



Université de Montréal

**Analyse de l'activité neuronale dans le ganglion stellaire  
en relation avec la fonction cardiaque**

par

Brigitte Maillet

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en physiologie

Mai, 2010

©Brigitte Maillet, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyse de l'activité neuronale dans le ganglion stellaire en relation avec la fonction  
cardiaque

présenté par :  
Brigitte Maillet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Billette, président-rapporteur  
Alain Vinet, directeur de recherche  
Éric Beaumont, membre du jury

## Résumé

Quatre microélectrodes ont été insérées dans le ganglion stellaire gauche (GS) de préparations canines in vivo pour évaluer la décharge des potentiels d'action dans les neurones situés dans ce ganglion périphérique durant un état cardiovasculaire stable et suivant des injections systémiques et locales de nicotine. Durant les périodes de contrôle, des changements mineurs ont été observés dans la pression artérielle systolique, dans le rythme cardiaque et dans le temps de conduction atrio-ventriculaire. L'activité générée par les neurones du GS est demeurée relativement constante à l'intérieure de chaque chien, mais variait entre les préparations. L'administration de nicotine systémique a altéré les variables physiologiques et augmenté l'activité neuronale. Même si différents changements au niveau des variables physiologiques ont été observés entre les animaux, ces changements demeuraient relativement constants pour un même animal. La dynamique de la réponse neuronale était similaire, mais l'amplitude et la durée variaient entre et au sein des chiens. L'injection de nicotine dans une artère à proximité du GS a provoqué une augmentation marquée des potentiels d'action sans faire changer les variables physiologiques. La technique d'enregistrement permet donc de suivre le comportement de multiples populations de neurones intrathoraciques situés dans le GS. La relation entre l'activation neuronale du GS et les changements physiologiques sont stables pour chaque chien, mais varient entre les animaux. Cela suggère que le poids relatif des boucles de rétroaction impliquées dans la régulation cardiovasculaire peut être une caractéristique propre à chaque animal.

**Mots-clés** : Système nerveux autonome cardiaque, ganglion stellaire, neurones

## **Abstract**

Four micro-electrodes were inserted in the left stellate ganglion (SG) of in vivo canine preparations to evaluate the firing of neuronal somata located in this peripheral ganglion during stable cardiovascular state and following local and systemic injection of nicotine. During control periods, minor changes were observed in systolic arterial pressure, the heart rhythm and the atrioventricular conduction time. The activity generated by SG neurons remained relatively constant within each dog, but the firing rate was variable among the preparations. Systemic nicotine administration altered the physiological variables and increased the neuronal activity. Although different patterns of physiological changes were observed among the preparations, it remained invariant upon successive injections in each animal. The behaviour of the neuronal response was similar but varies in amplitude and duration both within and between the dogs. Local injections of nicotine in an artery close to the SG induced a brief and huge burst of neuronal firing, but did not influence the physiological response. The recording technique thus permit to follow the behaviour of multiple intrathoracic neuronal populations located in the SG. The relation between the SG firing and the physiological changes is stable in each dog, but differed between the animals. It suggests that the weight of the different feedback loops involved in the cardiovascular regulation might be a characteristic feature of each animal and/or the position of the electrodes in the SG is critical, since different neuronal populations are present and could react differently.

**Key Words:** Autonomic cardiac nervous system, stellate ganglion, neurons

## Table des matières

|   |      |
|---|------|
| Résumé.....   | iii  |
| Abstract.....   | iv   |
| Table des matières.....   | v    |
| Liste des tableaux.....   | vii  |
| Liste des figures.....  | viii |
| Liste des Abréviations.....   | x    |
| Remerciements.....  | xiii |
| Introduction.....   | 1    |
| Chapitre 1 - Le contrôle nerveux du cœur.....                                 | 2    |
| 1.1 <i>Physiologie</i> .....  | 2    |
| 1.2 <i>Le système nerveux parasympathique</i> .....                           | 4    |
| 1.3 <i>Système nerveux sympathique</i> .....                                  | 7    |
| 1.4 <i>Système nerveux cardiaque intrinsèque</i> .....                        | 8    |
| 1.5 <i>Nicotine</i> .....   | 12   |
| Chapitre 2 - Mécanismes régulateurs.....                                      | 14   |
| 2.1 <i>Le baroréflexe</i> .....   | 16   |
| 2.2 <i>La respiration</i> .....   | 17   |
| 2.3 <i>Analyse spectrale</i> .....  | 19   |
| Chapitre 3 - Propagation électrique.....                                      | 21   |
| 3.1 <i>Propagation dans les nerfs</i> .....                                   | 21   |
| 3.2 <i>Structures impliquées dans la propagation électrique du cœur</i> ..... | 25   |
| Chapitre 4 - Les ganglions sympathiques.....                                  | 26   |
| 4.1 <i>Le ganglion stellaire</i> .....  | 26   |
| 4.1.1    Anatomie.....  | 26   |
| 4.1.2    Développement.....   | 27   |
| 4.1.3    Contenu en neurotransmetteur.....                                    | 28   |
| 4.1.4    Localisation des corps cellulaires et innervation du cœur.....       | 29   |
| 4.2 <i>Le ganglion cervical médian</i> .....                                  | 31   |
| <i>Contribution de l'étudiante à l'article</i> .....                          | 33   |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Chapitre 5 - Article.....       | 34 |
| 5.1 Abstract.....               | 35 |
| 5.2 Introduction.....           | 36 |
| 5.3 Methods.....                | 39 |
| 5.4 Results.....                | 43 |
| 5.5 Discussion.....             | 49 |
| 5.6 Conclusion.....             | 54 |
| 5.7 Bibliography.....           | 55 |
| 5.8 Legend.....                 | 62 |
| 5.9 Tables and figures.....     | 65 |
| Chapitre 6 - Discussion.....    | 80 |
| Chapitre 7 - Conclusion.....    | 90 |
| Chapitre 8 - Bibliographie..... | 91 |

## Liste des tableaux

### Chapitre 5 - Article

Table I : Mean values and standard deviation of the heart rhythm (AA), systolic pressure (SP) and atrio-ventricular conduction time (AV) in the control period at the beginning of each repetition of the protocol (P1 to P3). (Chapitre 5.9)

Table II : Firing of the stellate ganglion during the control periods of P1 to P3 for each dog. (Chapitre 5.9)

Table III : Mean and standard deviation ( $\sigma$ ) of the characteristics of the response to systemic nicotine injection in each repetition of the protocol, from P1 to P3. (Chapitre 5.9)

Table IV : Mean value and standard deviation of the characteristic of neural response for each local nicotine injection. (Chapitre 5.9)

Table V : Value of maximum ( $\Delta SF_{max}$ ) increase of SF for each dog and each injection. (Chapitre 5.9)

Table VI : Value of relative ( $\Delta SF_{max} / \text{mean firing before injection}$ ) increase of SF for each dog and each injection. (Chapitre 5.9)



## Liste des figures

### Chapitre 1 - Le contrôle nerveux du cœur

Figure 1 : Division du système nerveux (Chapitre 1.1)

Figure 2 : Schéma de l'innervation cardiaque par les voies sympathiques et parasymphathiques (Chapitre 1.2)

Figure 3 : Système nerveux cardiaque intrinsèque (Chapitre 1.4)

Figure 4: Vision classique du système nerveux cardiaque (Chapitre 1.4)

### Chapitre 2 - Mécanismes régulateurs

Figure 5 : Différentes boucles de contrôle pouvant induire des oscillations du rythme cardiaque (Chapitre 2.2)

### Chapitre 3 - Propagation électrique

Figure 6 : Anatomie du neurone (Chapitre 3.1)

Figure 7 : Propagation du potentiel d'action (Chapitre 3.1)

### Chapitre 4 - Les ganglions sympathiques

Figure 8 : Représentation in vivo de l'innervation du ganglion stellaire et du CGM ici nommé « caudal cervical ganglion » (Chapitre 4.1.1)

Figure 9 : Innervation du ganglion stellaire et du GCM (Chapitre 4.1.1)

Figure 10 : Coloration d'un ganglion stellaire de souris (Chapitre 4.1.3)

### Chapitre 5 - Article

Figure 1 : Change of the mean and standard deviation of AA, SP and AV during control periods.

Figure 2 : Correlation between the mean control values and the standard deviations of SP, AA and AV during control periods.

Figure 3 : Correlation of mean SF with the mean and standard deviations of SP, AA and AV for the control periods.

Figure 4 : Time course of the response following a systemic injection of nicotine for two dogs.

Figure 5 : Dog neuronal reactions to systemic injections of nicotine.

Figure 6 : Relations between physiological data and SF firing responses of dogs following systemic nicotine injections.

Figure 7 : Time course of the response following a local injection of nicotine for 2 dogs

## Liste des Abréviations

|         |   |
|---------|---|
| AA :    | Atrial Activation                                 |
| AF :    | Atrial Fibrillation                               |
| ANOVA : | Analysis Of Variance                              |
| AV :    | Auriculo-Ventriculaire                            |
| BNC :   | Bayonet Neill-Concelman                           |
| CANS :  | Cardiac Autonomous Nervous System                 |
| CGM :   | Ganglion Cervical Moyen                           |
| CNS :   | Central Nervous System                            |
| CV :    | Cardiovascular                                    |
| ECG :   | Electrocardiogram                                 |
| EMBS :  | Engineering in Medicine and Biology Society       |
| FFT :   | Fast Fourier Transform                            |
| GCM :   | Ganglion Cervical Moyen                           |
| GS :    | Ganglion Stellaire                                |
| HF :    | High Frequency                                    |
| IEEE :  | Institute of Electrical and Electronics Engineers |
| LF :    | Low Frequency                                     |
| MCG :   | Middle Cervical Ganglion                          |
| mmHg :  | Millimètre de Mercure                             |
| MPA :   | Multi-Parameter Analyzer                          |
| NPY :   | Neuropeptide Y                                    |
| NTS :   | Noyau du Tractus Solitarius                       |
| PPSE :  | Potentiels Post Synaptiques Excitateurs           |
| PPSI :  | Potentiels Post Synaptiques Inhibiteurs           |
| RAGP :  | Right Atrial Ganglion Plexus                      |
| SF :    | Stellate ganglion neuronal Firing rate            |
| SG :    | Stellate Ganglion                                 |
| SN :    | Système Nerveux                                   |
| SP :    | Systolic Pressure                                 |

STD : Standard Deviation  
USA : United States of America  
VLF : Very Low Frequency

*À ma famille, mon mari et Polochon qui  
m'encourage de ses petits coups de pieds*

## Remerciements

Je voudrais commencer par remercier mon directeur de recherche pour m'avoir guider avec patience dans des sentiers qui n'ont pas toujours été ceux que j'aurais empruntés. J'ai beaucoup appris au cours des deux dernières années dans des domaines que je n'aurais jamais pensé connaître.

J'aimerais remercier Dr. Armour pour sa disponibilité, son attitude positive et pour son amour de la recherche. Sa présence m'a permis d'apprendre à relativiser les difficultés fréquentes rencontrées en recherche. De plus, ses connaissances très pointues ont été très appréciées.

Ce mémoire ne pourrait pas exister sans le grand savoir faire de la technicienne en santé animale Caroline qui est une chirurgienne canine hors pair toujours prête à faire son possible pour rendre nos nouveaux protocoles possibles. Merci aussi à Michel qui était toujours prêt à m'aider aux meilleurs de ses connaissances.

Merci à mon collègue Simon Dubeau qui a hérité d'un rôle de tutorat tant au niveau de la préparation des expériences que de l'analyse des données. Merci aussi à mes collègues Georgeta Sas, Marie Lordkipanidzé, Louis-Philippe Richer et Feng Xiong pour leur support et leur présence quotidienne.

Finalement, merci à mon mari, ma mère, mon père, ma sœur et mon frère qui ont cru en moi et m'ont encouragée à persévérer. Merci de m'avoir donnée l'envie de vous rendre fier et d'être fière de moi.

## **Introduction**

L'étude qui suit porte sur l'activité neuronale du ganglion stellaire gauche. Les quatre premiers chapitres prépareront au chapitre cinq qui présente sous forme d'article les résultats de notre étude. Comme ce ganglion est considéré comme une structure du système nerveux sympathique cardiaque, les contrôles nerveux du cœur seront brièvement abordés. Les deux théories du contrôle nerveux cardiaque, soit celle dite classique et celle du système nerveux cardiaque intrinsèque, seront expliquées. De plus, d'autres mécanismes régulateurs qui influencent la fonction cardiaque comme le baroréflexe et la respiration seront discutés. Il sera par la suite question de la propagation électrique dans les nerfs qui nous permet d'effectuer des enregistrements de potentiels extracellulaires avec des microélectrodes de tungstène. L'anatomie, le développement ainsi que les caractéristiques neuronales du ganglion stellaire seront explorés. Finalement, il y aura un bref aperçu du ganglion cervical médian qui est une structure reliée au ganglion stellaire et qui est d'intérêt pour de futures recherches.

L'article lui-même porte sur l'enregistrement de l'activité neuronal dans le ganglion stellaire gauche en période de contrôle et suite à l'injection de nicotine systémique et locale. L'hypothèse de travail est qu'il est possible d'enregistrer des potentiels extracellulaires dans le ganglion stellaire en période de contrôle et de moduler cette activité suite à l'ajout de nicotine. De plus, ces enregistrements sont stables tout au long des répétitions du protocole, ce qui nous permettrait de le complexifier dans le futur.

