immunol.* 5 (2004).
- [379] M. Pespeni, M. Hodnett, J.-F. Pittet, In vivo stress preconditioning, *Methods* 35 (2005) 158-164.
- [380] J.-F. Pittet, H. Lee, M. Pespeni, A. O'Mahony, J. Roux, W.J. Welch, Stress-induced inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway results from the insolubilization of I $\kappa$ B kinase complex following its dissociation from heat shock protein 90, *J. Immunol.* 174 (2005) 384-394.
- [381] J.M. Pizarro, L.S. Haro, E.J. Barea-Rodriguez, Learning associated increase in heat shock cognate 70mRNA and protein expression, *Neurobiol. Learn. Mem.* 79 (2003) 142-151.
- [382] G. Pockley, Heat shock proteins as regulators of the immune response, *Lancet* 362 (2003) 469-476.
- [383] A.M. Porter, Heat illness and soldiers, *Mil. Med.* 158 (1993) 606-608.
- [384] C.E. Powell, C.S. Watson, B. Gametchu, Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49<sup>+</sup> lymphoma cells, *Endocrine* 10 (1999) 271-280.
- [385] N. Quan, M. Whiteside, M. Herkenham, Time course and localization patterns of interleukin-1 $\beta$  messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide, *Neuroscience* 83 (1998) 281-293.
- [386] L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S.A. Susin, C. Maise, E. Dugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jäättelä, J.M. Penninger, C. Garrido, G. Kroemer, Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 839-843.
- [387] D.S. Reddy, Physiological role of adrenal deoxycorticosterone-derived neuroactive steroids in stress-sensitive conditions, *Neuroscience* 138 (2006) 911-920.
- [388] D.S. Reddy, M.A. Rogawski, Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA<sub>A</sub> receptor function and seizure susceptibility, *J. Neurosci.* 22 (2002) 3795-3805.
- [389] J.M.H.M. Reul, E.R. De Kloet, Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation, *Endocrinology* 117 (1985) 2505-2511.
- [390] J.-M. Revest, F. Di Blasi, P. Kitchener, F. Rougé-Pont, A. Desmedt, M. Turiault, F. Tronche, P.V. Piazza, The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 664-672.
- [391] T. Rhen, J.A. Cidlowski, Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1711-1723.
- [392] K.T. Riabowol, L.A. Mizzen, W.J. Welch, Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70, *Science* 242 (1988) 433-436.
- [393] D. Ricart-Jané, V. Rodríguez-Sureda, A. Benavides, J. Peinado-Onsurbe, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat, *Metabolism* 51 (2002) 925-931.
- [394] S. Ridder, S. Chourbaji, R. Hellweg, A. Urani, C. Zacher, W. Schmid, M. Zink, H. Hörtnagl, H. Flor, F.A. Henn, G. Schütz, P. Gass, Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions, *J. Neurosci.* 25 (2005) 6243-6250.
- [395] F.M. Ritossa, A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*., *Experientia* 18 (1962) 571-573.
- [396] S. Rivest, S. Lacroix, L. Vallières, S. Nadeau, J. Zhang, N. Laflamme, How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli, *P.S.E.B.M.* 223 (2000) 22-38.

- [397] S. Robinson, S.L. Wiley, L.G. Myhre, S. Bondurant, J.J. Mamlin, Temperature regulation of men following heatstroke, *Israel J. Med. Sci.* 12 (1976) 786-795.
- [398] A.A. Romanovsky, A.I. Ivanov, Y.P. Shimansky, Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality, *J. Appl. Physiol.* 92 (2002) 2667-2679.
- [399] A.A. Romanovsky, V.A. Kulchitsky, C.T. Simons, N. Sugimoto, Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic?, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) R332-R338.
- [400] C. Romera, O. Hurtado, S.H. Botella, I. Lizasoain, A. Cardenas, P. Fernandez-Tomé, J.C. Leza, P. Lorenzo, M.A. Moro, *In vitro* ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor- $\alpha$  pathway, *J. Neurosci.* 24 (2004) 1350-1357.
- [401] B. Roozendaal, O. Carmi, J.L. McGaugh, Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 1429-1433.
- [402] R. Rosmond, The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome, *Obes. Res.* 10 (2002) 1078-1086.
- [403] B.A. Roethermel, R.B. Vega, R.S. Williams, The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling, *Trends Cardiovasc Med* 13 (2003) 15-21.
- [404] D. Rotllant, A. Armario, A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat, *Neuroscience* 130 (2005) 427-434.
- [405] D. Rotllant, S. Ons, J. Carrasco, A. Armario, Evidence that metyrapone can act as stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 693-700.
- [406] F. Rougé-Pont, V. Deroche, M. Le Moal, P.V. Piazza, Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 3903-3907.
- [407] K. Ruchalski, H. Mao, S.K. Singh, Y. Wang, D.D. Mosser, F. Li, J.H. Schwartz, S.C. Borkan, HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285 (2003) C1483-C1493.
- [408] R. Rupprecht, Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties, *Psychoneuroendocrinology* 28 (2003) 139-168.
- [409] R. Rupprecht, A. Ströhle, B. Hermann, F.d. Michele, G. Spalletta, A. Pasini, F. Holsboer, E. Romeo, Neuroactive steroid concentrations following metyrapone administration in depressed patients and healthy volunteers, *Biol. Psychiatry* 44 (1998) 912-914.
- [410] H. Russcher, P. Smit, E.L.T. van der Akker, E.F.C. van Rossum, A.O. Brinkmann, F.H. De Jong, S.W.J. Lamberts, J.W. Koper, Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 5804-5810.
- [411] A.J. Ryan, C.V. Gisolfi, Responses of rat mesenteric arteries to norepinephrine during exposure to heat stress and acidosis, *J. Appl. Physiol.* 78 (1995) 38-45.
- [412] S.B., J.G.V., C.O., M.G., L'isoforme  $\beta$  du récepteur des glucocorticoïdes: un facteur de résistance aux glucocorticoïdes?, *Médecine/Sciences* 14 (1998) 812-814.
- [413] S.B. Sachidhanandam, J. Lu, K.S.Y. Low, S.M. Moolchala, Herbimycin A attenuates apoptosis during heat stress in rats., *Eur. J. Pharmacol.* 474 (2003) 121-128.
- [414] S.I. Said, H. Pakbaz, H.I. Berisha, S. Raza, NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1300-1302.
- [415] T.R. Sairanen, P.J. Lindsberg, M. Brenner, A.-L. Siren, Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and its receptor at mRNA and protein level, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 1107-1120.
- [416] J.M. Saïssy, Le coup de chaleur, In: J.M. Saïssy (Ed.), *Réanimation tropicale*, Vol. 1, Arnette, Paris, 1997, pp. 305-322.
- [417] J.M. Saïssy, M. Vitris, J. Demazière, M. Seck, M. Gaye, L. Marcoux, M. Ndiaye, Hyperthermie maligne d'effort chez le sujet acclimaté au milieu tropical, *JEUR* 4 (1991) 65-69.
- [418] K. Saito, K. Suyama, K. Nishida, Y. Sei, A.S. Basile, Early increases in TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain, *Neurosci. Lett.* 206 (1996) 149-152.

- [419] A. Saleh, S.M. Srinivasula, L. Balkir, P.D. Robbins, E.S. Alnemri, Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 476-483.
- [420] Y. Sanchez, J. Taulien, K.A. Borkovich, S. Lindquist, Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress, *EMBO J.* 11 (1992) 2357-2364.
- [421] G.M. Santoro, Heat Shock Factors and the control of the stress response, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 55-63.
- [422] R.M. Sapolsky, McEwen-induced modulation of endocrine history: a partial review, *Stress* 2 (1997) 1-12.
- [423] R.M. Sapolsky, M.L. Romero, A.U. Munck, How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions, *Endocrine Rev.* 21 (2000) 55-89.
- [424] S. Sato, N. Fujita, T. Tsuruo, Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 10832-10837.
- [425] R.I. Scheinman, P.C. Cogswell, A.K. Lofquist, A.S. Baldwin, Role of transcriptional activation of  $\kappa\text{B}\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids, *Science* 270 (1995) 283-286.
- [426] G. Schelling, B. Roozendaal, T. Krauseneck, M. Schmoelz, D. Quervain, J. Briegel, Efficacy of hydrocortisone in preventing posttraumatic stress disorder following critical illness and major surgery, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1071 (2006) 46-53.
- [427] L.C. Schenberg, A.S. Bittencourt, E.C.M. Sudré, L.C. Vargas, Modeling panic attacks, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25 (2001) 647-659.
- [428] R. Schlichter, V. Rybalchenko, P. Poisbeau, M. Verleye, J.-M. Gillardin, Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine, *Neuropharmacology* 39 (2000) 1523-1535.
- [429] H. Schneider, F. Pitossi, D. Balschun, A. Wagner, A. Del Rey, H.O. Besedovsky, A neuromodulatory role of interleukin-1 $\beta$  in the hippocampus., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 7778-7783.
- [430] B. Schöbitz, E.R. De Kloet, F. Holsboer, Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain., *Prog. Neurobiol.* 44 (1994) 397-432.
- [431] S.E. Schuder, Stress-induced hypocortisolemia diagnosed as psychiatric disorder responsive to hydrocortisone replacement, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1057 (2005) 466-478.
- [432] J.-L. Schwachtgen, P. Houston, C. Campbell, V. Sukhatme, M. Braddock, Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2540-2549.
- [433] H. Selye, *Du rêve à la découverte*, Editions de La Presse, 1973.
- [434] H. Selye, The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation, *J. Clin. Endocrin.* 6 (1946) 117-230.
- [435] H. Selye, Stress and the general adaptation syndrome, *Br. Med. J.* 17 (1950) 1383-1392.
- [436] H. Selye, A syndrome produced by diverse nocuous agents, *Nature* 138 (1936) 32.
- [437] J.C. Semenza, C.H. Rubin, K.H. Falter, J.D. Selanikio, D.W. Flanders, H.L. Howe, J.L. Wilhelm, Heat-related deaths during the July 1995 heat wave in Chicago, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 84-90.
- [438] R. Sen, D. Baltimore, Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa\text{B}$  by a posttranslational mechanism, *Cell* 47 (1986) 921-928.
- [439] E. Senba, T. Ueyama, Stress-induced expression of immediate early genes in the rat brain and peripheral organs of the rat, *Neurosci. Res.* 29 (1997) 183-207.
- [440] G. Serratrice, G. Kosak-Ribbens, P.J. Cozzone, Aspects neurologiques de l'hyperthermie maligne. Clinique, physiopathologie, génétique, *Rev. Neurol.* 153 (1997) 304-313.
- [441] D. Servant, P.L. Graziani, D. Moyse, P.J. Parquet, Traitement du trouble de l'adaptation avec anxiété: évaluation de l'efficacité et de la tolérance de l'éitifoxine par un essai en double aveugle contre produit de référence, *L'encéphale* 24 (1998) 569-574.
- [442] T.P. Shanley, M.A. Ryan, T. Eaves-Pyles, H.R. Wong, Heat shock inhibits phosphorylation of I- $\kappa\text{B}\alpha$ , *Shock* 14 (2000) 447-450.
- [443] Y. Shapiro, T. Rosenthal, E. Sohar, Experimental heatstroke. A model in dogs, *Arch. Intern. Med.* 131 (1973) 688-692.