# Chapitre 1 - Le contrôle nerveux du cœur

## *1.1 Physiologie*

Le cœur est un organe ayant un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie du corps humain. En effet, le cœur fait circuler le sang à travers l'organisme et procure ainsi aux cellules les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur bon fonctionnement tout en rendant possible l'élimination des déchets. Le cœur doit pouvoir s'adapter à différentes situations pour répondre aux besoins spécifiques des tissus de l'organisme. Ces changements sont notamment gérés par le système nerveux autonome. Le système nerveux autonome porte son nom par opposition au système nerveux volontaire innervant les muscles squelettiques dont le mouvement est un acte conscient. Le système nerveux autonome est contrôlé principalement par l'hypothalamus et se subdivise en deux branches innervant tous les muscles lisses et le cœur.

Les deux branches du système nerveux autonome sont appelées le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique (Figure 1). Le système nerveux sympathique est mis à contribution lors des situations de stress et entraîne notamment une augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Le système nerveux parasympathique est caractéristique des situations de repos et favorise l'économie d'énergie. Les deux systèmes ont donc des effets antagonistes et agissent constamment de concert afin d'optimiser le fonctionnement de chaque organe dans une situation donnée.



Le système nerveux autonome comprend une composante centrale et une composante périphérique. Le système nerveux central comprend l'encéphale et la moelle épinière alors que le système nerveux périphérique comprend les nerfs émergeant de la moelle pour innerver les organes ainsi que les afférences sensibles. Ces dernières acheminent l'information sensitive vers le système nerveux central et l'information circule donc à contresens de la voie motrice ou efférente. Les cellules de soutien, les cellules gliales, varient entre les deux systèmes. Ainsi, les astrocytes et les oligodendrocytes sont les cellules gliales du système central et les cellules de Schwann et les cellules satellites celles du système périphérique.

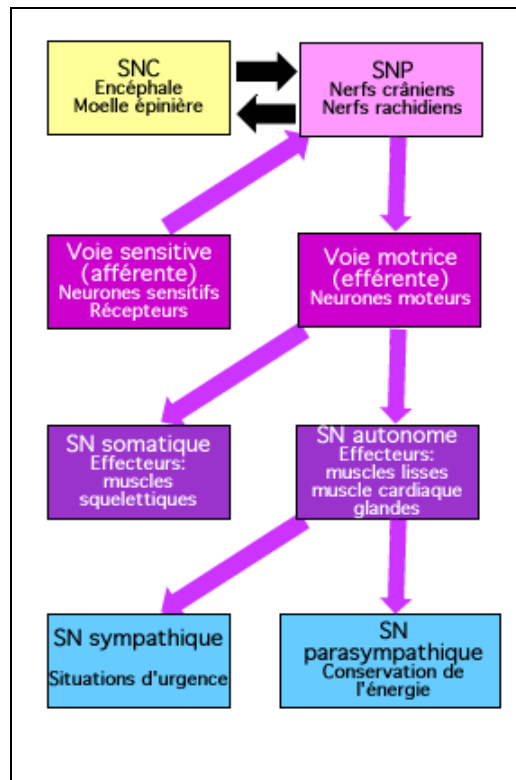


Figure 1 : Division du système nerveux

([http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/neurologie/Div\\_SN.gif](http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/neurologie/Div_SN.gif)) (visité le 14/07/08)

## ***1.2 Le système nerveux parasympathique***

Le contrôle parasympathique provient en grande partie du bulbe rachidien (Figure 2). On estime qu'environ 75% de l'innervation parasympathique, dont celle du cœur, est transmise par le nerf X ou nerf vague (Purves 2004). Le nerf vague synapse ensuite dans des ganglions entre le point de départ du signal et l'organe cible. Le système nerveux autonome est caractérisé par la présence de ganglions qui jouent le rôle de relais nerveux. Les ganglions où les synapses se retrouvent sont situés directement sur les organes qu'ils innervent, donc sur le cœur dans le cas qui nous intéresse. On les retrouve principalement près du nœud auriculo-ventriculaire qui est innervé majoritairement par le nerf vague gauche et du nœud sinusal innervé principalement par le nerf vague droit. Il y a aussi d'autres ganglions distribués sur l'ensemble de l'organe (Purves 2004).

Les nerfs du système nerveux parasympathique sont généralement plus longs que ceux du système sympathique puisqu'il n'y a pas de relais entre le système nerveux central et l'organe cible. De plus, il semblerait que les ganglions cardiaques soient un lieu d'interaction entre les deux branches du système nerveux. Ils ne seraient donc pas strictement parasympathique (Randall 2003).

Le neurotransmetteur du système nerveux parasympathique est l'acétylcholine, tant au niveau pré-synaptique qu'au niveau post-synaptique. Il a deux types de récepteurs soit les récepteurs muscariniques et nicotiniques. Les récepteurs nicotiniques se subdivisent en deux : les Nm présents à la jonction neuromusculaire et les Nn présents au niveau de ganglions du système nerveux autonome et de la médullosurrénale pour permettre la

relâche des catécholamines. Les récepteurs muscariniques sont les suivants : les M1 présents sur les cellules nerveuses, les M2 et M3 présents sur le cœur et les muscles lisses et les M4 présents sur les glandes et les muscles lisses.

En ce qui concerne spécifiquement le cœur, le système nerveux parasympathique diminue l'activité cardiaque et, dans certaines conditions plus rares, il peut aussi diminuer la force de contraction. La fréquence de l'activité du nœud sinusal est diminuée de même que la vitesse de conduction à l'intérieur du nœud auriculo-ventriculaire. Cette inhibition est le résultat de l'hyperpolarisation causée par la fuite de potassium par les canaux K<sub>ACh</sub> stimulés par l'acétylcholine. Une autre voie, plus lente, qui agit via l'hydrolyse de l'AMPc, a pour effet de diminuer le courant lent de calcium et de contribuer à la bradycardie. Sur le nœud AV, la stimulation vagale a un effet dromotrope négatif; la diminution de la vitesse de conduction dépend de la fréquence d'activation imposée au nœud AV. L'effet dromotrope négatif est plus important quand la fréquence d'activation est plus élevée. Les effets du système nerveux contrôlés par le nerf vague sont très rapides. Par contre, cette action est de courte durée puisque l'acétylcholine est très vite hydrolysée. Par son effet sur les muscles lisses, l'acétylcholine a aussi pour effet de réduire légèrement la résistance périphérique (Purves 2004).

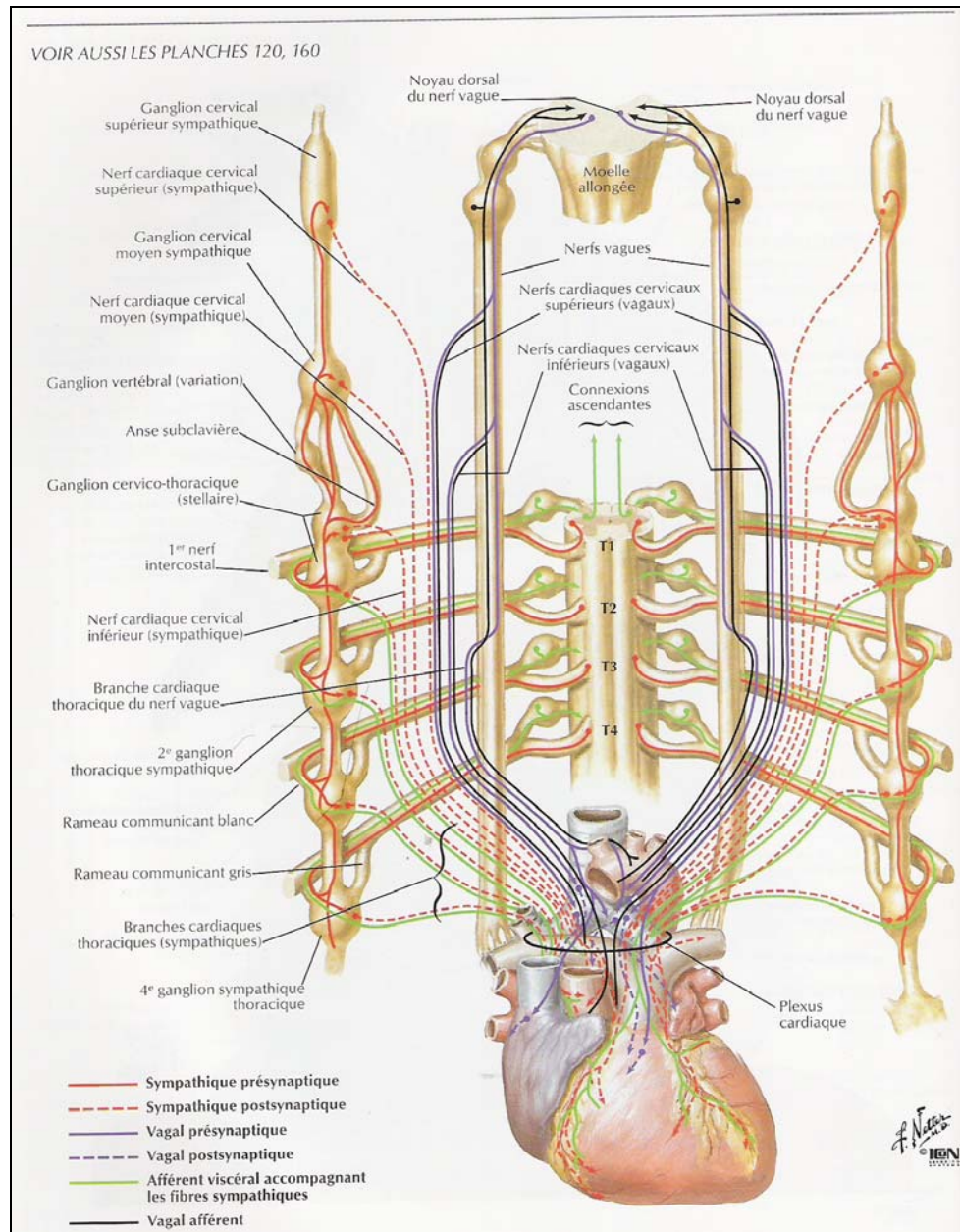


Figure 2 : Schéma de l'innervation cardiaque par les voies sympathiques et parasympathiques

(Netter, planche 223)

### ***1.3 Système nerveux sympathique***

L'innervation sympathique du cœur a également pour point de départ le bulbe rachidien, mais son parcours jusqu'à l'organe cible est beaucoup plus complexe puisqu'il inclut des synapses au niveau de la moelle épinière, des deux derniers segments cervicaux et des six premiers segments thoraciques. Le côté droit du système a un rôle déterminant dans la modulation du rythme cardiaque et de la force de contraction. Le côté gauche module également la force de contraction. Le système nerveux sympathique est composé d'une multitude de ganglions dont les ganglions cervicaux supérieurs et médians ainsi que des ganglions stellaires. Dans la vision classique, ces ganglions contiennent seulement des efférents et ne sont que des points de relais du système nerveux autonome.

Les neurotransmetteurs du système nerveux sympathique sont l'acétylcholine au niveau pré-synaptique et la norépinéphrine et l'épinéphrine au niveau post-synaptique. La norépinéphrine et l'épinéphrine sont aussi les catécholamines synthétisées dans la médullosurrénale. Sur le cœur, il y a deux catégories de récepteurs à ces hormones : les récepteurs alpha et les récepteurs bêta. Les récepteurs alpha se divisent en alpha-1 et alpha-2 qui sont présents sur les muscles lisses et le cœur. Ils sont principalement responsables de la vasoconstriction déclenchée par le relâchement d'épinéphrine qui a pour effet d'augmenter la pression. Les récepteurs de type bêta sont répartis en trois groupes : les bêta-1 situés sur le cœur, les bêta-2 retrouvés sur le cœur, les bronches, les vaisseaux et les muscles lisses ainsi que les bêta-3 présents sur le cœur et les vaisseaux. Ensemble, les bêta-récepteurs sont responsables de l'augmentation de la force de contraction du cœur suite à la relâche de norépinéphrine et de l'accélération du rythme cardiaque.

Il a aussi été suggéré qu'en plus des mécanismes synaptiques classiques cholinergiques et nicotiniques, d'autres mécanismes synaptiques puissent être présents dans des ganglions sympathiques, comme les mécanismes peptidergiques qui sont impliqués dans la régulation cardiorespiratoire (Armour 1987).

Le cœur est influencé par les catécholamines de multiples façons principalement via les récepteurs bêta-adrénergiques. En effet, suite à la stimulation du système nerveux sympathique, la force de contraction, l'activité du nœud sinusal, la vitesse de conduction dans les fibres de Purkinje et dans le nœud auriculo-ventriculaires augmentent. Suite à la stimulation du récepteur bêta-1 adrénergiques, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire entraîne une hausse de la concentration de calcium qui entraîne un accroissement de la contraction musculaire. La réponse est plus lente que pour le système parasympathique puisqu'en plus du nombre accru de relais, les neurotransmetteurs agissent via une cascade de signalisation impliquant des protéines G. Les neurotransmetteurs sont ensuite recapturés en grande partie par les terminaisons nerveuses ; l'effet est donc plus graduel et plus long que pour le système nerveux parasympathique.

#### ***1.4 Système nerveux cardiaque intrinsèque***

L'interaction entre les deux branches du système nerveux est beaucoup plus complexe qu'une simple addition des deux systèmes pour obtenir une réponse donnée. Deux types d'interaction connus depuis plusieurs années en sont un bon exemple. Le

premier type est l'antagoniste accentué. Il décrit le fait que la réduction absolue du rythme suite à une stimulation du nerf vague est plus importante si le rythme basal avant la stimulation était augmenté par une stimulation tonique du système sympathique. Ces réponses sont en partie dues aux neurotransmetteurs. En effet, les effets de l'acétylcholine sont amplifiés par la présence de norépinéphrine. L'acétylcholine a un effet inhibiteur sur la glycolyse déclenchée par les catécholamines et fait donc diminuer la formation d'AMPc. Sans l'AMPc, la noradrénaline ne peut avoir d'effet sur le cœur via sa cascade de signalisation habituelle. L'inverse est aussi vrai, c'est-à-dire que si le système parasympathique est légèrement stimulé, la stimulation du système sympathique produira une augmentation plus importante du rythme cardiaque (Levy 1971). Le second type de réponse est l'excitation réciproque. Par exemple, la stimulation vagale ou l'injection d'acétylcholine peut entraîner une réponse chronotrope ou inotrope positive. Cela est dû en partie à la présence de fibre sympathique dans le complexe vagosympathique (Levy 1971).

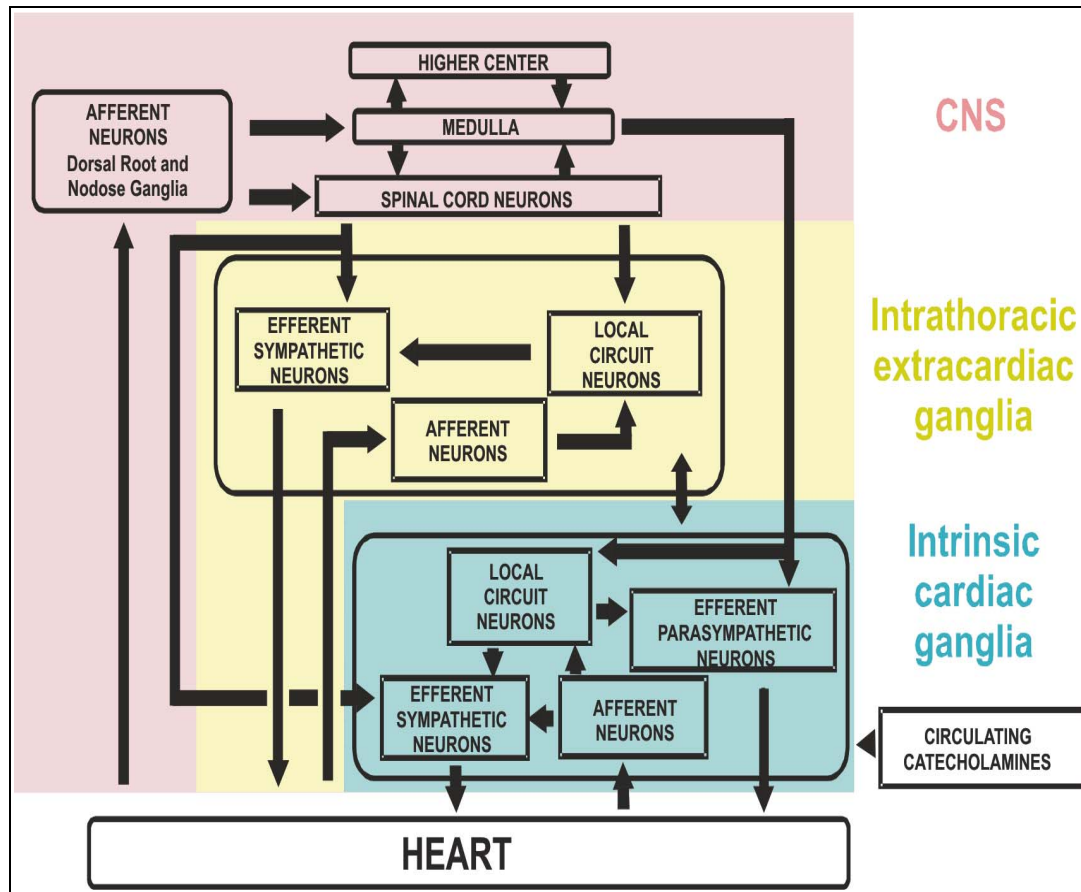


Figure 3 : Système nerveux cardiaque intrinsèque

(Armour 2007)

Le système nerveux cardiaque intrinsèque (Figure 3) est à ce jour très peu connu et son existence est encore contestée. En effet, dans la vision classique, les ganglions sont perçus comme de simples relais et non comme des centres d'intégration (Figure 4). Les systèmes nerveux sympathique et parasympathique interagiraient donc seulement au niveau de l'organe cible par la sécrétion de neurotransmetteurs et au niveau central. Par contre, les évidences anatomiques confirment la présence d'afférents et d'efférents dans les ganglions cardiaques (Thompson 2000). Ainsi, il s'agirait plutôt d'un lieu où il y a un traitement de l'information impliquant des neurones efférents, des afférents et des interneurones. Les



interneurones se retrouvent seulement dans les ganglions où ils feraient le lien entre deux ou plusieurs neurones. Cette constatation est valable autant pour les ganglions sympathiques que pour les ganglions parasympathiques. Par exemple, les ganglions stellaires contiennent un grand nombre d'interneurones et d'afférences sympathiques provenant entre autre du cœur.

Selon ce nouveau point de vue, il faudrait donc tenir compte des différents types de neurones présents dans les ganglions. Les nerfs efférents en provenance des centres supérieurs transmettent des commandes qui pourraient être modifiées par les informations en provenance du cœur qui arrivent par les nerfs afférents (Thompson 2000). Les interneurones serviraient de centre de convergence des efférences et des afférences, et pourraient modifier la régulation cardiaque (Yuan 1994). Le rôle des ganglions ne se résumerait pas à celui de simples relais; il impliquerait aussi une intégration des informations. Plusieurs ganglions de divers niveaux hiérarchiques seraient impliqués dans cette intégration, soit les ganglions extracardiaques comme le ganglion cervical moyen (GCM) et le ganglion stellaire ainsi que des ganglions cardiaques intrinsèques comme le plexus ganglionnaire de l'oreillette droite. Ces deux termes sont définis en anglais par «middle cervical ganglion» (MCG) et «right atrial ganglion plexus» (RAGP) (Thompson 2000).

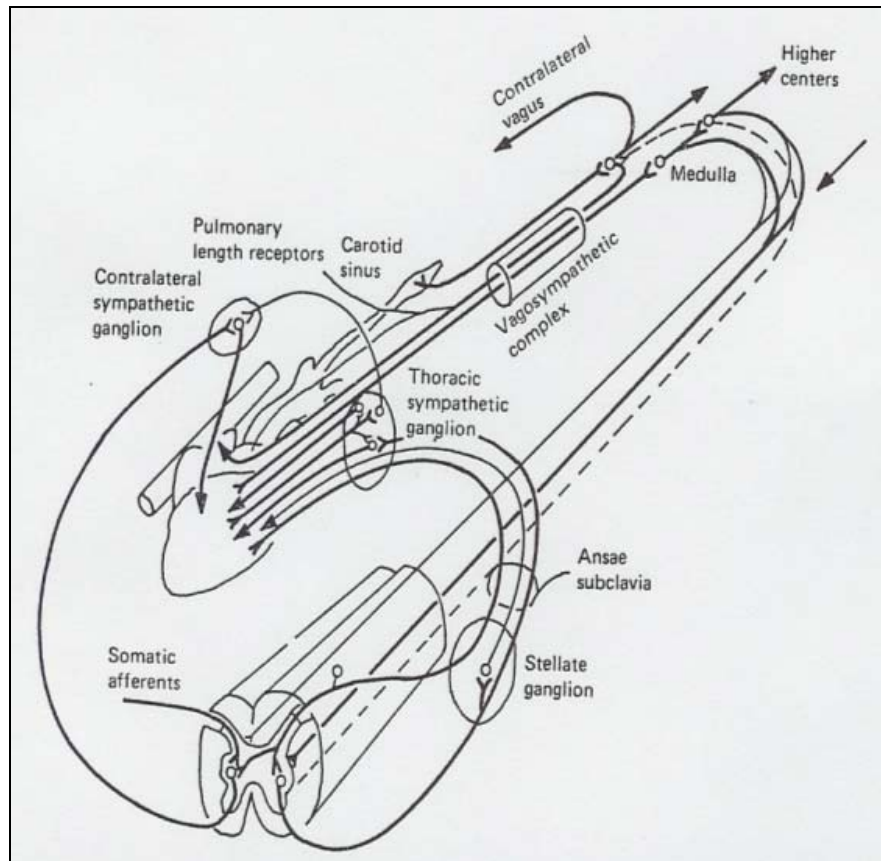


Figure 4 : Vision classique du système nerveux cardiaque  
(Armour 2008)

## 1.5 *Nicotine*

Les récepteurs nicotiniques sont présents à la jonction neuromusculaire, au niveau post-synaptique dans le système nerveux sympathique et au niveau pré et post-synaptique dans le système nerveux parasympathique. On les retrouve majoritairement à la jonction synaptique où ils sont responsables de la transmission de l'influx nerveux. Ainsi, l'acétylcholine libérée par le neurone pré-synaptique se lie aux récepteurs nicotiniques du neurone post-synaptique et entraîne une entrée d'ions sodique et calcique provoquant la dépolarisation du neurone post-synaptique.

La nicotine est un agoniste des canaux ioniques des récepteurs nicotiques. L'injection de nicotine, un agoniste de l'acétylcholine, provoque donc une stimulation des deux branches du système nerveux autonome. La nicotine permet une entrée d'ions sodique dans les neurones ce qui augmente considérablement le taux d'activité de ces derniers. Les deux systèmes étant activés, la réponse qui s'en suit est conjointe. Le système nerveux parasympathique est d'abord activé et via la libération d'acétylcholine, entraîne une bradycardie, une diminution de la force de contraction du cœur et donc une hypotension. Les effets sympathiques, causés par la libération d'adrénaline, provoquent une tachycardie, une hypertension et une vasoconstriction. La nicotine est aussi reconnue pour son effet activant sur les chémorécepteurs (Huang 1993).

Si la nicotine est injectée plusieurs fois les récepteurs sont progressivement désensibilisés. Il y a tachyphylaxie; les effets s'atténuent avant de disparaître. La composante parasympathique de l'hypotension disparaît avant l'hypertension. À dose très élevée, la nicotine paralyse les ganglions parasympathiques et entraîne une baisse de la pression artérielle.

## Chapitre 2 - Mécanismes régulateurs

Il existe de multiples mécanismes permettant de réguler les systèmes physiologiques tels que le système cardiaque et le système respiratoire via différentes boucles réflexes impliquant les afférences nerveuses. Les afférents nerveux transmettent des informations sur l'état des systèmes internes et sur l'environnement (situation de stress potentiel) au système nerveux autonome et au système nerveux central qui sont intégrées au niveau des centres supérieurs centraux. La modulation appropriée du système nerveux autonome est retransmise aux organes par les efférents nerveux qui ont des effets sur l'ensemble des systèmes de l'organisme, dont ceux régulant la respiration et le rythme cardiaque. De plus, plusieurs mécanismes de contrôle locaux participent aussi à la régulation de l'activité du cœur (Figure 5).

Le contrôle mécanique local se fait par un réflexe nommé réflexe de Frank-Starling qui implique seulement les fibres musculaires des ventricules. Lorsque le retour veineux est augmenté, les ventricules sont gorgés de sang et leur volume augmente. Cette augmentation de volume provoque un étirement des fibres musculaires qui modifie l'affinité de la troponine pour le calcium. La troponine est une protéine qui inhibe la contraction musculaire si elle n'est pas liée au calcium. Ainsi, l'augmentation de volume augmente le nombre de liaisons entre la troponine et le calcium et donc celles entre les filaments d'actine et la myosine, les protéines responsables des contractions musculaires. La contraction musculaire du cœur est alors plus puissante. La force de contraction est

proportionnelle à la longueur du sarcomère, et donc à l'étirement des fibres musculaire.

Ce réflexe a pour objectif d'expulser le surplus de sang des ventricules et d'éviter la surcharge.