- [444] H.S. Sharma, Blood-brain barrier in stress. In: India, Banaras Hindu university, Varanasi, 1982.
- [445] H.S. Sharma, Heat-related deaths are largely due to brain damage, *Indian J Med Res* 121 (2005) 621-623.
- [446] H.S. Sharma, Hyperthermia influences excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in the central nervous system. An experimental study in the rat using behavioural, biochemical, pharmacological, and morphological approaches, *J. Neural. Transm.* 113 (2005) 497-519.
- [447] H.S. Sharma, K. Drieu, P. Alm, J. Westman, Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and ginkgolide B pretreatment in the rat, *Acta Neurochir.* 76 (2000) 81-86.
- [448] H.S. Sharma, K. Drieu, P. Alm, J. Westman, Upregulation of neuronal nitric oxide synthase, edema and cell injury following heat stress are reduced by pretreatment with EGB-761 in the rat, *J. Therm. Biol.* 24 (1999) 439-445.
- [449] H.S. Sharma, P.J. Hoopes, Hyperthermia induced pathophysiology of central nervous system., *Int. J. Hyperthermia* 19 (2003) 325-354.
- [450] H.S. Sharma, J. Westman, F. Nyberg, Pathophysiology of brain edema and cell changes following hyperthermic brain injury, In: H.S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Brain function in hot environment*, Vol. 115, Elsevier Sciences, Amsterdam, 1998, pp. 351-412.
- [451] F.J. Sharom, Shedding light on drug transport: structure and function of the p-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1), *Biochem. Cell Biol.* 84 (2006) 979-992.
- [452] Y.-f. Shen, J.-h. Liu, X.-z. Wang, X.-k. Cheng, Y.-l. Wang, N.-h. Wu, Essential role of the first intron in the transcription of hsp90 $\beta$  gene, *FEBS Letters* 413 (1997) 92-98.
- [453] J.D. Shepard, Y. Liu, P. Sassone-Corsi, G. Aguilera, Role of glucocorticoids and cAMP-mediated repression in limiting corticotropin-releasing hormone transcription during stress, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4073-4081.
- [454] S. Shibolet, R. Coll, T. Gilat, E. Sohar, Heatstroke: its clinical picture and mechanism in 36 cases, *Q. J. Exp. Physiol.* 36 (1967) 525-547.
- [455] S. Shibolet, M.C. Lancaster, Y. Danon, Heat stroke: a review, *Aviat. Space Environ. Med.* 47 (1976) 280-301.
- [456] T. Shimizu, Y. Yamashita, M. Satoi, A. Togo, N. Wada, T. Matsuishi, A. Ohnishi, H. Kato, Heat stroke-like episode in a child caused by zonisamide, *Brain Dev.* 19 (1997) 366-368.
- [457] A. Simi, D. Lerouet, E. Pinteaux, D. Brough, Mechanisms of regulation for interleukin-1 $\beta$  in neurodegenerative disease, *Neuropharmacology* 52 (2007) 1563-1569.
- [458] I.S. Singh, R.M. Viscardi, I. Kalvakolanu, S. Calderwood, J.D. Hasday, Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  transcription in macrophages exposed to febrile range temperature, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9841-9848.
- [459] R. Skidmore, J.A. Gutierrez, V. Guerriero, K.C. Kregel, HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) R92-R97.
- [460] D.M. Skovronsky, S. Fath, V.M.-Y. Lee, M.E. Milla, Neuronal localization of the TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques, *J. Neurobiol.* 49 (2001) 40-46.
- [461] C.L. Smith, G.L. Hammond, Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat, *Endocrinology* 130 (1992) 2245-2251.
- [462] S.M. Smith, W.W. Vale, The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress, *Dialogues Clin. Neurosci.* 8 (2006) 383-395.
- [463] K.A. Smoak, J.A. Cidlowski, Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation, *Mech. Ageing Dev.* 125 (2004) 697-706.
- [464] S.M. Southwick, J.H. Krystal, C.A. Morgan, D. Johnson, L.M. Nagy, A. Nicolaou, G.R. Heninger, D.S. Charney, Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder, *Arch. Gen. Psychiatry* 50 (1993) 266-274.
- [465] A.N. Stanton, Is overheating a factor in some unexpected infant deaths?, *Lancet* 17 (1980) 1054-1057.
- [466] B.A. Stein, R.M. Sapolsky, Chemical adrenalectomy reduces hippocampal damage induced by kainic acid, *Brain Res.* 473 (1988) 175-180.

- [467] C. Stellato, Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 255-263.
- [468] P. Sterling, J. Eyer, Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology, In: S. Fisher, J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health*, John Wiley & Sons Inc, New York, 1988, pp. 629-649.
- [469] M.A. Stevenson, S.K. Calderwood, G.M. Hahn, Effect of hyperthermia (45°C) on calcium flux in chinese hamster ovary HA-1 fibroblasts and its potential role in cytotoxicity and heat resistance, *Cancer Res.* 47 (1987) 3712-3717.
- [470] C.-Y. Su, K.-Y. Chong, J. Chen, S. Ryter, R. Khadori, C.-C. Lai, A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive hsp70 in H9c2 cardiac myoblasts and confers oxidative protection, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31 (1999) 845-855.
- [471] C.-Y. Su, K.-Y. Chong, O.E. Owen, W.H. Dillmann, C. Chang, C.-C. Lai, Constitutive and inducible hsp70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (1998) 587-598.
- [472] L. Sun, J. Chang, S.R. Kirchhoff, A.A. Knowlton, Activation of HSF and selective increase in heat-shock proteins by acute dexamethasone treatment, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 278 (2000) H1091-H1097.
- [473] K. Suzuki, B. Murtuza, I.A. Sammut, N. Latif, J. Jayakumar, R.T. Smolenski, Y. Kaneda, Y. Sawa, H. Matsuda, M.H. Yacoub, Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction, *Circulation* 106 (2002) I270-I276.
- [474] J. Szelényi, Cytokines and the central nervous system, *Brain Res. Bull.* 54 (2001) 329-338.
- [475] O. Szold, I.I. Reider-Groswasser, R. Ben Abraham, G. Aviram, Y. Segev, P. Biderman, P. Sorkine, Gray-white matter discrimination. A possible marker for brain damage in heat stroke?, *Eur. J. Radiol.* 43 (2002) 1-5.
- [476] J.F. Taltavull, V.I. Chefer, T.S. Shippenberg, E.A. Kiyatkin, Severe brain hypothermia as a factor underlying behavioral immobility during cold-water forced swim, *Brain Res.* 975 (2003) 244-247.
- [477] M. Tanabe, A. Nakai, Y. Kawazoe, K. Nagata, Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15389-15395.
- [478] S.M. Tanimura, A.G. Watts, Corticosterone modulation of ACTH secretagogue gene expression in the paraventricular nucleus, *Peptides* 22 (2001) 775-783.
- [479] J.G. Tasker, S. Di, R. Malcher-Lopes, Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors, *Endocrinology* 147 (2006) 5549-5556.
- [480] J.C. Tortosa, V. Mahé, P. Ichai, E. Savier, F. Saliba, O. Brenet, D. Castaing, H. Bismuth, D. Samuel, Coup de chaleur d'exercice et insuffisance hépatique aiguë. *Reanim. Urgences* 8 (1999) 363-367.
- [481] O. Touzani, H. Boutin, J. Chuquet, N. Rothwell, Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia, *J. Neuroimmunol.* 100 (1999) 203-215.
- [482] H.-J. Tsay, H.-Y. Li, C.-H. Lin, Y.-L. Yang, J.-Y. Yeh, M.-T. Lin, Heatstroke induces c-fos expression in the rat hypothalamus, *Neurosci. Lett.* 262 (1999) 41-44.
- [483] H. Uchinami, Y. Yamamoto, M. Kume, K. Yonezawa, Y. Ishikawa, K. Taura, A. Nakajima, K. Hata, Y. Yamaoka, Effect of heat shock preconditioning on NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B pathway during I/R injury of the rat liver, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282 (2002) G971-G971.
- [484] R. Udelsman, M.J. Blake, C.A. Stagg, N.J. Holbrook, Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression in vivo, *Surgery* 115 (1994) 611-616.
- [485] S. Umemoto, Y. Kawai, T. Ueyama, E. Senba, Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of NGFI-A, *Neuroscience* 80 (1997) 763-773.
- [486] J.B. Uney, J.N.C. Kew, K. Staley, P. Tyers, M.V. Sofroniew, Transfection-mediated expression of human Hsp70i protects rat dorsal root ganglion neurones and glia from severe heat stress, *FEBS Letters* 334 (1993) 313-316.
- [487] S. Urayama, M.W. Musch, J. Retsky, M.B. Madonna, D. Straus, E.B. Chang, Dexamethasone protection of rat intestinal epithelial cells against oxidant injury is mediated by induction of heat shock protein 72, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 1860-1865.

- [488] G. Valen, T. Kawakami, P. Tähepõld, A. Dumitrescu, C. Löwbeer, J. Vaage, Glucocorticoid pretreatment protects cardiac function and induces heat shock protein 72, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279 (2000) H836-H843.
- [489] A.-J. Valleron, A. Boumendil, *Epidémiologie et canicules: analyses de la vague de chaleur 2003 en France*, *C. R. Biologies* 327 (2004) 1125-1141.
- [490] E.F.C. van Rossum, E.B. Binder, M. Majer, J.W. Koper, M. Ising, S. Modell, D. Salyakina, S.W.J. Lamberts, F. Holsboer, Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression, *Biol. Psychiatry* 59 (2006) 681-688.
- [491] E.F.C. van Rossum, S.W.J. Lamberts, Glucocorticoid resistance syndrome: a diagnostic and therapeutic approach, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20 (2006) 611-626.
- [492] E.F.C. van Rossum, S.W.J. Lamberts, Polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition, *Recent Prog. Horm. Res.* (2004) 333-357.
- [493] J. Vandesompele, K. De preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002) 0034.0031-0034.0011.
- [494] J.G. Veening, A.J. Bouwknecht, H.J.J. Joosten, J.P. Dederen, T.J.J. Zethof, L. Groenink, J. van der Gugten, B. Olivier, Stress-induced hyperthermia in the mouse: *c-fos* expression, corticosterone and temperature changes, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28 (2004) 699-707.
- [495] H.D. Veldhuis, E.R. de Kloet, I. van Zoerst, B. Bohus, Adrenalectomy reduces exploratory activity in the rat: a specific role of corticosterone, *Horm. Behav.* 16 (1982) 191-198.
- [496] M. Verleye, J.-M. Gillardin, Effects of etifoxine on stress-induced hyperthermia, freezing behavior and colonic motor activation in rats, *Physiol. Behav.* 82 (2004) 891-897.
- [497] C.A. Vidair, W.C. Dewey, Evaluation of a role for intracellular Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in hyperthermic cell killing, *Radiat. Res.* 105 (1986) 187-200.
- [498] C.A. Vidair, Z. Wang, W.C. Dewey, Noninvolvement of the heat-induced increase in the concentration of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in killing by heat and induction of thermotolerance, *Radiat. Res.* 105 (1990) 187-200.
- [499] S. Vidovic, A. Cvoro, J. Dundjerski, D. Trajkovic, G. Matic, Hyperthermic stress affects glucocorticoid receptor-mediated transcription in rat liver., *Cell Biol. Int.* 20 (1996) 553-559.
- [500] L. Vitkovic, J. Bockaert, C. Jacque, Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain?, *J. Neurochem.* 74 (2000) 457-471.
- [501] R. Voellmy, F. Boellmann, Chaperone regulation of the heat shock protein response, *Adv. Exp. Med. Biol.* 594 (2007) 89-99.
- [502] S.A. Wadekar, D. Li, S. Periyasamy, E.R. Sanchez, Inhibition of heat shock transcription factor by GR, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1396-1410.
- [503] S.A. Wadekar, D. Li, E.R. Sanchez, Agonist-activated glucocorticoid receptor inhibits binding of heat shock factor 1 to the heat shock protein 70 promoter in vivo, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 500-508.
- [504] G. Walker, J. Pfeilschifter, D. Kunz, Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)- $\gamma$ -stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16679-16687.
- [505] R.C. Walsh, I. Koukoulas, A. Garnham, P.L. Moseley, M. Hargreaves, M.A. Febbraio, Exercise increases serum Hsp72 in humans, *Cell Stress Chaperones* 6 (2001) 386-393.
- [506] T.J. Walters, K.L. Ryan, M.R. Tehrany, M.B. Jones, L.A. Paulus, P.A. Mason, HSP70 expression in the CNS in response to exercise and heat stress in rats, *J. Appl. Physiol.* 84 (1998) 1269-1277.
- [507] J. Wang, G. Chambers, J.E. Cottrell, I.S. Kass, Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices, *J. Neurophysiol.* 83 (2000) 3462-3472.
- [508] J.-L. Wang, D.-S. Ke, M.-T. Lin, Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion, *Shock* 23 (2005) 161-167.

- [509] X. Wang, G.Z. Feuerstein, L. Xu, H. Wang, W.A. Schumacher, M.L. Ogletree, R. Taub, J.J.-W. Duan, C.P. Decicco, R.-Q. Liu, Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme by a selective antagonist protects brain from focal ischemic injury in rats, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 890-896.
- [510] X. Wang, T.-L. Yue, F.C. Barone, R.F. White, R.C. Gagnon, G.Z. Feuerstein, Concomitant cortical expression of TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia, *Mol. Chem. Neuropath.* 23 (1994) 103-114.
- [511] Z.-Z. Wang, C.-L. Wang, T.-C. Wu, H.-N. Pan, S.-K. Wang, J.-D. Jiang, Autoantibody response to heat shock protein 70 in patients with heatstroke, *Am. J. Med.* 111 (2001) 654-657.
- [512] D.E. Washington, D.I. Sessler, A. Moayeri, B. Merrifield, J. McGuire, M. Prager, K. Belani, S. Hudson, M. Schroeder, Thermoregulatory responses to hyperthermia during isoflurane anesthesia in humans, *J. Appl. Physiol.* 74 (1993) 82-87.
- [513] L.R. Watkins, M.K. Hansen, K.T. Nguyen, J.E. Lee, S.F. Maier, Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 $\beta$ : molecular biology for non-molecular biologists, *Life Sci.* 65 (1999) 449-481.
- [514] A.G. Watts, Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback, *Front. Neuroendocrinol.* 26 (2005) 109-130.
- [515] J.W. Welch, Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease, *Physiol. Rev.* 72 (1992) 1063-1081.
- [516] H. Wellmann, B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, Retrograde transport of transcription factor NF- $\kappa$ B in living neurons, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11821-11829.
- [517] H.-C. Wen, Chronic hypoxia preconditioning increases survival in rats suffering from heatstroke, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29 (2002) 435-440.
- [518] R. Werner, Effect of metopirone-ditartrate on thermogenesis in the guinea-pig, *Comp. Biochem. Physiol.* 90C (1988) 445-450.
- [519] A.E. West, E.C. Griffith, M.E. Greenberg, Regulation of transcription factors by neural activity, *Nat. Neurosci.* 3 (2002) 921-931.
- [520] J. Westman, H.S. Sharma, Heat shock protein response in the central nervous system following hyperthermia, In: J. Westman, H.S. Sharma (Eds.), *Prog. Brain. Res.*, Vol. 115, Amsterdam, 1998, pp. 207-239.
- [521] D. Wirth, P. Gustin, P.V. Drion, C. Dessy-Doize, E.S. Christians, Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). I: Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques, *Ann. Méd. Vét.* 146 (2002) 201-216.
- [522] S.J. Won, H.F. Huang, M.T. Lin, Heatstroke induces a reduction of natural killer cell activity in rats., *J. Therm. Biol.* 24 (1999) 447-453.
- [523] H.R. Wong, M. Ryan, J.R. Wispé, Stress response decreases NF- $\kappa$ B nuclear translocation and increases I- $\kappa$ B $\alpha$  expression in A549 cells, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2423-2428.
- [524] H.R. Wong, M.A. Ryan, I.Y. Menendez, J.R. Wispé, Heat shock activates the I- $\kappa$ B $\alpha$  promoter and increases I- $\kappa$ B $\alpha$  mRNA expression, *Cell Stress Chaperones* 4 (1999) 1-7.
- [525] G. Wright, E. Knecht, D. Wasserman, Colonic heating patterns and the variation of thermal resistance among rats, *J. Appl. Physiol.* 43 (1977) 59-64.
- [526] J.-M. Wu, L. Xiao, X.-K. Cheng, L.-X. Cui, N.-H. Wu, Y.-F. Shen, PKC $\epsilon$  is a unique regulator for *hsp90 $\beta$*  gene in heat shock response, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 51143-51149.
- [527] T. Wu, S. Chen, C. Xiao, C. Wang, Q. Pan, Z. Wang, M. Xie, Z. Mao, Y. Wu, R.M. Tanguay, Presence of antibody against the inducible Hsp71 in patients with heat-induced illness, *Cell Stress Chaperones* 6 (2001) 113-120.
- [528] S. Wüst, E.F.C. Van Rossum, I.S. Federenko, J.W. Koper, R. Kumsta, D.H. Hellhammer, Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 565-573.
- [529] A.Y.-W. Yam, V. Albanèse, H.-T.J. Lin, J. Frydman, Hsp110 cooperates with different cytosolic Hsp70 systems in a pathway for *de novo* folding, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41252-41261.