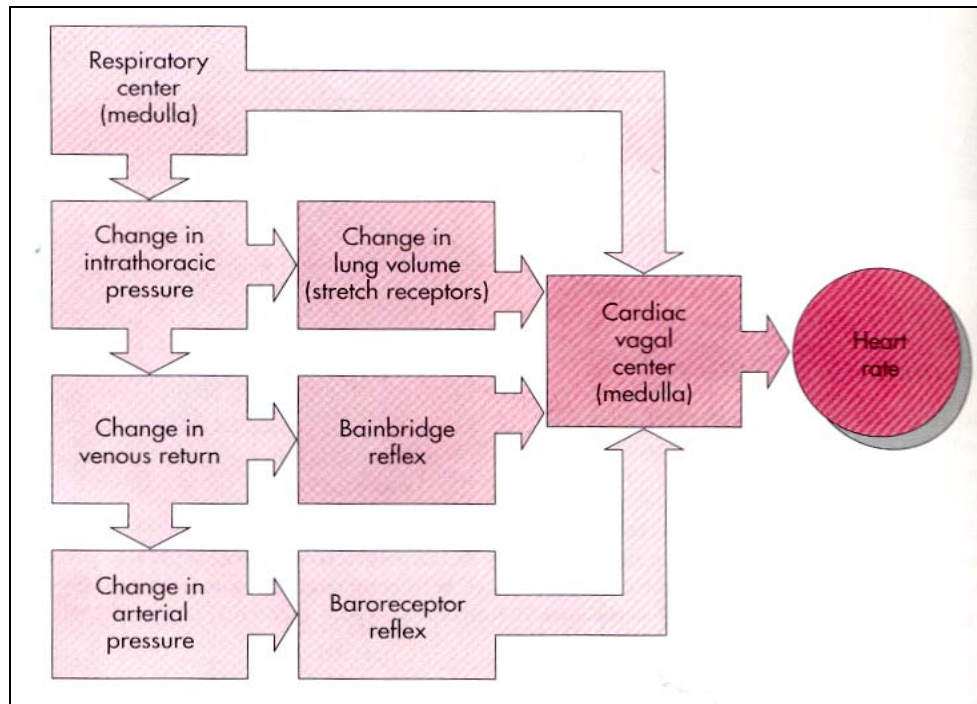


Figure 5 : Différentes boucles de contrôle pouvant induire des oscillations du rythme cardiaque

(Berne et Levy, 1997)

L'augmentation du retour veineux a aussi un impact sur le rythme cardiaque. En effet, l'augmentation de volume sanguin au niveau des oreillettes active des récepteurs auriculaires sensibles à l'étirement. Cet état est retransmis au système nerveux central par les afférences nerveuses circulant dans le nerf vague. L'information est intégrée au niveau du système nerveux central et permet à l'activité des deux branches du système nerveux autonome d'être modifiée afin d'augmenter le rythme cardiaque et la pression artérielle. Ce

mécanisme a pour nom réflexe de Bainbridge (Berne et Levy 1997). De plus, des expériences effectuées sur des cœurs de lapins ex-vivo ont démontré que l'augmentation du rythme cardiaque suite à l'augmentation du volume des oreillettes est maintenue malgré l'absence complète de contrôle du système nerveux central (Blink 1956). Finalement, le rythme intrinsèque de cellules isolées du nœud sinusal peut être modifié par des facteurs mécaniques, ce qui peut probablement être attribué à la présence de canaux ioniques sensibles à l'étirement dans les cellules du nœud sinusal (Cooper 2000).

## ***2.1 Le baroréflexe***

Le baroréflexe a pour but de maintenir la pression artérielle à des valeurs contrôlées via les barorécepteurs. Les afférences en provenance des barorécepteurs sont regroupées dans le noyau du tractus solitarius (NTS), un noyau du bulbe rachidien, et leurs axones suivent le nerf vague et le nerf glossopharyngien pour parvenir au système nerveux central. Les barorécepteurs sont situés dans la circulation artérielle au niveau des parois des carotides et de la crosse aortique. Ils permettent de réguler la pression à court terme. Ce sont des mécanorécepteurs puisque leur étirement déclenche une boucle de rétroaction. Ils permettent l'ajustement des systèmes nerveux sympathique et parasympathique afin de protéger contre l'hypertension et l'hypotension (Opie 2004).

Lors d'un épisode d'hypertension, le baroréflexe engendre un influx accru de stimuli vers le bulbe rachidien, ce qui entraîne une inhibition du système nerveux sympathique et une augmentation du tonus vagal. Le résultat est une diminution de la

fréquence et de la force des contractions et de la résistance périphérique. La pression est donc rétablie. Ce mécanisme a un effet quasi immédiat pour pallier à des changements rapides comme le fait de passer de la position couchée à debout. Lors d'un épisode d'hypotension, la chaîne des événements est inversée (Opie 2004).

## **2.2 *La respiration***

Le système respiratoire et le système cardiaque sont intimement reliés. Il est donc normal que l'activité de l'un permette de moduler l'autre. Par exemple, lors de l'inspiration, la pression thoracique est diminuée ce qui augmente le retour veineux vers les oreillettes et déclenche le réflexe de Bainbridge. De plus, l'étirement des mécanorécepteurs pulmonaires inhibe le vague ce qui augmente aussi le rythme cardiaque pendant l'inspiration. Par contre, l'augmentation de pression engendrée par le réflexe de Bainbridge déclenche à son tour le baroréflexe et favorise un plus important tonus vagal. Ainsi, des mécanismes aux effets opposés sont présents au cours de l'inspiration.

Le principal nerf responsable de la respiration est le nerf phrénique. Il émerge des nerfs spinaux cervicaux de C<sub>3</sub> à C<sub>5</sub> chez l'humain et de C<sub>5</sub> à C<sub>7</sub> chez la plupart des animaux domestiques. Il est responsable de la contraction du diaphragme lors de l'inspiration ; son abaissement permet aux poumons de se remplir d'air. Il contient principalement des neurones moteurs. La stimulation électrique du nerf phrénique provoque une inspiration avec une importante entrée d'air. Ainsi, on peut affirmer l'activation des motoneurones du nerf phrénique déclenche l'inspiration (Kooreman 1998).

Sous anesthésie générale, on observe fréquemment une hypoventilation, surtout lorsque l'animal est placé sur le dos. La ventilation intermittente à pression positive est alors utilisée pour remédier à ce problème. Par contre, cette méthode a pour effet de diminuer le retour veineux et le volume cardiaque expulsé ('cardiac output') (Kooreman 1998).

L'ensemble des mécanismes régulateurs a donc pour résultat une oscillation du rythme cardiaque qui augmente lors de l'inspiration. Une oscillation plus lente d'une durée d'environ 10 secondes est remarquée lors de l'étude du tonus nerveux, de la pression artérielle et du rythme cardiaque. Cette oscillation se nomme «ondes de Mayer». La cause n'est encore qu'une hypothèse, mais on suppose qu'elles seraient dues aux différents mécanismes régulant la pression (Julien 2006).

Le réflexe des chémorécepteurs joue aussi un rôle important dans la régulation cardiovasculaire et démontre la complexité du système lorsque, par exemple, un stimulus excite deux systèmes. Ainsi, chez l'animal intact, la stimulation des chémorécepteurs carotidiens provoque l'augmentation du rythme et de la profondeur des inspirations, mais le rythme cardiaque ne varie que légèrement. La réponse cardiaque à la stimulation des chémorécepteurs dépend de l'effet réflexe primaire et secondaire. L'effet réflexe primaire dépend de l'excitation des chémorécepteurs carotidiens et diminue le rythme cardiaque en facilitant le centre vagal médullaire. L'effet réflexe secondaire se définit comme l'effet inhibiteur sur le centre vagal médullaire de la stimulation respiratoire des chémorécepteurs



carotidiens. Cet effet varie avec la stimulation de la respiration (Berne et Levy 1997).

Nous aborderons avec plus de détails les effets de la nicotine sur les chémorécepteurs dans le chapitre de discussion suivant la présentation de l'article.

### ***2.3 Analyse spectrale***

Lorsque l'analyse spectrale du rythme cardiaque et plus spécifiquement de l'intervalle R-R est effectuée, différents types de fréquences sont détectés dans le spectre de puissance. D'abord, on observe les très basses fréquences (VLF, 0-0,04 Hz) attribuées aux mécanismes de régulation à long terme comme la thermorégulation. On détecte des basses fréquences (LF, 0.04-0.14 Hz) qui sont fréquemment associées à l'activité sympathique (Pagani 1997). Elles sont également associées aux ondes de Mayer (Malliani 1991). On détecte enfin les hautes fréquences (HF, 0.15-0.5 Hz) que l'on attribue au système nerveux parasympathique particulièrement au nerf vagal cardiaque et à la respiration (Pagani 1997). Le rapport entre les hautes et les basses fréquences est souvent utilisé pour évaluer de façon non invasive les interactions sympathiques et vagales modulant la fonction cardiovasculaire (Malliani 1991). Cette façon d'interpréter la provenance des hautes et des basses fréquences est par contre contestée puisque de nombreux exemples démontrent qu'il est réducteur d'attribuer un type de fréquence à une branche du système nerveux autonome. Il est important de considérer la complexité des interactions entre les deux branches du système nerveux autonome (Eckberg 1996).

L'analyse spectrale et la comparaison des hautes et des basses fréquences peut également être utilisée à partir des données fréquentielles provenant du temps de conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire, de la pression systolique ou diastolique et du taux d'activité neuronale. Cette technique peut donc être appliquée à différents types de données physiologiques, toujours dans le but d'étudier les interactions entre les deux branches du système nerveux autonome.

## Chapitre 3 - Propagation électrique

### 3.1 Propagation dans les nerfs

Le système nerveux autonome a pour unité fonctionnelle le neurone, formé des dendrites, du corps cellulaire, de l'axone et des terminaisons axonales ou arborisation terminale (Figure 6). Les dendrites sont ramifiés afin d'accroître la surface de réception pour recevoir les messages des autres neurones ou des récepteurs sensoriels. Généralement, un neurone ne possède qu'un seul axone. L'axone débute au niveau du cône d'implantation, lieu de départ de l'influx nerveux. Les axones des neurones du système nerveux périphériques sont souvent entourés de cellules de Schwann qui forment la gaine de myéline. La gaine de myéline augmente la vitesse de propagation de l'influx nerveux. L'axone se subdivise ensuite pour former les terminaisons axonales qui forment des synapses avec des cellules effectrices ou des neurones.

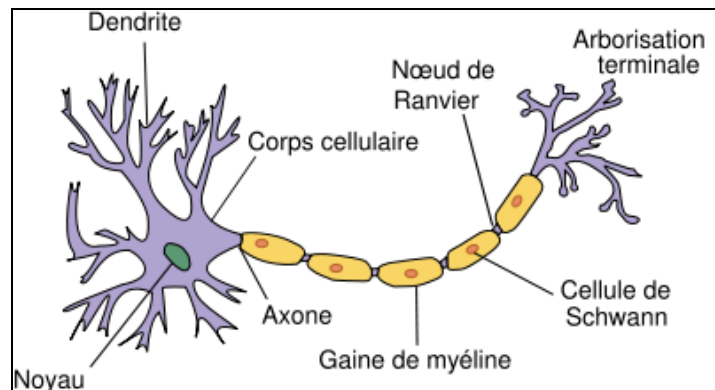


Figure 6 : Anatomie du neurone

([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ea/Neurone\\_français\\_schéma.svg/400px-Neurone\\_français\\_schéma.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ea/Neurone_français_schéma.svg/400px-Neurone_français_schéma.svg.png)) (visité le 14/07/2008)

Les neurones du système nerveux périphériques peuvent être classés en trois catégories : les neurones sensitifs ou afférents qui transmettent au système nerveux central l'information des milieux interne ou externe, les efférents qui acheminent les influx vers les cellules effectrices et les interneurones qui font le lien entre deux ou plusieurs neurones.

Les neurones sont des cellules excitables. En effet, les neurones permettent aux messages provenant d'endroits éloignés de l'organisme de se propager vers l'organe cible ou les centres supérieurs sous forme de signal électrique. La dépolarisation du neurone qui permet la propagation du signal nerveux se fait dans des conditions particulières. Les neurones ont un potentiel intracellulaire négatif qui est généralement d'environ -70 mV par rapport à l'environnement extracellulaire. C'est ce qu'on appelle le potentiel de repos. Il est créé par les différents ions présents dans le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire et le fait que la membrane ait une perméabilité sélective. Dans le milieu extracellulaire, le sodium est le cation présent en plus grande quantité bien qu'il y ait aussi une petite quantité de potassium. Dans le milieu intracellulaire, le potassium est le cation prédominant et il y a peu de sodium. Les protéines présentes à l'intérieur du cytoplasme portent les principales charges négatives intracellulaires. Dans le milieu extracellulaire, ce rôle est joué de l'anion chlorure. Les ions de potassium circulent à travers des canaux situés dans la membrane cellulaire et la cellule atteint le potentiel d'équilibre de -85 mV. Par contre, comme la membrane au repos est légèrement perméable au sodium, le potentiel de repos est de -70 mV.

Lorsque le neurone est excité électriquement, chimiquement ou mécaniquement au niveau des dendrites, un changement s'opère au niveau de la membrane. Ces stimulations provoquent soit des PPSE ou potentiels post synaptiques excitateurs qui dépolarisent légèrement la membrane dendritique (facilitation), soit des PPSI ou potentiels post synaptiques inhibiteurs qui hyperpolarisent la membrane. L'hyperpolarisation a pour effet de rendre plus difficile l'atteinte du seuil. Les PPSI et PPSE sont additionnés au niveau du cône d'initiation et si le seuil est atteint, il y a déclenchement d'un potentiel d'action. Il est important de mentionner qu'il s'agit d'une réponse de type tout ou rien. Lorsque le seuil est atteint, les canaux sodiques sensibles au voltage s'ouvrent. Ces canaux sodiques activés par le changement de potentiel de la membrane permettent une entrée de sodium qui rend momentanément la cellule plus positive que le milieu extracellulaire. La différence de potentiel intracellulaire ainsi créée provoque une diffusion de cations qui dépolarisent la section suivante de l'axone et assurent la propagation du potentiel d'action. Il y a ensuite une phase de repolarisation due à une fuite de potassium par les canaux potassiques sensibles au voltage. La grande constante de temps contrôlant la réaction au voltage de ces canaux explique l'hyperpolarisation transitoire se produisant à la fin du potentiel d'action (Figure 7).

Si un deuxième stimulus arrive alors que les canaux sodiques sont désactivés, la cellule ne peut réagir. C'est ce qu'on appelle la période réfractaire absolue. Pendant la repolarisation, une fraction croissante des canaux passe de l'état inactivé à l'état fermé, ce dernier état étant celui à partir duquel le canal peut s'ouvrir sous dépolarisation. La fraction des canaux qui ont atteint l'état fermé fixe donc l'excitabilité du neurone et la grandeur du

stimulus à appliquer pour obtenir un nouveau potentiel d'action. Il s'agit de la période réfractaire relative.