- [530] H. Yamamoto, K.C. Zheng, M. Ariizumi, Influence of heat exposure on serum lipid and lipoprotein cholesterol in young male subjects, *Ind. Health* 41 (2003) 1-7.
- [531] Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004) 72-79.
- [532] C.-Y. Yang, M.-T. Lin, Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia, *Stroke* 33 (2002) 709-794.
- [533] Y.-L. Yang, M.-T. Lin, Heat shock protein protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heatstroke, *Amer. J. Physiol.* 276 (1999) 1961-1967.
- [534] Y.-L. Yang, K.-T. Lu, H.-J. Tsay, C.-H. Lin, M.-T. Lin, Heat shock protein expression protects against death following exposure to heatstroke in rats, *Neurosci. Lett.* 252 (1998) 9-12.
- [535] Y.-L. Yang, W.H.-T. Pan, T.-H. Chiu, M.-T. Lin, Striatal glutamate release is important for development of ischemic damage to striatal neurons during rat heatstroke, *Brain Res.* 795 (1998) 121-127.
- [536] B. Yaqub, S. Al Deeb, Heat strokes: aetiopathogenesis, neurological characteristics, treatment and outcome, *J. Neurol. Sci.* 156 (1998) 144-151.
- [537] B.A. Yaqub, Neurologic manifestations of heatstroke at the Mecca pilgrimage, *Neurology* 37 (1987) 1004-1006.
- [538] B.A. Yaqub, S.S. Al-Harathi, I.O. Al-Orainey, M.A. Laajam, M.T. Obeid, Heat stroke at the Mekkah pilgrimage: clinical characteristics and course of 30 patients, *Q. J. Med.* 59 (1986) 523-530.
- [539] B.A. Yaqub, A.K. Daif, C.P. Panayiotopoulos, Pancerebellar syndrome in heat stroke: clinical course and CT scan findings, *Neuroradiology* 29 (1987) 294-296.
- [540] R. Yehuda, Post-traumatic stress disorder, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 108-114.
- [541] R. Yehuda, S.L. Halligan, L.M. Bierer, Cortisol levels in adult offspring of holocaust survivors: relation to PTSD symptom severity in the parent and child, *Psychoneuroendocrinology* 27 (2002) 171-180.
- [542] R. Yehuda, L.J. Siever, M.H. Teicher, R.A. Levengood, D.K. Gerber, a. Schmeidler, R.-K. Yang, Plasma norepinephrine and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol concentrations and severity of depression in combat posttraumatic stress disorder and major depressive disorder, *Biol. Psychiatry* 44 (1998) 56-63.
- [543] T.P. Yeo, Heat Stroke. A comprehensive review, *AACN Clin. Issues* 15 (2004) 280-293.
- [544] J.C. Young, F.U. Hartl, Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 640-642.
- [545] M.-S. Young, H.F. Pan, T.Y. Kao, M.-T. Lin, Alterations of cardiovascular functional parameters after onset of heat stroke in rats, *Chin. J. Physiol.* 36 (1993) 193-198.
- [546] M.R. Yudt, J.A. Cidlowski, The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins nad responses through a single gene, *Mol. Endocrinol.* 16 (2002) 1719-1726.
- [547] S.-L. Zhang, J. Yu, X.-K. Cheng, L. Ding, F.-Y. Heng, N.-H. Wu, Y.-F. Shen, Regulation of human hsp90 $\alpha$  gene expression, *FEBS Letters* 444 (1999) 130-135.
- [548] Z. Zhang, M. Chopp, A. Goussev, C. Powers, Cerebral vessels express interleukin 1 $\beta$  after cerebral ischemia, *Brain Res.* 784 (1998) 210-217.
- [549] Q. Zhao, J. Wang, I.V. Levichkin, S. Stasinopoulos, M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad, A mitochondrial specific stress response in mammalian cells, *EMBO J.* 21 (2002) 4411-4419.
- [550] M. Zhong, S.-J. Kim, C. Wu, Sensitivity of *Drosophila* heat shock transcription factor to low pH., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 3135-3140.
- [551] M. Zhong, A. Orosz, C. Wu, Direct sensing of heat and oxidation by *drosophila* heat shock transcription factor, *Mol. Cell* 2 (1998) 101-108.
- [552] Y. Zurovski, L. Eckstein, M. Horowitz, Heat stress and thermal dehydration: lactatemia and plasma volume regulation, *J. Appl. Physiol.* 71 (1991) 2434-2439.



# **ANNEXES**



# ***I. Annexe 1: matériel et méthodes de la pré-expérimentation***

## **A. Espèce animale utilisée**

Le rat mâle de type Sprague-Dawley (Iffa Credo) de 250-350 g est choisi en raison d'une abondante littérature scientifique sur cet animal et en raison de son utilisation dans les expérimentations antérieures du laboratoire concernant le coup de chaleur.

## **B. Conditions d'hébergement des animaux**

La stabulation des animaux se fait dans une animalerie périphérique dédiée aux rats et dont l'ambiance est contrôlée ( $T_a$  :  $22 \pm 1$  °C, humidité relative (h.r.) :  $50 \pm 10$  %, bruit blanc inférieur à 50 db). La nourriture et la boisson sont servies *ad libitum*. Le cycle lumière/obscurité est un rythme de 12 heures avec la lumière à 7 heures.

Ils sont maintenus en animalerie durant au moins 8 jours après réception en vue d'une habitude aux conditions expérimentales et de la structuration sociale. Durant cette phase, les animaux sont pesés tous les matins ouvrés. Ils sont en cage de 3 pour des raisons de structuration sociale : risque de structuration dominant/dominé à 2 par cage (type E5, polypropylène).

## **C. Traitement**

La métyrapone : 2-Méthyl-1,2-di(pyridine-3-yl)propan-1-one (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est utilisée pour son action inhibitrice de la synthèse des glucocorticoïdes au niveau de la  $11\beta$ -hydroxylase, enzyme de conversion de la désoxycorticostérone en corticostérone. Cette substance est solubilisée dans du polyéthylène glycol (PEG, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), qui est préalablement diluée dans du chlorure de sodium afin d'atteindre une concentration de 40%. La métyrapone est administrée à une dose de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans un volume de  $5 \text{ mL.kg}^{-1}$  de solution de PEG. Les animaux vecteurs reçoivent le même volume de solvant. Le traitement est injecté par voie sous-cutanée deux heures avant le début de l'expérimentation.

Bien que ce solvant ait déjà été utilisé dans d'autres études [107, 401, 404], il est susceptible d'induire une hypovolémie en raison de son fort pouvoir osmotique [193, 478, 514]. Des analyses de variables biochimiques sanguines ont donc été réalisées afin de contrôler ces effets secondaires.

## **D. Groupes expérimentaux**

Quatre-vingt-dix-neuf rats sont randomisés dans 11 groupes dont les effectifs sont détaillés dans le **Tableau 3**. Le protocole comprend trois conditions d'exposition, la neutralité thermique ( $T_a = 22^\circ\text{C}$  pour les groupes Contrôle, Injection, Témoin hyperthermie et Témoin coup de chaleur), l'hyperthermie

correspondant à 60 min d'exposition à  $T_a=40^\circ\text{C}$  ; et le CC correspondant à une exposition à  $T_a= 40^\circ\text{C}$  jusqu'à  $T_{re}=43^\circ\text{C}$ . Chacune de ces trois conditions, hormis pour le groupe Contrôle, est divisée en deux groupes de traitement, la métyrapone afin de réaliser la déplétion en glucocorticoïdes, et le vecteur polyéthylène glycol (PEG).

**Tableau 9** : Effectifs des groupes expérimentaux

	<i>Contrôle</i>	<i>Injection</i>	<i>Témoin hyperthermie</i>	<i>Témoin CC</i>	<i>Hyperthermie</i>	<i>CC</i>
<b>Polyéthylène glycol (PEG)</b>	9	9	9	9	9	9
<b>Métyrapone</b>		9	9	9	9	9
<b>Sous-total</b>	9	18	18	18	18	18
					<b>Total</b>	99

## E. Protocole

Le déroulement de chaque journée expérimentale, incluant six animaux décalés d'une demi-heure, est détaillé sur le chronogramme présenté dans la **Figure 26**. A 7h00, les 6 animaux sont mis en cages individuelles avec un peu de leur sciure de cage d'hébergement afin de réduire le stress de nouveauté. Le premier animal reçoit l'injection sous-cutané de traitement (métyrapone ou PEG) correspondant à son groupe. Un laps de temps de deux heures est respecté entre l'injection et le début de l'expérimentation afin de laisser la réaction de stress s'éteindre. A 9h00, l'animal reçoit ses thermocouples rectal (installé à 7 cm de la marge anale) et cutané (face supérieure de la racine de la queue). Les températures sont mesurées de manière continue tout au long de l'expérimentation. Il reste dans sa cage à la neutralité durant 30 min (« Ref »). A 9h30, l'animal dans sa cage est transporté dans la chambre climatique dont l'environnement est ainsi réglé :  $T_a=40^\circ\text{C}$  et h.r.=40-50%. Il y reste 60 min (2 groupes « Hyperthermie ») ou jusqu'à ce que sa température centrale atteigne  $43^\circ\text{C}$  (2 groupes « Coup de chaleur »). Les animaux témoins subissent la même procédure mais la température de la chambre climatique est laissée à  $T_a=22^\circ\text{C}$ . Les animaux du groupe Injection suivent le même décours temporel. Néanmoins, l'expérimentation est réduite à sa plus simple expression : l'animal, dans sa cage, reçoit l'injection de métyrapone ou de solvant. Deux heures plus tard, il est prélevé de sa cage pour être anesthésié sous halothane et sacrifié. Les animaux du groupe Contrôle ne subissent aucune manipulation et sont sacrifiés entre 9h00 et 11h00.

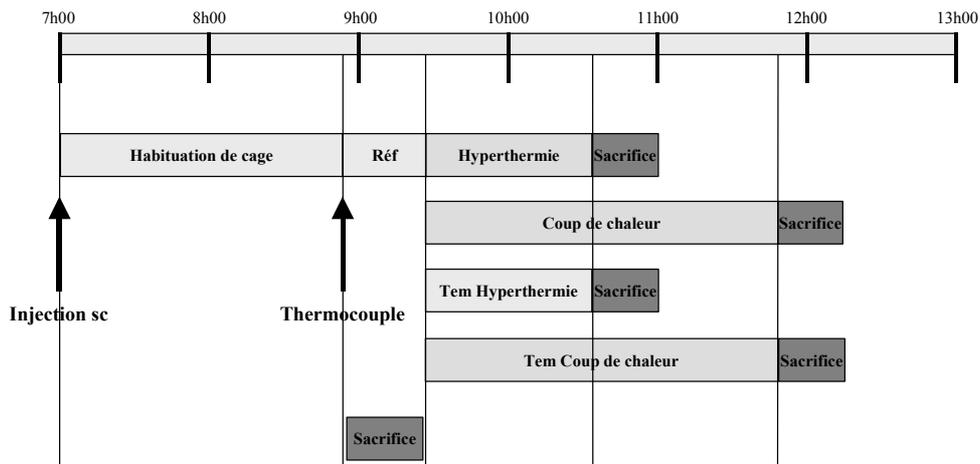


Figure 26 : Chronogramme d'une journée expérimentale

## D. Procédure d'anesthésie à l'halothane

L'anesthésie des animaux est effectuée grâce à l'halothane (Laboratoire Belamont, Paris, France). Le dispositif d'anesthésie se compose d'une cuve à halothane (Ohmeda, Maurepas, France), d'une boîte hermétique dotée d'un couvercle et d'une table de travail avec une arrivée de gaz anesthésiant. Lors de l'extraction de la chambre climatique, l'animal est immédiatement placé dans la boîte hermétique ventilée avec un gaz contenant 4% d'halothane dans 100% d'O<sub>2</sub>. L'anesthésie est acquise en moins d'une demi-minute. L'animal est alors extrait de la cuve et son museau est placé dans un système permettant une ventilation faciale avec le même gaz afin de maintenir l'anesthésie.