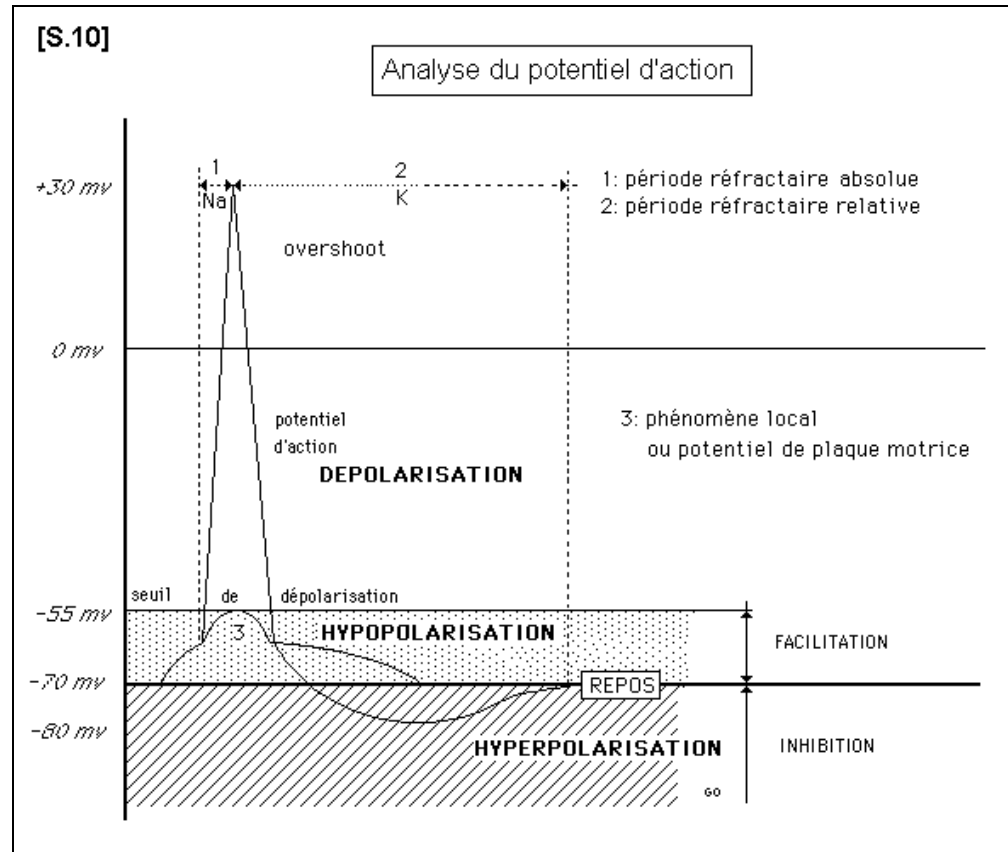


Figure 7 : Propagation du potentiel d'action

(<http://www.anatomie-humaine.com/Biologie-du-neurone.html>) (visité le 14/07/2008)

Le potentiel d'action peut être enregistré de plusieurs façons différentes. On peut le mesurer directement en insérant des électrodes dans le soma ou l'axone. On peut aussi utiliser des substances fluorescentes pour identifier les cellules dans lesquelles il y a production d'un potentiel d'action (Richardson 2003). On peut aussi le mesurer de façon indirecte grâce à des électrodes placées dans l'espace extracellulaire (Waldmann 2006). En effet, les changements de conductance de la membrane lors de la propagation du potentiel

d'action produisent des changements de courant à travers la membrane cellulaire. Les courants transmembranaires injectent donc des courants dans le milieu résistif extracellulaire. Les différences de potentiel extracellulaire engendrées par ces courants dans le milieu peuvent être mesurées par des électrodes. La différence de potentiel intracellulaire est de l'ordre des 100 mV. Par contre, le potentiel extracellulaire est environ 500 fois plus petit, ce qui nécessite de l'équipement spécialisé pour pouvoir le percevoir.

### ***3.2 Structures impliquées dans la propagation électrique du cœur***

Le cœur possède deux structures importantes, soit le nœud sinusal et le nœud auriculo ventriculaire. Le nœud sinusal est le stimulateur naturel du cœur et permet de générer de lui-même les battements du cœur. Il est situé sur l'oreillette droite du cœur. L'influx électrique a donc pour point de départ le nœud sinusal et se propage à l'ensemble des oreillettes et rejoint le nœud auriculo-ventriculaire. Le courant circule ensuite dans le faisceau de His puis dans les fibres de Purkinje qui sont situées sur la surface endocardique des ventricules. L'influx se propage à l'ensemble des ventricules, de l'endocarde vers l'épicarde et provoque la contraction cardiaque.

## Chapitre 4 - Les ganglions sympathiques

### 4.1 *Le ganglion stellaire*

#### 4.1.1 Anatomie

Le ganglion stellaire, la cible principale de notre étude, est un centre important de l'innervation sympathique du cœur (Figure 8). Le ganglion stellaire est formé par la fusion du ganglion cervical inférieur et de T<sub>1</sub>. Il est relié à la colonne vertébrale par les nerfs T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>. Il est également relié au GCM par deux nerfs : l'anse ventrale et l'anse dorsale qui entourent l'artère sous-clavière. Il y a aussi le nerf vertébral qui accompagne l'artère du même nom vers les centres supérieurs. Finalement, la branche sympathique descend vers les ganglions inférieurs (Figure 9). Toutes les branches sont mixtes ; c'est-à-dire qu'elles contiennent des efférents et des afférents (Hopkin 1989).

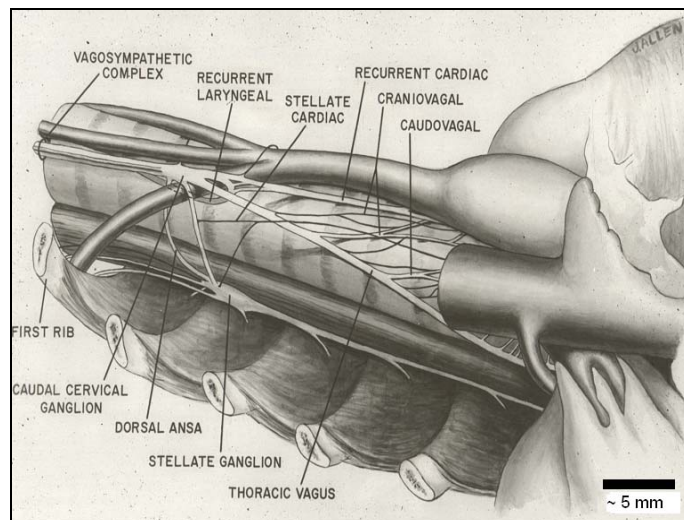


Figure 8 : Représentation in vivo de l'innervation du ganglion stellaire et du CGM ici nommé « caudal cervical ganglion »

(Miller 1964)



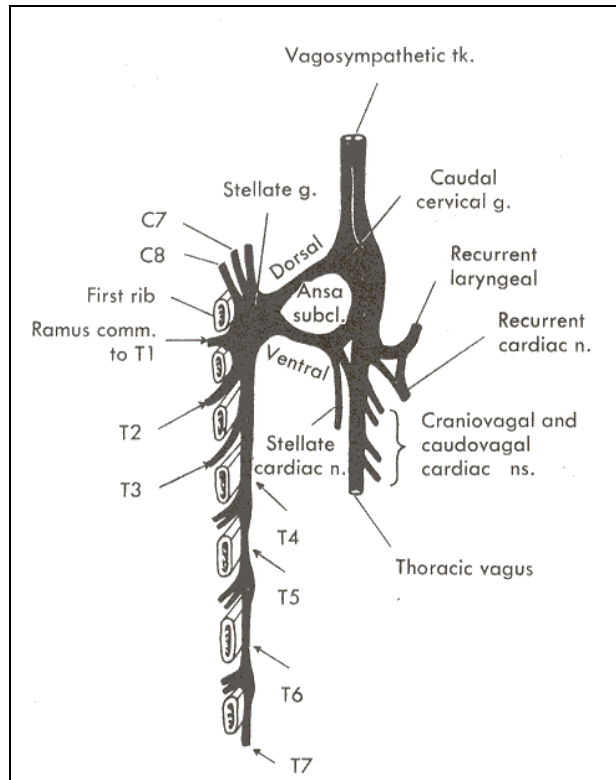


Figure 9 : Innervation du ganglion stellaire et du GCM

(Berne et Levy 1981)

#### 4.1.2 Développement

Le ganglion stellaire a pour origine embryonnaire une portion de l'ectoderme nommé neurectoderme. Le tube neural donne naissance au système nerveux central et donc au cerveau et à la moelle épinière. Dorsolatéralement à ce tube, la crête neurale se détache du neurectoderme et des cellules migrent dans le mésenchyme pour former le système nerveux périphérique dont le ganglion stellaire. Deux types de cellules s'y retrouvent : les neuroblastes précurseurs des neurones et les glioblastes précurseurs des cellules gliales ou cellules de soutien.

Le nombre de cellules dérivant des neuroblastes augmente après la naissance jusqu'au dixième jour avant de régresser. La taille des neurones va par contre en constante croissance. On estime que le développement du ganglion est terminé un mois après la naissance chez le chat. La plupart des neurones innervant le cœur se retrouvent au centre du ganglion stellaire, bien que les neurones les plus gros soient situés dans le pôle cranial (Masliukov 2000). Chez le chien, les corps cellulaires des fibres post-synaptiques situés dans les nerfs cardiaques sont massés dans le pôle cranial près de la naissance des deux anses (Armour 1981). Les neurones du ganglion gauche possèdent un soma d'un diamètre plus important que celui des neurones du ganglion droit tout au long du développement (Masliukov 2001).

### **4.1.3 Contenu en neurotransmetteur**

La composition des neurones du ganglion stellaire en neurotransmetteur varie également au cours de l'ontogenèse. Chez la souris, on estime que les neurotransmetteurs sont stables après deux mois de vie. Une seule cellule peut contenir jusqu'à cinq neurotransmetteurs dont la somatostatine, le neuropeptide Y (NPY), le peptide opioïde, la galanine et des catécholamines. Les catécholamines sont présentes dans les ganglions sympathiques durant la vie embryonnaire, de même que le NPY. Une grande quantité des neurones du ganglion sont adrénergiques et contiennent de la tyrosine, un précurseur de la noradrénaline. Une petite quantité de neurones renferme de la CAT, un enzyme précurseur de l'acétylcholine. Ces neurones contiennent également de la tyrosine, mais leur nombre décroît après 10 jours (Maslyukov 2006). Les neurones du ganglion stellaire sont donc d'abord et avant tout sympathiques de par leurs neurotransmetteurs (Figure 10).

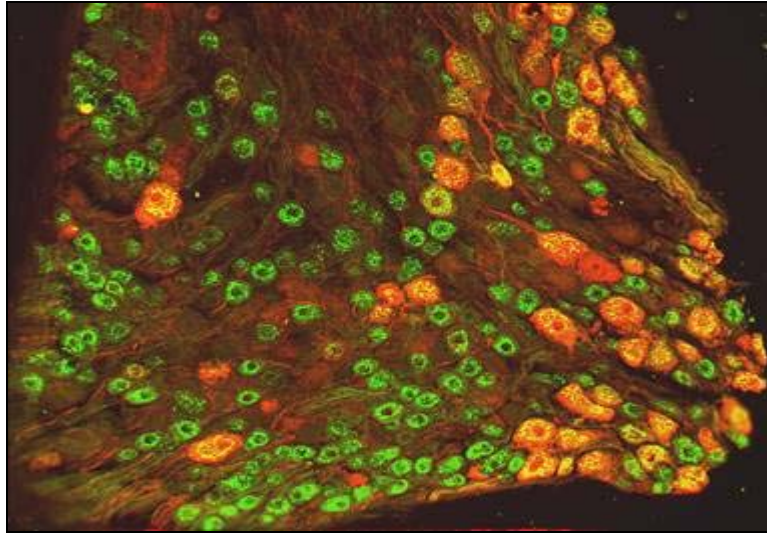


Figure 10 : Coloration d'un ganglion stellaire de souris

Les corps cellulaires ont été colorés par deux traceurs. En vert le neurotransmetteur détecté est le NPY, en rouge la calbindine. On retrouve en orange ceux qui ont testé positifs aux deux.

([http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/anderson/img/currentprojects\\_clip\\_image006.jpg](http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/anderson/img/currentprojects_clip_image006.jpg)) (Visité le 02-07-2008)

#### 4.1.4 Localisation des corps cellulaires et innervation du cœur

Le ganglion stellaire contient des neurones qui innervent plusieurs organes dont le cœur, les muscles lisses entourant les vaisseaux sanguins et les poumons. Le bloc du ganglion stellaire peut être utilisé à des fins diagnostiques et thérapeutiques (Elias 2000). Le bloc ou l'ablation des ganglions sont aussi utilisés pour traiter les douleurs cardiaques, le syndrome de Raynaud, la dystrophie du réflexe sympathique et l'herpès zoster ophthalmicus (Nozdrachev 2003). Il y a donc des populations de neurones qui ont différentes fonctions au sein de ce ganglion. De plus, pour l'innervation d'un même organe,

il peut y avoir plusieurs types de neurones tels que les afférents et les efférents et des populations jouant des rôles différents (Shih 1985). Des fibres pré-synaptiques traversent le ganglion stellaire sans faire synapse et se dirigent vers le nerf vague et le nerf cardiaque inférieur chez le chat (Nozdrachev 2003). Il y a donc vraisemblablement des fibres pré-synaptiques qui traversent le ganglion stellaire qui se dirigent vers le CGM chez le chien. Des nerfs afférents qui se dirigent vers le thalamus et le néocortex passent aussi à travers le ganglion (Nozdrachev 2003).