## E. Procédure de prélèvement post-mortem

L'animal étant toujours placé dans le système d'anesthésie à l'halothane, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur est exposé. Le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque à vue jusqu'à ex-sanguination, puis stocké dans des tubes d'héparinate de sodium, déposés dans la glace en attente de centrifugation (4500 RPM, 4°C, 7 min). Le surnageant est aliquoté puis congelé à -80°C en attente de dosage hormonaux et biochimiques.

L'animal est ensuite décapité. Le cerveau est clivé par microdissection en zones. Un échantillon de cortex frontal est prélevé, pesé, puis déposé dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de RNAlater (Ambion, Courtaboeuf, France). Il est ensuite placé à 4°C pendant 24 heures avant d'être stocké à -20°C en attente du dosage des ARNm par RT-PCR en temps réel.

## F. Exploitation des données de température

Les températures rectale ( $T_{re}$ ) cutanée ( $T_{cut}$ ) et d'ambiance ( $T_a$ ) sont mesurées toutes les 5 secondes au cours de l'expérimentation. La variable Heat Loss Index (HLI) a été calculée selon la formule suivante [398, 399] :  $HLI = \frac{T_{cut} - T_a}{T_{re} - T_a}$ . Cette formule permet d'évaluer la fraction de chaleur transmise du corps vers l'environnement par perte de chaleur non évaporative de la peau vers l'environnement. HLI peut varier de 0 à 1 avec une vasoconstriction cutanée d'autant plus élevée que la valeur se rapproche de 0 et inversement, une vasodilatation d'autant plus importante que la valeur se rapproche de 1. Cette variable a été calculée pour chaque mesure de température de chaque rat uniquement sur les périodes de  $T_a$  à 22°C car la formule n'est pas applicable sur des périodes transitoires d'exposition à 40°C. HLI a donc été calculé sur toute la période de mesure de température chez les rats témoins et uniquement sur la période de référence chez les rats exposés à la chaleur.

Les valeurs sont moyennées sur les 30 min de la période de référence ( $T_{re}$  et  $T_{cut}$  Ref) et sur les 30 secondes de la fin d'exposition à la chaleur ( $T_{re}$  et  $T_{cut}$  Finales). Dans les résultats complémentaires, les valeurs des groupes considérés ( $T_{re}$  et  $T_{cut}$  et HLI) sont aussi moyennées sur une minute durant les 5 premières minutes de la période de stress et sur 15 min durant toute la période de stress.

La sévérité de l'hyperthermie est évaluée par la charge thermique correspondant à l'aire sous la courbe de  $T_{re}$  au dessus d'une valeur seuil de 40,4°C ( $AUC_{40,4}$  en °C.min). Cette charge thermique est calculée selon la formule suivante :  $AUC_{40,4} = \Sigma(T_{re} \text{ excédant } 40,4) - 40,4)/12$ . Le seuil de 40,4°C représente la température rectale minimale observée pour laquelle un risque de mortalité apparaît dans les 24 heures suivant l'exposition de rats actifs à la chaleur [203]. Un autre point de rupture a été défini par Hubbard : lorsque l' $AUC_{40,4}$  excède les 20°C.min, le risque de mortalité apparaît chez les rats exposés passivement à la chaleur. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la valeur d' $AUC_{40,4}$  de 20°C.min peut être considérée comme la transition d'un état physiologique régulé à un état pathologique dérégulé.

## ***II. Annexe 2 : matériel et méthodes de l'expérimentation 1 : métyrapone et tolérance à la chaleur***

### **A. Espèce animale utilisée**

Le rat mâle de type Sprague-Dawley (Iffa Credo) de 250-350 g est choisi en raison d'une abondante littérature scientifique sur cet animal et en raison de son utilisation dans les expérimentations antérieures du laboratoire concernant le coup de chaleur.

### **B. Conditions d'hébergement des animaux**

La stabulation des animaux se fait dans une animalerie périphérique dédiée aux rats et dont l'ambiance est contrôlée ( $T_a$  :  $22 \pm 1$  °C, humidité relative :  $50 \pm 10$  %, bruit blanc inférieur à 50 db). La nourriture et la boisson sont servies *ad libitum*. Le cycle lumière/obscurité est un rythme de 12 heures avec la lumière à 8 heures.

Ils sont maintenus en animalerie durant au moins 8 jours après réception en vue d'une habitude aux conditions expérimentales et de la structuration sociale. Durant cette phase, les animaux sont pesés tous les matins ouvrés. Ils sont en cage de 3 pour des raisons de structuration sociale : risque de structuration dominant/dominé à 2 par cage (type E5, polypropylène).

### **C. Traitement**

La métyrapone : 2-Méthyl-1,2-di(pyridine-3-yl)propan-1-one (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est utilisée pour son action inhibitrice de la synthèse des glucocorticoïdes au niveau de la  $11\beta$ -hydroxylase, enzyme de conversion de la désoxycorticostérone en corticostérone. Cette substance est solubilisée dans du polyéthylène glycol (PEG, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), qui est préalablement diluée dans du chlorure de sodium afin d'atteindre une concentration de 40%. La métyrapone est administrée à une dose de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans un volume de  $5 \text{ mL.kg}^{-1}$  de solution de PEG. Les animaux vecteurs reçoivent le même volume de solvant. Le traitement est injecté par voie sous-cutanée deux heures avant le début de l'expérimentation.

Bien que ce solvant ait déjà été utilisé dans d'autres études [107, 401, 404], il est susceptible d'induire une hypovolémie en raison de son fort pouvoir osmotique [193, 478, 514]. Des analyses de variables biochimiques sanguines ont donc été réalisées afin de contrôler ces effets secondaires.

### **D. Groupes expérimentaux**

Quatre-vingt-dix-huit animaux sont randomisés dans 13 groupes dont les effectifs sont détaillées dans le **Tableau 10**. Le protocole comprend un groupe Contrôle ne subissant aucun traitement, un groupe Injection recevant uniquement le traitement et cinq groupes recevant le traitement, équipés de

thermocouples et exposés à la chaleur pendant des durées différentes ; 0, 15, 30, 45 et 60 min correspondant aux groupes H<sub>0</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>30</sub>, H<sub>45</sub>, H<sub>60</sub>. Chacun des groupes, hormis le Contrôle est divisé en deux groupes de traitements « PEG » et « métyrapone ». Afin d'éliminer le biais de l'hypothermie due à la métyrapone, les animaux recevant de la métyrapone sont conditionnés dans un environnement à 29°C juste après l'injection du traitement. La stabulation à 29°C correspond à une vraie thermoneutralité, c'est-à-dire à la température ambiante induisant le maintien de la température rectale pour la consommation énergétique la plus faible. On peut donc imaginer travailler en températures clamp avec ces conditions. Pour l'animal, la contrainte surajoutée est minime.

**Tableau 10** : Effectifs des groupes expérimentaux

	<i>Contrôle</i>	<i>Injection</i>	<i>H<sub>0</sub></i>	<i>H<sub>15</sub></i>	<i>H<sub>30</sub></i>	<i>H<sub>45</sub></i>	<i>H<sub>60</sub></i>
<b>PEG</b>	14	7	7	7	7	7	7
<b>Métyrapone</b>		7	7	7	7	7	7
<b>Sous-total</b>	14	14	14	14	14	14	14
<b>Total</b>							98

## E. Protocole

Chaque journée expérimentale inclut 7 animaux, un rat contrôle ne recevant pas de traitement et un rat de chacun des six groupes de traitement, recevant soit la métyrapone, soit le PEG (**Figure 27**). A 7h00, les 7 animaux sont mis en cages individuelles avec un peu de leur sciure de cage d'hébergement afin de réduire le stress de nouveauté. Les six animaux traités reçoivent l'injection sous-cutanée de métyrapone ou de PEG. Les animaux recevant la métyrapone sont transférés dans une chambre climatique avec une T<sub>a</sub>=29°C. Un laps de temps de deux heures est respecté entre l'injection et le début de l'expérimentation afin de laisser la réaction de stress s'éteindre. A 9h00, 5 animaux reçoivent leurs thermocouples rectal (installé à 7 cm de la marge anale) et cutané (face supérieure de la racine de la queue). Les températures sont mesurées de manière continue tout au long de l'expérimentation. Ils restent dans leur cage à la neutralité durant 30 minutes (« Ref »). A 9h30, les 4 animaux des groupes d'exposition à la chaleur (H<sub>0</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>30</sub>, H<sub>45</sub>, H<sub>60</sub>) sont transportés dans la chambre climatique dont l'environnement est ainsi réglé : T<sub>a</sub>=40°C et r.h.=40-50%. Les rats restent dans ces conditions pendant 0, 15, 30, 45 ou 60 minutes selon leur groupe d'exposition. L'animal du groupe H<sub>0</sub> n'est pas exposé à la chaleur mais directement transféré dans la pièce de prélèvement (« Sacrifice H<sub>0</sub> »). Les animaux des groupes Contrôle et Injection sont sacrifiés et prélevés à 11h00 et 9h30 respectivement. (« Sacrifice Té »).