Les fibres post-synaptiques qui innervent le cœur et proviennent en partie des ganglions stellaires ont un rôle et une origine différents selon la région du cœur où elles font synapse. Par exemple, la paroi ventrale ventriculaire droite et le nœud sino atrial sont principalement innervés par des neurones issus du ganglion stellaire droit. Par contre, la paroi dorsale ventriculaire gauche reçoit une innervation plus importante du ganglion stellaire gauche. Les ganglions ne sont donc pas identiques (Shih 1985).

Chez le chat, les corps cellulaires des neurones efférents ayant des axones dans le nerf cardiaque inférieur sont situés au niveau T<sub>1</sub> à T<sub>7</sub> (Ruhle 1985). Par contre, les corps cellulaires des neurones afférents dont les axones sont localisés dans le nerf cardiaque inférieur sont retrouvés au niveau C<sub>7</sub> à T<sub>7</sub> (Lee 1984). Chez le chien, les corps cellulaires des neurones sympathiques post-ganglionnaires ayant des axones dans le nerf cardiaque sont principalement retrouvés dans le CGM et en plus petite quantité dans le ganglion stellaire (Armour 1981). Il est important de noter qu'il est plutôt rare que des axones situés dans deux nerfs différents partagent un même corps cellulaire situé dans le stellaire

(Tomney 1985). Les corps cellulaires des afférents issus des nerfs cardiaques se situent dans les ganglions ipsilatéraux et dans les ganglions de la racine dorsale de C<sub>7</sub> à T<sub>7</sub>. Par contre, les corps cellulaires des afférents provenant de différentes régions du cœur sont retrouvés dans les ganglions nodaux et dans les ganglions de la racine dorsale de C<sub>6</sub> à T<sub>6</sub> et ce, bilatéralement. La majorité des neurones sont retrouvés dans les ganglions nodaux. Les quelques neurones situés dans des ganglions la racine dorsale sont au niveau T<sub>2</sub> à T<sub>4</sub> (Hopkins 1989).

## ***4.2 Le ganglion cervical médian***

Le CGM est un ganglion sympathique beaucoup moins étudié que le ganglion stellaire, probablement en raison de la variabilité de sa position et de sa taille d'un individu à l'autre qui le rend plus complexe à identifier (Elias 2000). Le CGM ou ganglion cervical médian est situé directement sur le complexe vago-sympathique (Armour 1981). La partie supérieure se nomme la partie thoracique craniale du complexe vago-sympathique et la partie inférieure le nerf caudal vagal (Armour 1984). Il n'y a que très peu d'axones dans le nerf caudal vagal dont les corps cellulaires sont localisés dans le CGM. Au niveau anatomique, le CGM est relié au ganglion cervical supérieur par la branche cervicale sympathique. Il est également innervé par les deux anses provenant du ganglion stellaire. Le nerf du pôle cranial et le nerf médian cranial sont situés dans la partie supérieure du ganglion. Deux nerfs émergent de la base du CGM, soit le nerf du pôle caudal et le nerf caudal médian (Armour 1981). Ces quatre derniers nerfs sont considérés comme des nerfs cardio-pulmonaires. On définit par nerfs cardio-pulmonaires les structures anatomiques qui

émergent des ganglions thoraciques sympathiques et du nerf vague et qui se dirigent vers le cœur (Armour 1983). Ces nerfs peuvent se recouper entre eux entre le ganglion et l'organe cible (Tomey 1985). Finalement, des branches du CGM innervent la carotide et le plexus carotidien (Elias 2000).

Une grande partie des corps cellulaires reliés aux axones situés dans les nerfs cardiaques sont retrouvés dans le CGM (Armour 1981). De plus, les neurones efférents qui font synapse au niveau des plexus ganglionnaires cardiaques intrinsèques ont souvent leurs corps cellulaires dans le CGM (Hopkin 1997). Ainsi le CGM jouerait un rôle au moins équivalent à celui du ganglion stellaire dans le contrôle neuronal du cœur via des fibres post-synaptiques (Armour 1981). Les neurones efférents sympathiques post-ganglionnaires qui projettent dans des axones des nerfs cardio-pulmonaires et cardiaques sont distribués partout dans le CGM (Armour 1984). De plus, dans le CGM, les corps cellulaires possèdent quelquefois des axones qui se subdivisent et traversent des nerfs différents et innervent plus d'une région cardiaque. Donc, les neurones d'une région du CGM peuvent innervier plusieurs régions du cœur (Tomey 1985). Les neurones du CGM ont plusieurs fonctions au niveau cardiaque et les interneurones peuvent modifier la régulation de différentes régions du cœur (Armour 1984). Les neurones afférents du CGM sont principalement de type mécanosensoriel cardiaque (Armour 1998).

### *Contribution de l'étudiante à l'article*

Le protocole a été développé en collaboration avec Dr Armour et en s'inspirant de ses recherches. Les quatre co-auteurs ont contribué à l'élaboration du protocole. L'étudiante a participé à la préparation du matériel pour les expériences comme la fabrication des électrodes. Elle a également assisté à toutes les expériences et y a participé, par exemple, en injectant la nicotine. Par la suite, elle a réalisé la majeure partie de l'analyse des résultats sous la supervision de son directeur, le Dr. Alain Vinet. Elle a aussi bénéficié de l'assistance de son collègue Simon Dubeau qui a développé le système d'enregistrement et les outils d'analyse. Enfin, elle a rédigé l'article qui a ensuite été corrigé par son directeur et les autres auteurs.

## Chapitre 5 - Article

### **Stability of canine stellate ganglion neuronal response to repetitive chemical activation**

Brigitte Maillet<sup>1,3</sup>, Alain Vinet<sup>1,2,3</sup>, Simon Dubeau<sup>4</sup>, E.J. Vigmond<sup>5</sup> and John Andrew  
Armour<sup>1</sup>

Research Center, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal<sup>1</sup>, Biomedical Engineering Institute<sup>2</sup>,  
Department of Physiology<sup>3</sup>, Faculty of medicine, Université de Montréal, École  
Polytechnique, of Montréal<sup>4</sup>, Canada Dept., of Electrical and Computer Engineering,  
University of Calgary, Canada<sup>5</sup>

Address for reprint requests and other correspondance: Alain Vinet, Centre de Recherche,  
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 Gouin Blvd. West, Montréal, Québec, Canada,  
H4J 1C5.

Telephone: (514) 338-2222 ext. 2582

Fax: (514) 338-2694



## ***5.1 Abstract***

Four micro-electrodes were inserted in the left stellate ganglion (SG) of in vivo canine preparation to evaluate the firing of neuronal somata located in this peripheral ganglion during stable cardiovascular state and following local and systemic injection of nicotine. During control periods, minor changes were observed in systolic arterial pressure, the heart rhythm and the atrioventricular conduction time. The activity generated by SG neurons remained relatively constant within each dog, but the firing rate was variable among the preparations. Systemic nicotine administration altered the physiological variables and increased the neuronal activity. Although different patterns of physiological changes were observed among the preparations, it remained invariant upon successive injections in each animal. The dynamics of the neuronal response was similar but vary in amplitude and duration both within and between the dogs. Local injections of nicotine in an artery close to the SG induced a brief and huge burst of neuronal firing, but did not influence the physiological response. The recording technique thus permit to follow the behaviour of multiple intrathoracic neuronal populations located in the SG. The relation between the SG firing and the physiological changes is stable in each dog, but differ between the animals. It suggests that the weight of the different feedback loops involved in the cardiovascular regulation might be a characteristic feature of each animal and/or the position of the electrodes in the SG is critical, since different neuronal populations are present and could react differently.

*Keywords:* Autonomic nervous system, cardiac nervous system, stellate ganglion, neurons

## ***5.2 Introduction***

The CANS is known to be involved in the onset of different arrhythmia, especially AF. In the 19<sup>th</sup> century, it was demonstrated that vagal stimulation could induce AF (Garrey 1924). In 1994, Coumel gathered the first clinical evidence implicating the CANS in AF (Coumel 1994). He classified the atrial arrhythmia so involved in two categories: i) adrenergic and ii) vagally induced. Recent studies have also shown that there might be a change in autonomic tone before the onset of AF (Zimmermann 2001).

CANS is a complex system acting both on the electrophysiological as well as vascular components of the cardiovascular (CV) system. Chemoreceptors and baroreceptors located in various vascular beds transmit information about the blood pressure and its composition to higher centres in the brain (Rutheford 1978, Masayoshi 1988, Hockett 1972, Stickland 2007, Vatner 1975). It is known that these are involved in the rapid adjustments in vessel diameters (resistances) that are elicited through the CANS. This control system is highly integrated, having different latency and functional feedback mechanisms. The baroreflex is one of the most important of its feedback mechanisms. Beside, it coexists with other mechanisms such as the Bainbridge and Frank-Starling reflexes (Berne 1997, Blinks 1956).

Currently, two theories of CNS feedback control mechanism prevail. The classical view of the autonomic nervous system envisages peripheral autonomic ganglia as simple efferent neuronal relays for central neuronal command. Recently, it has been proposed that the intrathoracic ganglia also include local circuit neurons that process the neural information and participate to the regulation of the cardiac functions (Thompson 2000).

*Anatomy and function:* The anatomy of the intrathoracic ganglia of the sympathetic autonomic nervous system has been studied in adult dogs (Armour 1982) and cats (Nozdrachev, 2002, Masliukov 2001, 2000, 2006). The relationship between the central nervous system and the thoracic autonomic neural elements has been investigated to determine the independent regulation of the local autonomic nervous system on the heart and lungs (Armour 1983). The stellate ganglion (SG) is one major structure of the intrathoracic sympathetic nervous system. The morphofunctional organization of the SG has been studied and surgical removal or blockade of the stellate has been used clinically (Elias 2000). Extracellular recording of the SG activity suggested that most of its spontaneously active neurons were interneurons. It has been postulated that the state of these interneurons could be modified by afferent neuronal inputs from tissues of the neck, heart, lungs, or great thoracic vessel (Armour, 1985). In the SG, afferent neurons influence the activity of their interneuronal populations (Armour 1983, Nozdrachev 2002, Armour 1984).

The SG is connected to the MCG by two nerves: the dorsal and the ventral ansa. The SG is attached to the spinal cord by T1 and T2 rami. In order to understand how intrathoracic feedback are involved in cardiac regulation functions we developed a multi-channel recording system to simultaneously identify the activity generated by neurons in the major intrathoracic ganglion concomitant with arterial pressure, heart rhythm and respiration in control states as well as during chemical challenge to one population. Ultimately, we aim to study the dynamics of the functional interaction of these populations of neurons in different conditions such as before and after the surgical or chemical interruption of different feedback loops (Dubeau 2006). However, investigation of the stability of the response is a

prerequisite to a more extensive exploration of the system. In the following paper, we reported the dynamics of the SG response in control condition, as well as after repeated local and systemic injection of nicotine. To our knowledge, this is the first report of multiple channels in vivo recording in the stellate ganglion.

### 5.3 Methods

*Experimental animals.* The experiments were performed in accordance with guidelines of Canadian Council for Animal Care. Seven mongrel dogs of either sex, weighing 26-34 kg, were anesthetized with thiopental (25 mg/kg, i.v.) and with alpha-chloralose (80 mg/kg, i.v.). Anaesthesia was maintained with alpha-chloralose (20 mg/kg, iv/h). The respiration was maintained with a Harvard apparatus positive-pressure respirator. A bilateral thoracotomy exposed the left SG. The ganglion remained *in situ* to ensure the adequacy of its blood supply throughout the experiment. The multi-channel recorder has three BNC (Bayonet Neill-Concelman) connectors which allows to record physiological data. One was connected to a lead II ECG while the other two were connected to a Cobe transducers linked to catheters. One catheter was placed in the femoral artery to provide arterial pressure while the other one was placed in the trachea to give tracheal pressure (representative of respiratory dynamics).

*Cardiac indices:* The ECG signal was analyzed to extract the timing of atrial (A) and ventricular activations (V) of each cardiac beat and calculate the sinus rhythm (AA) and the atrio-ventricular conduction time (AV). Systolic arterial pressure (SP) was also determined for each cardiac beat.

*Recording neuronal activity.* Four tungsten microelectrodes (Frederick Haer, ME, USA #UEWSFESMLM1M; impedance 9-12 MOhms at 1 kHz, diameter; 200  $\mu$ m), mounted on a micromanipulator, were inserted in the left SG. A reference microelectrode was placed adjacent to the ganglion. Once the electrodes were inserted in the ganglion, the quality of

neuronal activity so recorded was evaluated. If activity was absent, the electrodes were removed and reinserted somewhere else in the ganglion.

The signals obtained from these microelectrodes were amplified individually by means of a preamplifier (MPA-8, Multichannel System, De, gain 10X) positioned close to the recording site. The outputs were led to a 0.5 Hz high pass filter junction box. The outputs of the junction box, including concomitantly recorded physiological data (ECG, arterial pressure and tracheal pressure), were led to a Bio Semi A/D converter performing low pass filtering with cut-off frequency of 3334 Hz (Bio Semi, The Netherlands). The Bio Semi converter outputs were fed to the computer (Bio Semi software) to perform band-pass filtering (150 Hz and 2048 Hz). This permitted monitoring of the waveforms of individual neuronal activity so that individual durations and amplitudes could be monitored. These data were stored and subsequently converted in order to be compatible with Spike II software (Cambridge Electronic Design, England). This software is specially designed to analyze the activity generated by multiple neurons over time.