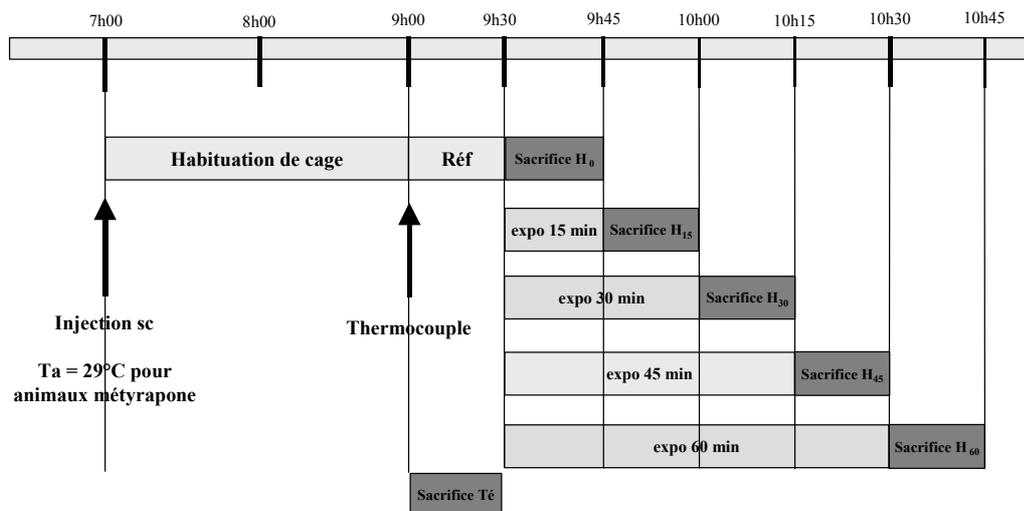


Figure 27 : Chronogramme d'une journée expérimentale

## F. Procédure d'anesthésie à l'halothane

L'anesthésie des animaux est effectuée grâce à l'halothane (Laboratoire Belamont, Paris, France). Le dispositif d'anesthésie se compose d'une cuve à halothane (Ohmeda, Maurepas, France), d'une boîte hermétique dotée d'un couvercle et d'une table de travail avec une arrivée de gaz anesthésiant. Lors de l'extraction de la chambre climatique, l'animal est immédiatement placé dans la boîte hermétique ventilée avec un gaz contenant 4% d'halothane dans 100% d'O<sub>2</sub>. L'anesthésie est acquise en moins d'une demi-minute. L'animal est alors extrait de la cuve et son museau est placé dans un système permettant une ventilation faciale avec le même gaz afin de maintenir l'anesthésie.

## G. Procédure de prélèvement post-mortem

L'animal étant toujours placé dans le système d'anesthésie à l'halothane, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur est exposé. Le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque à vue jusqu'à ex-sanguination. Le sang est stocké dans un tube d'héparinate de lithium et un tube sec, déposés dans la glace en attente de centrifugation (4500 RPM, 4°C, 7 min). Le surnageant est aliquoté puis congelé à -80°C en attente de dosage hormonaux, biochimiques et protéiques. Une partie du sang est également récupérée dans des capillaires afin de mesurer l'hématocrite.

L'animal est ensuite décapité. Le cerveau est clivé par microdissection en zones. Un échantillon de cortex frontal est prélevé, pesé, puis déposé dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de RNAlater (Ambion, Courtaboeuf, France). Il est ensuite placé à 4°C pendant 24 heures avant d'être stocké à -20°C en attente du dosage des ARNm par RT-PCR en temps réel.

## F. Exploitation des données de température

La température rectale ( $T_{re}$ ) est mesurée toutes les 5 secondes au cours de l'expérimentation. Les valeurs sont moyennées sur les 30 min de la période de référence ( $T_{re}$  Ref) et sur les 30 secondes du début ( $T_{re}$  Début) et les 30 secondes de la fin d'exposition à la chaleur ( $T_{re}$  Finales). Les variations de  $T_{re}$  induites par la chaleur sont calculées par la différence entre  $T_{re}$  Finales et  $T_{re}$  Début.

La sévérité de l'hyperthermie est évaluée par la charge thermique correspondant à l'aire sous la courbe de  $T_{re}$  au dessus d'une valeur seuil de  $40,4^{\circ}\text{C}$  ( $AUC_{40,4}$  en  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ ). Cette charge thermique est calculée selon la formule suivante :  $AUC_{40,4} = \Sigma(T_{re} \text{ excédant } 40,4) - 40,4/12$ . Le seuil de  $40,4^{\circ}\text{C}$  représente la température rectale minimale observée pour laquelle un risque de mortalité apparaît dans les 24 heures suivant l'exposition de rats actifs à la chaleur [203]. Un autre point de rupture a été défini par Hubbard : lorsque l' $AUC_{40,4}$  excède les  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ , le risque de mortalité apparaît chez les rats exposés passivement à la chaleur. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la valeur d' $AUC_{40,4}$  de  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$  peut être considérée comme la transition d'un état physiologique régulé à un état pathologique dérégulé.

Puis une deuxième analyse est effectuée afin de mieux cerner les conséquences pathologiques de la chaleur. Pour ce faire, les rats ont été redistribués selon leur charge thermique. La valeur d' $AUC_{40,4}$  de  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$  comme point de clivage des groupes a été choisie car elle correspond, chez les rats passivement exposés à la chaleur, au seuil d'apparition du risque de mortalité dans les 24 heures [203]. Les rats sont ainsi redistribués en quatre groupes : (i) le groupe Contrôle représente la situation physiologique de base, sans stress ; (ii) le groupe  $HL_1$  comprend les rats n'ayant pas été exposés à la chaleur (groupes Injection et  $H_0$ ) ; (iii) le groupe  $HL_2$  comprend les rats exposés à la chaleur avec une hyperthermie modérée, sans risque léthal ( $AUC_{40,4} < 20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ ) et (iv) le groupe  $HL_3$  comprend les rats exposés à la chaleur avec une hyperthermie sévère, avec risque léthal ( $AUC_{40,4} \geq 20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ ).

### ***III. Annexe 3 : matériel et méthodes de l'expérimentation 2 : stress et tolérance à la chaleur***

#### **A. Espèce animale utilisée**

Le rat mâle de type Sprague-Dawley (Iffa Credo) de 250-350 g est choisi en raison d'une abondante littérature scientifique sur cet animal et en raison de son utilisation dans les expérimentations antérieures du laboratoire concernant le coup de chaleur.

#### **B. Conditions d'hébergement des animaux**

La stabulation des animaux se fait dans une animalerie périphérique dédiée aux rats et dont l'ambiance est contrôlée ( $T_a$  :  $22 \pm 1$  °C, humidité relative :  $50 \pm 10$  %, bruit blanc inférieur à 50 db). La nourriture et la boisson sont servies *ad libitum*. Le cycle lumière/obscurité est un rythme de 12 heures avec la lumière à 7 heures.

Ils sont maintenus en animalerie durant au moins 8 jours après réception en vue d'une habitude aux conditions expérimentales et de la structuration sociale. Durant cette phase, les animaux sont pesés tous les matins ouvrés. Ils sont en cage de 3 pour des raisons de structuration sociale : risque de structuration dominant/dominé à 2 par cage (type E5, polypropylène).

#### **C. Procédure d'implantation Dataquest**

Les animaux sont anesthésiés par injection IP de Pentobarbital, à la dose initiale de 100 µl/100 g de poids corporel (60 mg.kg<sup>-1</sup>) suivie éventuellement d'une réinjection toutes les heures de 25 µl/100 g de poids corporel. Une prophylaxie antibiotique est assurée par de l'Extenciline® (60000 ui.kg<sup>-1</sup>, IM) et une couverture analgésique post-opératoire par Finadyne® (0,1 ml / 300 g de rat soit 1 mg/kg, SC) toutes les 48 heures durant 4 jours.

La face ventrale des animaux est rasée puis nettoyée à la Bétadine®. Les capteurs télémétriques sont des capteurs mesurant la température corporelle profonde et l'activité (TA10TAF40). Ces capteurs permettent une acquisition en continu pendant plusieurs semaines après avoir été mis en place chirurgicalement dans la cavité abdominale. Une incision longitudinale de la peau puis de la paroi musculaire abdominale est pratiquée sur 3 cm en suivant la ligne blanche, à partir de 1 cm sous l'appendice xiphoïde. Le corps du capteur est placé dans la cavité abdominale, puis la paroi abdominale est suturée sur deux plans : le plan musculaire avec un fil résorbable monobrin Dec.1.5, la peau avec un fil non résorbable monobrin Dec. 2.0.

Les capteurs sont activés dès la fin de l'opération et les informations de température corporelle profonde et d'activité sont récupérées à raison d'un point toutes les minutes. Elles servent à évaluer la récupération de l'animal : l'apparition de rythme circadien propre d'activité et de température, l'absence de

fièvre signent une récupération correcte. Parallèlement, les animaux seront pesés et la reprise pondérale sera un élément important.

## **D. Groupes et procédure d'exposition à la chaleur**

Quatre-vingt animaux sont randomisés un groupe d'exposition à la chaleur (68 rats,  $T_a = 40^\circ\text{C}$ ) et un groupe Contrôle (12 rats,  $T_a = 22^\circ\text{C}$ ). Les animaux dans leur cage sont transférés dans la chambre climatique pendant 90 min dont la température ambiante a été réglée à  $T_a = 40^\circ\text{C}$  et l'humidité relative à 40-50%. Lors de l'exposition, le biberon d'eau et la nourriture sont retirés de la cage. Une journée d'expérimentation inclut 6 ou 7 animaux. Le premier est transféré dans le caisson à 8h00, puis les autres sont décalés de 20 min chacun. Les animaux témoins restent dans l'animalerie et sont directement amenés dans la pièce de prélèvement entre 9h00 et 11h00 à raison de un par journée d'expérimentation.