*Protocol.* A catheter was inserted into a femoral artery and guided into that vessel such that its tip reached the costo-cervical trunk. This catheter was used for local injection of nicotine into the blood supply of left-sided SG. Another catheter was placed in the femoral vein for the subsequent administration of nicotine systemically. The complete protocol of stimulation was repeated three times (P1 to P3). Each instance of the protocol started with a control period lasting at least 5 minutes, followed by three successive local injections of nicotine into the costo-cervical trunk, and a final systemic injection. The local injections were separated by at least three minutes intervals, while the systemic (a bolus of 250 ug)

was administered at least five minutes after the third local injection. Before the beginning of the experiment, a test local injection of 50  $\mu$ g of nicotine was performed to verify if it was sufficient to enhance the neural response. If an increase was not detected, the dose of the local injections of nicotine was raised to 100  $\mu$ g.

*Data analysis.*

Chapitre 1 - Control states: The AA and AV intervals and the systolic pressure (SP) were obtained for each cardiac beat of the control period at the beginning of each repetition of the protocol (P1,P2,P3). The stellate ganglion neuronal firing rate (SF =total number of spikes detected in all channels within each cardiac cycle (defined as the interval between successive atrial activations) divided by the duration of the cycle) was also calculated. The power spectrum of the time series was calculated by FFT, and their low (LF) and high frequency (HF) contents evaluated by integrating the power spectrum over the frequency intervals [0.05-0.15] Hz and [0.15-0.4] Hz respectively. The heart rhythm HF and LF are often used to evaluate the interactions between the sympathetic and the vagal component of the CANS (Pagani 1997, Malliani 1991). Change in the mean values of the different variables upon repetition of the protocol was assessed by one-way repeated measures ANOVA. Statistical significance of the repetition effect was established using the Huyn-Feldt adjusted test (Vonesh 1977). The homogeneity of the standard deviations (STD) across the repetitions within each dog was assessed by the Bartlett's test (Snedecor, 1980). The non-parametric Friedman's test for repeated measures (Hollander 1973) was also

used to test for trend in the change of STD. Finally, correlations between the standard deviations of the physiological data and the firing rates of the SG were investigated.

Chapitre 2 - Systemic nicotine injection. All variables were calculated for each cardiac cycle as in the control period. The beginning of the post-injection response ( $T_B$ ) for AA, AV, SP and SF was defined as the first time when their values departed for at least one second from the interval [ $\text{mean} \pm 3 \text{ STD}$ ] calculated from the 10 seconds preceding the injection. AA and AV responses were characterized by an early phase with huge fluctuations, followed by a slow low amplitude drift toward a stable state. In each case, a marker was inserted by hand to denote the end ( $T_E$ ) of the phase of high amplitude response. The amplitude of the response was taken as the difference between the maximum and minimum values occurring between  $T_B$  and  $T_E$ . SF always returned to the stable state after a surge of firing. The end of the SF response ( $T_E$ ) was fixed at the moment where the firing return within the interval [ $\text{mean} \pm 3 \text{ STD}$ ] calculated from the 10 seconds preceding the injection. Both the maximum and mean firing rate between  $T_B$  and  $T_E$  were obtained.

Chapitre 3 - Analysis following local nicotine administration: The beginning ( $T_B$ ) and end ( $T_E$ ) of the SG response were defined as for systemic injection of nicotine. For almost all instances, the amplitudes of the physiological responses (AA, AV, and SP) remained within the limits [ $\text{mean} \pm 3 \text{ STD}$ ], such that they were not considered for analysis.



## 5.4 Results

### *Stability of cardiac indices recorded during control states*

We first investigated the evolution of cardiac indices in the control period at the beginning of the successive repetitions (P1-3) of the protocol. There was a significant variation of the mean values of SP ( $p=0.032$ ) and AA ( $p=0.045$ ) (Figure 1A, Table I). Post-hoc contrast analysis showed a significant decrease of SP and increase of AA from P1 to P2-P3 ( $p=0,038$  and  $p=0,042$  respectively), but no difference between P2 and P3. The variances of the physiological variables were not homogeneous across repetitions (Bartlett's test for each variable and each dog, all  $P < 0.001$ ). However, there was no systematic time trend in these values (non parametric Friedman's test,  $p>0.25$ , Figure 1B) and all cardiovascular variances remained minimal (except for AA of dog 2 at P3).

There was also no systematic pattern of correlation between the means of the three physiological variables. As illustrated in Figure 2A, three dogs (4, 6 and 7) had a similar correlation patterns (a high positive correlation between AA and AV and a high negative correlation for the SP and both AV and AA) that were compatible with the classical view of the CANS impacts on these variables. The other four dogs showed no such systematic pattern of correlation. The pattern of correlations between the variations of the standard deviations was also not uniform (Figure 2B). Four dogs (2, 4, 6, and 7) showed a high positive correlation between the standard deviations of the SP, AA and AV, while the patterns of correlations were variable among the other three dogs.

Although the mean SF values were variable among both the dogs and the steps of the protocol (Table II), there was no significant statistical differences between repetitions (ANOVA:  $p=0.922$ , Friedman's non-parametric test,  $p=0.368$ ). Globally, there was a weak activity of the stellate, with a mean number of 2 to 3 spikes by heart beat (Bottom line in each cell of Table II). Figure 3A shows, for each dog, the correlation between the means of SF and the means of the physiological variables upon repetition of the protocols. The correlations between SF and the physiological variables were inconsistent. Three dogs (5, 6, and 7) showed a negative correlation between SF and both AA and AV intervals and a positive correlation between SF and SP, whereas one dog (4) showed the exact opposite and three had mixed patterns. As seen in Figure 3B, four dogs had high positive correlations between SF and the standard deviation of the physiological variables, while it was negative or null for the three other dogs. Finally, the global mean across the protocols was calculated for each dog and each variable, but no significant correlation was found between these mean variables (Black Boxes, Figure 3A, and Figure 3B)

#### *Systemic nicotine injections*

*Systolic Pressure.* Overall, the response of each dog generally remained invariant for the repetitive injections. Nicotine always induced a gradual increase of SP, followed by a slow exponential return to either the baseline or to a new stable value (Figure 4A and Figure 4E). The amplitude of the increase of the systolic pressure ( $\Delta SP$ ) varied among the dogs, their individual mean  $\Delta SP$  varying from 37 to 112 mmHg. Considering each dog individually, the largest difference between the  $\Delta SP$  induced by the three systemic injections was between 7.4 and 32 mmHg ( $18.2 \pm 9.6$ ). However, there was no systematic trend across

the three systemic injections (Table III,  $p=0.16$ ). The mean values  $T_B$ , the time from the injection to the onset of the SP response, were distributed between 8.5 and 30 seconds ( $18.4 \pm 6.9$ ), while the mean times to reach the maximum after the onset of the response ( $T_{Max} - T_B$ ) were distributed from 13 to 46 seconds ( $23.5 \pm 12$ ). Repeated injections did not change these two times ( $p=0.066$  and  $p=0.219$  respectively). Hence, overall the pattern of the responses was similar for all dogs, despite variations in amplitude,  $T_B$  and  $T_{Max} - T_B$ .

*Atrial rhythm.* Following nicotine administration, the most typical pattern of AA variation was a highly unstable bradycardia followed by a slow return to either a new or to the pre-injection stable state (Figure 4B and Figure 4F). This behaviour was observed for all injections in five of the seven dogs (3, 4, 5, 6, and 7). The two remaining dogs started with a tachycardia, followed by fluctuations which ended with a slow return to basic rhythm from a low amplitude tachycardia. In summary, early high amplitude fluctuations were superimposed on a long lasting bradycardia or tachycardia. The characteristics of the responses were highly variable among the dogs: mean amplitude from 0.2 to 3 seconds ( $1.15 \pm 1.09$ ),  $T_B$  from 11 to 22 seconds ( $16.95 \pm 4.86$ ), and duration of the high amplitude fluctuations from 12 to 25 seconds ( $17.05 \pm 5$ ). However, only  $T_B$  shows a significant repetition effect ( $p=.038$ , Table III), being shorter at P1 than P2 and/or P3 (and: 4 dogs, or: 3 dogs).

*AV conduction time.* As for AA, AV was characterized by an early phase with high amplitude fluctuations, followed by a slow return to either a new or the pre-injection baseline. The high amplitude fluctuations occurred around a mean value that was either higher (e.g. Figure 4C, occurring in 3 dogs) or lower (e.g. Figure 4E, seen in 4 dogs) than the baseline. All except one dog remained coherent, presenting the same pattern for all 3

systemic injections. The last dog showed dynamics that differed in one of the injections. Response characteristics also varied among the dogs: mean amplitude from 28 to 141 milliseconds ( $79 \pm 42$ ),  $T_B$  from 10 to 24 seconds ( $17.6 \pm 5.6$ ), and duration of the high amplitude fluctuation from 9 to 22 seconds ( $17.4 \pm 5.3$ ). There was a significant increase of the duration of responses (Table III,  $P=.005$ ) due primarily to P1 being shorter than P2 and P3 (P1 vs P2-3,  $p=.016$ , P2 vs P3,  $p=.068$ ). The change of  $T_B$  was also close to being statistically significant ( $p=.054$ ), the onset of the response being earlier in P1

*Coherence of the physiological response.* The high amplitude AA and AV fluctuations occurred during the rising phase of SP (Figure 4). Statistical comparisons of the onset times (i.e.  $T_B(\text{SP})- T_B(\text{AV})$ ,  $T_B(\text{SP})- T_B(\text{AA})$ ,  $T_B(\text{AA})- T_B(\text{AV})$ ) and of the duration of the responses (SP, time to reach the maximum, AA and AV, duration of the high amplitude phase) all concluded that they were not different. Even if all the responses were beginning close to one another, the saw tooth dynamics of AA and AV obviously contrasted with the smooth gradual increase of SP. But the high amplitude fluctuations of AV and AA mostly occurred during the rising phase of the SP and ended up when SP reached its maximum. However, there was no fixed relation between the AA and AV dynamics since instances of acceleration of the AV conduction were observed in both tachycardia and bradycardia backgrounds. The mean amplitudes of the responses among the dogs were positively correlated ( $r= \text{SP-AA.}, 0.10$ ,  $\text{AV-AA}, 0.44$ ,  $\text{SP-AV. } 0.75$ ), but only the latter was close to statistical significance ( $p=.051$ ).

*Stellate firing.* Systemic nicotine injection induced a huge increase in SF that was similar during the repetitions (c.f. Figure 5 and Table III;  $\Delta\text{SF}$  which mean value is over 100 spikes/second). In 6 of the 7 dogs, the pattern of the SF response was similar for the 3

injections. Table III shows that  $T_B$  and the duration of the response ( $\Delta t = T_E - T_B$ ) were similar for the physiological data and SF: both the increased SF and the high amplitude fluctuations of AV and AA generally occurred together during the rising phase of SP. In all but one dog, the increase of SF was synchronized with the increase of the pressure (Figure 5) even if the changes of AA and AV started before the change of pressure (e.g. in the left column panels of Figure 5). In the remaining dog, SF, AV and AA changes started before that the pressure increases began. Figure 6 displays the relation between  $\Delta SF_{\max}$  and the amplitude of the physiological changes in the different injections. It shows that the change in maximum SF did not have a fixed relationship with the amplitude of the change of the physiological data.

#### *Local nicotine injection*

Figure 7 illustrates the typical time course of the SG neuronal response to local administration of nicotine: an early, brief and high burst of activity (Table IV,  $T_B$ ,  $T_{\max}$ ) without much impact on the physiological variables.  $T_{\max} - T_B$  was never longer than 1.7 s.  $T_B$  and  $T_{\max}$  had minimal variance and were consistent following the 3 injections and the 3 repetitions of the protocol (2-way repeated measures ANOVAs: Protocol,  $P > 0.16$ , Injection,  $P > 0.20$  Protocol\*Injection,  $P > 0.5$ ).

In some instances, the early firing peak was followed by a sustained low but nonetheless above baseline level of activity lasting up to 10 seconds (Figure 7, left column panels). This explains the values presented in Table IV where the duration of response had in some instance large mean and variance values, with considerable differences between the mean and median. Neuronal responses always began earlier and were much shorter than the

response induced by systemic administration (Table IV vs Table III,  $T_B$  from 2 to 4 vs 15 to 21 seconds, duration from 1.5 to 8.5 vs 22 to 26 seconds). Overall, physiological data did not change significantly in the interval during which SF remained above baseline. However, in one dog, high amplitude systemic changes began as the SG neurons became excited and remained elevated after SG neuronal activity had returned to baseline values.

There was no significant effect on the maximum and mean change of SF coming from the repetition of protocol and/or injection (Table IV). On the other hand, the amplitude of neuronal responses was inhomogeneous both among and within individual dogs (Table V and Table VI). The averages of the maximum and mean neural response for local and systemic injection of nicotine were computed for each dog. The correlations between these local and systemic values were calculated to assess the relation between the effects induced by the two types of intervention. The correlations were 0.36 and 0.29 for  $\Delta SF_{\max}$  and  $\Delta SF_{\text{mean}}$  respectively, both below statistical significance ( $p=0.42$  and  $0.53$ ), confirming that the mechanisms mediating the increase of the firing rate differed for the two administration methods.