## **E. Procédure d'anesthésie à l'halothane**

L'anesthésie des animaux est effectuée grâce à l'halothane (Laboratoire Belamont, Paris, France). Le dispositif d'anesthésie se compose d'une cuve à halothane (Ohmeda, Maurepas, France), d'une boîte hermétique dotée d'un couvercle et d'une table de travail avec une arrivée de gaz anesthésiant. Lors de l'extraction de la chambre climatique, l'animal est immédiatement placé dans la boîte hermétique ventilée avec un gaz contenant 4% d'halothane dans 100% d' $\text{O}_2$ . L'anesthésie est acquise en moins d'une demi-minute. L'animal est alors extrait de la cuve et son museau est placé dans un système permettant une ventilation faciale avec le même gaz afin de maintenir l'anesthésie.

## **F. Procédure de prélèvement post-mortem**

L'animal étant toujours placé dans le système d'anesthésie à l'halothane, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur est exposé. Le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque à vue jusqu'à ex-sanguination. Le sang est stocké dans un tube d'héparinate de lithium, un tube d'EDTA et un tube sec, qui sont déposés dans la glace en attente de centrifugation (4500 RPM,  $4^\circ\text{C}$ , 7 min). Le surnageant est aliquoté puis congelé à  $-80^\circ\text{C}$  en attente de dosage hormonaux, biochimiques et protéiques. Une partie du sang est également récupérée dans des capillaires afin de mesurer l'hématocrite.

L'animal est ensuite décapité. Le cerveau est clivé par microdissection en zones. Un échantillon de cortex frontal, l'hypothalamus médian et l'hypophyse sont prélevés, pesés, puis répartis dans des tubes contenant 500  $\mu\text{L}$  de RNAlater (Ambion, Courtaboeuf, France). Ils sont ensuite placés à  $4^\circ\text{C}$  pendant 24 heures avant d'être stockés à  $-20^\circ\text{C}$  en attente du dosage des ARNm par RT-PCR en temps réel.

## **G. Exploitation des données de température**

Les 80 animaux sont distribués a posteriori en quatre groupes à l'aide d'une méthode statistique de classification (k-moyennes) qui minimise la variabilité intra-groupe et maximise la variabilité inter-groupes

(Statsoft-France, Maison-Alfort, France). La classification est basée sur la variable de  $T_{abd}$  finale car elle représente un bon indice du niveau de tolérance à la chaleur, toutes choses étant par ailleurs égales (durée exposition). Les groupes de rats ainsi formés se composent de la manière suivante : (i) un groupe Contrôle composé des 12 rats exposés à la neutralité, (ii) un groupe Tolérant (Tol, n=30) comprenant les rats exposés au chaud présentant les plus faibles valeurs de  $T_{abd}$  finale, (iii) un groupe Médian (Med, n=24) composé des rats exposés au chaud présentant des valeurs intermédiaires de  $T_{abd}$  finale et (iv) un groupe d'Intolérant (HE, n=14) incluant les rats exposés au chaud ayant atteint les valeurs de  $T_{abd}$  finale les plus élevées.

## ***IV. Annexe 4 : procédures de dosages des ARNm par RT-PCR en temps réel***

### **A. Extraction des ARNm par le MagNApure :**

Les prélèvements cérébraux sont retirés du RNAlater et placés dans une solution tampon RLT (Guanidine Thiocyanate lysis buffer, Qiagen, Courtaboeuf, France) à une concentration de 200 mg.mL<sup>-1</sup>. Après l'ajout de deux billes de carbure de tungstène dans chaque tube, le tissu est broyé à l'aide du broyeur à billes MM300 (Rescht, Haan, Allemagne) pendant 2 minutes à 30 Hz. Les lysats obtenus sont ensuite conservés à -80°C en attente d'extraction d'ARNm.

L'extraction est effectuée par l'automate MagNApure (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un kit d'extraction (Isolation Kit II Tissu) à partir de 40µL de lysat (soit 8 mg de tissu). Un volume d'élution final de 50 µL contenant les ARNm est obtenu.

La transcription inverse (RT) est immédiatement réalisée (Reverse Transcription Core Kit, Eurogentec, Seraing, Belgium) à partir de 4 µL d'ARNm (soit 0,6 mg de tissu) avec 0,5 µL d'Oligo d(I) (50µM) et un inhibiteur de RNase selon les instructions du fournisseur. Les échantillons d'ADNcomplémentaire (ADNc) sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### **B. Dessin des amorces**

Le dessin des amorces est effectué à l'aide du logiciel MacVector Software (Accelrys, San Diego, USA). La spécificité de l'amplification de la PCR est vérifiée par l'analyse de la courbe de fusion (décrite par [378]). Les pics de fusion issues du produit de RT et de l'ADN recombinant spécifique sont identiques. Les amorces sont synthétisées par le laboratoire Eurogentec (Seraing, Belgique). Les séquences ainsi que les conditions de PCR de toutes les amorces utilisées sont récapitulées dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11** : Séquences des amorces utilisées et conditions de PCR

<i>Gène</i>	<i>N° accession Genbank</i>	<i>Séquence amorce 5'-3'</i>	<i>Longueur amplicon (pb)</i>	<i>Température hybridation (°C)</i>
CycA	NM_017101	sens GGCAAATGCTGGACCAAACAC anti-sens CTTCCCAAAGACCACATGCTTG	94	56
HPRT	NM_012583	sens CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC anti-sens GCAGGTGAGCAAAGAAGCTTATAGCC	123	60
$\beta$ -actine	NM_031144	sens TCAGGTCATCACTATCGGCAATG anti-sens TTTTCATGGATGCCACAGGATTC	95	54
Hsp70-1	X77207	sens ACCATCGAGGAGGTGGATTAGAGG anti-sens ACCAGCAGCCATCAAGAGTCTGTGTC	77	62
Hsp70-2	X77208	sens TTTCCCTTGCATGGTGGCTCAC anti-sens TTCACACACTGGGGAACAAGTGC	95	60
IL-1 $\beta$	NM_031512	sens CACCTCTCAAGCAGAGCACAG anti-sens GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	79	58
TNF $\alpha$	NM_012675	sens AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC anti-sens TCTGCTTGGTGGTTTGTCTACGAC	111	58
I $\kappa$ B $\alpha$	XM_343065	sens AGCTGACCCTGGAAAATCTTCAG anti-sens CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG	115	57
MCIP1	NM_153724	sens GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT anti-sens TTGGCCCTGGTCTCACTTTC	80	60
c-fos	NM_022197	sens CGGAGAATCCGAAGGGAAAG anti-sens TGGCAATCTCGGTCTGCAAC	136	55
c-jun	NM_021835	sens CAATGGGCACATCACCCTACAC anti-sens TCTGGCTATGCAGTTCAGCTAGG	122	61
CRF	NM_031019	sens TGGATCTCACCTTCCACCTTCTG anti-sens TTCCTGTTGCTGTGAGCTTGC	85	58
POMC	NM_139326	sens TCACCACGGAAAGCAACCTG anti-sens TTTTCAGTCAAGGGCTGTTTCATCTC	108	57
EGR1	NM_012551	sens CGAGCGAACAACCCTACGA anti-sens CGTTATTTCAGAGCGATGTCAGAA	63	53

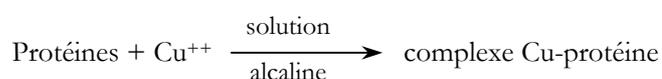
## C. La PCR en temps réel

Les PCR sont réalisées avec le réactif Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ , 0,25  $\mu\text{L}$  de solution d'ADNc (soit 15  $\mu\text{g}$  de tissu) avec une concentration de 4 mM pour le  $\text{MgCl}_2$  et de 0,4  $\mu\text{M}$  pour chaque amorce sont utilisés. Les PCR sont réalisées grâce au thermocycleur Lightcycler (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Après une première phase d'activation de la polymérase à 95°C, 50 cycles d'amplification comportant chacun trois étapes sont réalisées. La dénaturation correspond à la séparation des deux brins d'ADN (20 sec à 95°C). L'anneau ou hybridation correspond à la fixation des amorces sur leur séquence complémentaire (température dépendante de la taille et la composition en bases de l'amorce : 52 à 62°C pendant 5 sec). Enfin, l'élongation correspond à la synthèse des brins d'ADNc (8 sec à 72°C). En fin d'analyse, la phase de fusion permet de vérifier la spécificité du produit amplifié selon les instructions du fournisseur. Les valeurs de cycle de sortie ( $C_p$ ) sont calculées par le logiciel Light Cycler Software v.3.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne), en utilisant la méthode de la dérivée seconde. La quantification est réalisée avec un pool d'échantillons d'ANDc comme calibrateur selon la méthode comparative du cycle seuil (« comparative threshold cycle method ») [292]. Les valeurs relatives d'ARNm sont calculées par le logiciel RelQuant (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). La normalisation est effectuée par la moyenne géométrique d'au moins trois gènes de contrôle validés pour chaque expérimentation [493].

## V. Annexe 5 : procédures de dosages sanguins

### A. Protéines totales

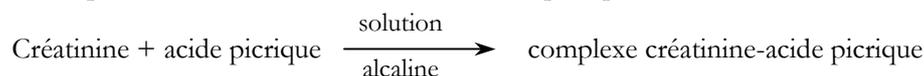
La détermination quantitative des protéines totales est effectuée sur du plasma recueilli sur héparine à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par la méthode colorimétrique du Biuret. Un réactif témoin composé de soude et de tartrate de potassium et de sodium est ajouté à l'échantillon. Puis on ajoute le réactif du biuret composé de soude, tartrate de potassium et de sodium, iodure de potassium et sulfate de cuivre. Les ions cuivriques réagissent en solution alcaline avec les liaisons peptidiques des protéines avec formation d'un complexe pourpre caractéristique. Le tartrate de potassium et de sodium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium empêche l'auto réduction du cuivre.



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en protéines et est mesurée par spectrophotométrie.

### B. Créatinine

La détermination quantitative de la créatinine est effectuée sur du plasma recueilli sur héparine à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par la méthode de Jaffé en cinétique compensée. Un premier réactif (soude) est ajouté à l'échantillon. Puis la réaction est déclenchée par l'addition d'un second réactif (acide picrique).



En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe jaune orangé. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en créatinine et est mesurée par spectrophotométrie.

### C. Albumine

La détermination quantitative de l'albumine est effectuée sur du plasma recueilli sur héparine à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par la méthode au vert de bromocrésol (BCG, « bromocresol green »). Un premier réactif tampon (citrate) est ajouté à l'échantillon. Puis la réaction est déclenchée par l'addition d'un second réactif composé de citrate et de vert de bromocrésol. A un pH de 4,1, l'albumine présente un caractère suffisamment cationique pour se combiner avec le BCG pour former un complexe bleu-vert.



L'intensité de la coloration bleu-vert développée est directement proportionnelle à la concentration de l'albumine et est mesurée par spectrophotométrie.

## D. Lactate

La détermination quantitative est effectuée sur du plasma recueilli sur EDTA à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par une méthode enzymatique. Le L-lactate est oxydé par l'oxydase lactique (LOD), enzyme spécifique, pour former du pyruvate.



En présence d'un chromogène, le peroxyde d'hydrogène formé est transformé sous l'action d'une peroxydase (POD) en produit de réaction coloré dont on mesure l'absorbance.



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de L-lactate.

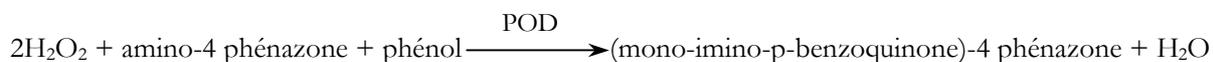
Les solutions de travail sont composées pour la première de donneur hydrogène, oxydase d'ascorbate et tampon et pour la seconde de 4-aminoantipyrine, LOD, POD et tampon.

## E. Glucose

La détermination quantitative du glucose dans le plasma (recueilli sur héparine) est effectuée à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par un test colorimétrique enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition du réactif composé de tampon phosphate, POD, amino-4 phénazone et phénol. En présence de glucose-oxydase (GOD) le glucose est oxydé par l'oxygène de l'air en gluconolactone :



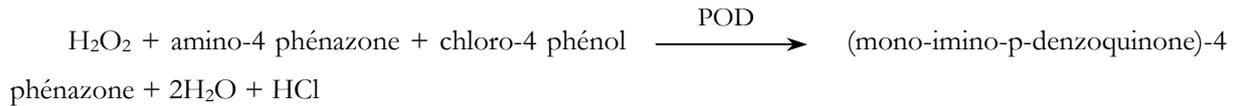
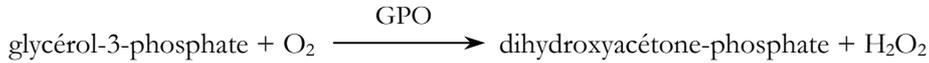
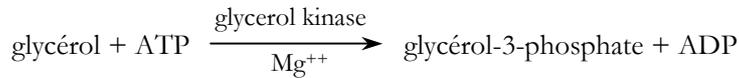
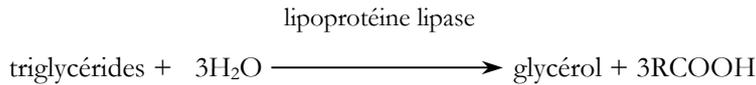
Le peroxyde d'hydrogène formée réagit, dans une réaction catalysée par la POD, avec l' amino-4 phénazone et le phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge :



L'intensité de la coloration développée, directement proportionnelle à la concentration en glucose, est mesurée par spectrophotométrie.

## F. Triglycérides

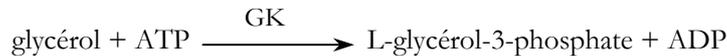
La détermination quantitative des triglycérides dans le plasma (recueilli sur héparine) est effectuée à l'aide d'un analyseur automatique Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Meylan, France) par un test colorimétrique enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'un réactif composé de tampon, chloro-4 phénol et enzymes dans l'échantillon :



L'hydrolyse rapide et complète des tryglycérides en glycérol et acides gras est obtenue par une lipoprotéine-lipase de micro-organismes. Le glycérol formé est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate, puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation de peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase le peroxyde d'hydrogène réagit, dans une réaction selon Trinder, avec l'amino-4 phénazone et le chloro-4 phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge. L'absorbance est déterminé en point final.

## G. Glycérol

La détermination quantitative du glycérol dans le plasma (recueilli sur EDTA) est effectuée par une méthode enzymatique colorimétrique (kit de Diffchamb, Lyon, France) dont le principe repose sur les réactions suivantes :



## H. Corticostérone plasmatique

La détermination quantitative de la corticostérone plasmatique (recueilli sur héparine) est effectuée par radio-immuno-assay (RIA) à l'aide d'un kit ( $^{125}\text{I}$  RIA kit, ICN Biomedicals, Strasbourg, France). La technique de RIA consiste à doser la corticostérone par liaison compétitive d'anticorps spécifiques anti-corticostérone. Une quantité connue de corticostérone marquée à  $^{125}\text{I}$  est ajoutée à l'échantillon de plasma. Puis une quantité connue d'anticorps spécifiques anti-corticostérone est ajoutée. Les anticorps

vont d'abord se fixer sur la corticostérone non marquée puis, s'il reste des anticorps libres, sur la corticostérone marquée. Après centrifugation, la radioactivité présente dans le culot contenant les complexes corticostérone-anticorps et corticostérone marquée-anticorps est déterminée à l'aide d'un compteur gamma.

## **I. ACTH plasmatique**

La détermination quantitative de l'ACTH plasmatique (recueilli sur EDTA) est effectuée par radio-immuno-assay (RIA) à l'aide d'un kit ( $^{125}\text{I}$  RIA kit, MP Diagnostics, Illekirch, France). Le principe de la technique est identique au dosage de la corticostérone plasmatique.

## **J. Interleukine-1 $\beta$**

La détermination quantitative de l'IL-1 $\beta$  dans le plasma (recueilli sur héparine dans la manip 2 et sur sérum dans la manip 3) est effectuée par la technique sandwich immuno-assay à l'aide d'un kit ELISA (Quantinine, Rat IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Immunoassay, R&D Systems Europe, Lille, France). Cette technique consiste à incuber les échantillons avec des anticorps polyclonaux spécifiques de l'IL-1 $\beta$  rat. Après lavage, un second anticorps polyclonal spécifique de l'IL-1 $\beta$  rat lié à une enzyme est ajouté. Après un second lavage, l'addition d'une solution de substrat conduit à une réaction enzymatique de couleur bleue virant au jaune après l'addition d'une solution stoppant la réaction. L'intensité de la couleur mesurée est proportionnelle à la quantité d'IL-1 $\beta$  liée lors de la première étape. La concentration plasmatique de l'IL-1 $\beta$  est exprimée en  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

## **K. Evaluation de l'hématocrite**

Le sang prélevé sur tube à hématocrite (Haematokrit Kapillaren, Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Allemagne) est centrifugé (5 min à 12000 rpm à la  $T_a$ ). La lecture se fait sur une plaque de lecture spécifique. L'hématocrite est exprimée en % de globules rouges.

## RESUME

---

Le coup de chaleur est une pathologie grave sans thérapeutique spécifique. Les animaux en coup de chaleur souffrent d'une inflammation accompagnée d'un déséquilibre métabolique en dépit de l'induction de « heat shock proteins » (Hsp70) et de la sécrétion de glucocorticoïdes. Le rôle relatif des ARNm Hsp70 et des glucocorticoïdes dans la tolérance à la chaleur est analysé. Les animaux vigiles intolérants à la chaleur présentent : une hyperthermie et une déshydratation sévères, un déséquilibre métabolique, une moindre sécrétion de glucocorticoïdes, des signes d'hyperactivation et d'agression cellulaires ainsi qu'une activation des processus inflammatoires. L'expression des ARNm Hsp70 est dépendante de l'intensité de l'agression et apparaît comme un mécanisme suiveur. Les glucocorticoïdes sont impliqués dans la tolérance en réduisant le développement des processus inflammatoires locaux et en favorisant l'expression des ARNm du facteur inhibiteur  $\alpha$ B $\alpha$  (I $\alpha$ B $\alpha$ ).

---

Mechanisms of heat vulnerability : involvement of systemic and cellular stress

---

Heat stroke is a serious illness without specific treatment. Heat stroked animals exhibit inflammatory processes accompanied by metabolic imbalance. These impairments take place despite of heat shock proteins (Hsp70) induction and glucocorticoid secretion. The role of Hsp70 mRNA and glucocorticoids in heat tolerance has been analyzed. Vigil animals intolerant to heat present: severe hyperthermia and dehydration, metabolic imbalance, lesser glucocorticoid production, signs of cellular hyperactivation and aggression, activation of inflammatory processes. The Hsp70 mRNA expression depends on the intensity of the stressor and appears, in the chain of causality, as a consequence of the heat aggression. Glucocorticoids are involved in tolerance by reducing local inflammatory processes and favouring the expression of the inhibitory factor  $\alpha$ B $\alpha$  (I $\alpha$ B $\alpha$ ) mRNA.

---

DISCIPLINE : Neurosciences

---

MOTS-CLES : Coup de chaleur, tolérance à la chaleur, hyperthermie, protéine de choc thermique, glucocorticoïdes, cytokines, stress ; Heat stroke, heat tolerance, hyperthermia, Heat shock protein, glucocorticoids, cytokines, stress

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Pôle de Neurophysiologie du Stress – Département des Facteurs Humains

Centre de recherches du Service de santé des armées « Emile Pardé »

24 avenue des Maquis du Grésivaudan

38702 La tronche Cedex