## **5.5 Discussion**

### **Control conditions**

In this study, the control value of the systolic pressure and the heart rhythm were stabilized after the first application of the protocol, while there was no significant trend for the other variables. Besides, as seen in Figure 3, all correlations of SF with either the mean value or the standard deviation of the physiological variables were spread between -1 and 1 across the subjects. This suggests that the way the CANS both reacts and participates to the changes of the basic physiological state might be specific to each individual. Moreover, as seen in Table I and Table II, some dogs had quite different SF in the second (P2) and third step (P3) of the protocol, while their physiological state remained the same. This suggests that, after each injection, the CANS could be reset to a new state associated to a different tonus in the stellate ganglion even for the same value of the physiological variables. It must be acknowledged that recordings of the left stellate ganglion neural firing can provide only a partial picture of the sympathetic cardiac nervous system. Nevertheless, according to the classical view of the left/right specialisation of the stellate ganglion (Shih 1985), a significant negative correlation could at least be expected between SF and AV, which was found only for a subset of dogs.

It can be also argued that even four electrodes cannot provide a representative picture of the activity of the stellate ganglion, which is a complex network embedding efferent neurons, interneurons and maybe also afferent neurons (Shih1985). As shown in Table II, SF was in most cases very low during the control periods. This poor neuronal

activity was not due to the absence of neurons close to the electrodes, as proven by the high firing induced by the local and systemic nicotine injections. Further studies are still needed to elucidate if, as suggested by our data, there is subpopulation of dog for which stable state can be maintained without much cardiac nervous sympathetic feedback.

### **Local nicotine**

Local nicotine injection provides an effective way to reproducibly activate intrathoracic (peripheral) ganglion neurons while eliciting minimal systemic cardiovascular effects. Its fast and brief effect excludes any important contribution of the central nervous system and permit to concentrate the study the intrinsic properties of the ganglion. Altogether, there was no systematic change between the different injections and repetitions of the protocol (Table IV). However, no clear explanation can be provided for the fluctuation of the response that could occur both within and between the steps of the protocol ( $\sigma_B$  and  $\sigma_W$  respectively, in Table V and Table VI). Nevertheless, there was always an important amplification of the response compared to pre-injection firing.

Recently, calcium fluorescence dye imaging has been adapted to monitor both the macroscopic function of brain circuits and the activity of individual neurons potentials in vivo preparation (Garaschuk 2006). If this technique could be adapted to record in the stellate ganglion, local nicotine injection could supply an appropriate stimulation to identify the neurons and study in the local dynamics of the intact network with minimal external feedback interference.



## **Systemic nicotine**

Systemic injection of nicotine has complex cardiovascular effects resulting from its action on multiple cellular targets. These include the sympathetic nerve terminals, the adrenal medulla, the sympathetic ganglia, the chemoreceptors of the carotid and aortic arch, as well as sites of the central nervous system. It also acts directly on vascular smooth muscle by among other thing stimulating the release of epinephrine from local nerve terminals (Diana 1990). The nicotinic activation of carotid chemoreceptors has been extensively studied in conscious and anesthetized canine preparations. In conscious dog, the injection of nicotine was shown to induce a biphasic response. The first phase, with intense bradycardia and an increase of the systemic arterial pressure, was followed by a second phase characterized by tachycardia and a decrease of the systemic pressure. The second phase, concomitant with an increase in the depth and rhythm of the respiration, was associated with the pulmonary inflation reflex (Nagata 1988, Zimfer 1981). In fact, the amplitude of the first phase was amplified and the second phase suppressed by the control of the respiration (Rutherford 1978, Murrau 1984). Interestingly, Stern and Rapaport, working with anesthetized dogs, reported a differential effect of nicotinic stimulation of the aortic and carotid chemoreceptors: both increased the systemic pressure, but were respectively associated to tachycardia and bradycardia (Stern 1967). The characteristics of the response can be changed by the anaesthesia. Alpha-chloralose, although less disturbing than other anaesthetics, was still reported to decrease the amplitude of the first phase of the response (Zimfer 1981, Cox 1972). However, in all these studies on nicotinic chemoreceptor activation, nicotine was injected close to the receptor with doses that were at least tenfold inferior than those used in our experiments.

The baroreceptors also react to the systemic increase of pressure induced by the chemoreceptors activation. Results on the effect of alpha-chloralose on the baroreceptors sensitivity are contradictory. It was reported to be enhanced by Brown et al. and Armstrong et al. (Brown 1956, Armstrong 1961), but lessened by Cox et al. (Cox 1972).

In our experiments, the dogs were anesthetized using alpha-chloralose and the respiration was controlled. The time course of the pressure was similar to that observed under nicotinic chemoreceptor stimulation in similar experimental setup, but with higher amplitude and longer delay. This may be explained by the high dose that was injected and by the more peripheral site of injection. It could lead to a more global systemic response that may have involved, besides the aortic and carotid chemoreceptors, the release of epinephrine from local nerve terminals controlling the contraction of vascular smooth muscles and of ventricular myocytes and the positive inotropic effect resulting from the direct nicotinic activation of the stellate ganglions.

In five of the seven dogs, the bradycardia underlying the beat to beat fluctuations of the heart rhythm was also consistent with what has been observed upon chemoreceptor activation. Since the heart rhythm results from the antagonistic cholinergic and adrenergic effects, differences in the gain and sensitivity of the multiple components of two systems might explain why tachycardia was observed in two other dogs, and why the dynamics of the atrio-ventricular node was variable. Albeit different AA and AV dynamics were observed among the dogs, it is striking that each dog generally maintained an identical

pattern of response upon the repetitive systemic injections of nicotine. This suggests that each dog, even if it may cope differently with multiple inputs, maintain a coherent response that would allow an investigation of the different feedback loops.

All dogs also displayed a similar pattern of stellate activity: an enormous and prolonged increase of the firing rate, concomitant with the rising phase of the pressure. As shown in Figure 4, wide beat-to-beat fluctuations were superimposed to the bell shape mean pattern of firing. Although such wide fluctuations were also present in AA and AV, there was no simple consistent relations between these and those of SF. High SF was always occurring on a background elevated pressure, which means that the direct nicotinic activation of the ganglion was certainly somewhat counterbalanced by central baroreceptor-driven inhibition. It may explain that, for most dogs, the increase of pressure was occurring in a background of bradycardia. This suggests that SF effect was counterbalanced by a high cholinergic input to sinus node.

*Limitations:* The huge amplification induced by local and systemic nicotine in all dogs proved that there was always a subpopulation of neurons near the four recordings electrodes. However, the extent to which the recordings faithfully represent the global firing rate of the stellate remained unknown, particularly in the control period where the SF was very low in a subset of dogs. Techniques like diffuse optical imaging, which relies on the absorption spectrum of hemoglobin varying with its oxygenation status, could provide an index of the global activity of the stellate (CRC press 2002). Simultaneous optical and electrical recordings will thus provide complementary information to assess the

representativeness of the electrically-derived SF. However, it is doubtful that even multiple-electrical recordings can ever provide a clear picture of the computations performed by the different population of neurons in the stellate ganglion. For this, recent advances in calcium fluorescence dye imaging appear more promising.

## ***5.6 Conclusion***

The relation between the cardiovascular indices and the firing of the SG was variable among the dogs. However, each dog was coherent with itself over the protocols. This conclusion definitely influences the interpretation of future experiment results, as it shows that no stimuli response is unique in dogs. Each dog will have to be compared with itself in further studies of the feedback pathways to verify the presence of a stimuli response change.

### **Acknowledgment**

This work was performed thanks to grants from the Alberta Heart and Stroke foundation and of Mitacs. We also thank Caroline Bouchard for her expert technical assistance.

## 5.7 *Bibliography*

1. Armour JA (1983) Synaptic transmission in the chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of the dog. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 61: 1149-1155.
2. Armour JA (1984) Activity of in situ middle cervical ganglion neurons in dogs, using extracellular recording techniques. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63: 704-716.
3. Armour JA (2007) *Cardiac nervous system*, Montréal, Université de Montréal.
4. Armour JA, Collier K, Kember G, Ardell JL (1998) Differential selectivity of cardiac neurons in separate intrathoracic autonomic ganglia. *American Journal of Physiology*, R939-R949.
5. Armour JA, Hopkins DA (1981) Localization of sympathetic postganglionic neurons of physiologically identified cardiac nerves in the dog. *The Journal of Comparative Neurology*, 202: 169-184.

6. Armour JA, Janes RD (1987) Neuronal activity recorded extracellularly from in situ canine mediastinal ganglia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66: 119-127.
7. Armstrong CG, Porter H, Langston JB (1961) Alteration of carotid occlusion response by anaesthesia. *American Journal of Physiology*, 201: 897-900.
8. Berne, RM, Levy, MN (1981) *Cardiovascular Physiology*. St-Louis, The C.V. Mosby Company.
9. Blink, JR. (1956) Positive chronotropic effect of increasing right atrial pressure in the isolated mammalian heart. *American Journal of Physiology*, 186: 299-303.
10. Brown RV, Hilton JG (1956) The effectiveness of the baroreceptors reflexes under different anaesthetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 118: 198-203.
11. Coumel P (1994) Paroxysmal atrial fibrillation: role of autonomic nervous system. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux*, 3: 55-62.
12. Cox RH (1972) Influence of chloralose anaesthesia on cardiovascular function in trained dogs. *American Journal of Physiology*, 223: 660-67.

13. Cox RH, Bagshaw RJ (1979) Influence of anaesthesia on the response to carotid hypotension. *American Journal of Physiology*, 237: H424-H432.
14. Diana JN, Quian S, Heesch CN, Barron KW, Chien CY (1990) Nicotine-induced skeletal muscle vasodilatation is mediated by release of epinephrine from nerve terminals. *American Journal of Physiology*, 259: J1718-J1729.
15. Dubeau S, Vinet A, Richer LP, Guardo R, Armour JA (2006) Development of a multichannel system for intrinsic cardiac neural recording. *Proceedings of the 28th IEEE-EMBS Conference*, New York, Supp. p.1-4
16. Elias M (2000) Cervical sympathetic and stellate ganglion blocks. *Pain Physician*, 3: 294-304.
17. *In Vivo optical Imaging of Brain Function*, R.D. Frostig eds, CRC press, New-York, USA, 2002
18. Garaschuk O, Milos R, Grienberger C, Nima Marandi N, Adelsberger H, Konnerth A, Pflugers A (2006) Optical monitoring of brain function in vivo: from neurons to networks. *European Journal of Physiology*, 453: 385–396
19. Garrey WE (1924) Auricular fibrillation. *Physiology Reviews*, 4: 215-250.

20. Halliwill JR, Morgan BJ, Charkoudian N (2003) Peripheral chemoreflex and baroreflex interactions in cardiovascular regulation in humans. *Journal of Physiology*, 552: 295-302.
21. Hockett JG, Abboud FM, Mark AL, Schmid PG, Heistad DD (1972) Coronary vascular responses to stimulation of chemoreceptors and baroreceptors. *Circulation Research*, 31: 8-17.
22. Hollander M, Wolfe DA (1973) *Nonparametric statistical method*. J Wiley & Sons.
23. Mallani A, Pagiani M, Lombardi F, Cerutti S (1991) Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 84: 482-492.
24. Masliukov PM (2001) Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 89: 48-53.
25. Masliukov PM, Pankov VA, Strelkov AA, Masliukova E, Shilkin VV, Nozdrachev AD (2000) Morphological features of neurons innervating different viscera in the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 84: 169-175.



26. Maslyukov PM, Shilkin VV, Timmermans JP (2006) Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis. *Neuroscience and Behavioural Physiology*, 36: 851-855.
27. Masayoshi N, Pichet R, Lavallee M. (1988) Coronary dilation with carotid chemoreceptor stimulation in cardiac-denervated dogs. *American Journal of Physiology*, 255: H1330-H1335.
28. Murrau PA, Lavallée M, Vatner SF (1984) Alpha-adrenergic-mediated reduction in coronary blood flow secondary to carotid chemoreceptor reflex activation in conscious dog. *Circulation Research*, 54: 96-106.
29. Nagata M, Pichet R, Lavallée M. (1988) Coronary dilation with carotid chemoreceptor stimulation in cardiac-denervated dogs. *American Journal of Physiology*, 25: H1330-H1335.
30. Nozdrachev AD, Fatveev MM, Jiménez B, Morales MA (2003) Circuits and projections of a stellate ganglion. *Archives of Medical Research*, 34: 106-115.
31. Pagani M, Montano M, Porta A, Malliani A, Abboud F, Birkett C, Somers V (1995) Relationship between component of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in human. *Circulation*, 95: 1441-1448.

32. Rutheford JD, Vatner SF (1978) Integrated carotid chemoreceptor and pulmonary inflation reflex control of peripheral vasoactivity in conscious dogs. *Circulation Research*, 43: 200-208.
33. Shih CJ, Chuang KS, Tsai SH, Liu JC (1985) Horsadish peroxidase localization of the sympathetic postganglionic neurons innervating the cat heart. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 13: 179-189;
34. Snedecor GW Cochran WG (1980) *Statistical methods*, Iowa State University, Ames, Iowa.
35. Stern S, Rapaport E (1967) Comparison of the reflexes elicited from combined or separated stimulation of the aortic and carotid chemoreceptor on myocardial contractility, cardiac output and systemic resistance. *Circulation Research*, 20: 214-227.
36. Stickland MK, Morgan BJ, Dempsey JA (2007) Carotid chemoreceptor modulation of sympathetic vasoconstrictor outflow during exercise in healthy humans. *Journal of Physiology* 586.6: 1743-1754.

37. Thompson GW, Collier K, Ardell JL, Kember G, Armour JA (2000) Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglionated plexus. *Journal of Physiology*, 528: 561-571.
38. Vonesh EF, Chinchilli VM (1977) Linear and non-linear model for the analysis of repeated measurements, Marcell Dekker Inc., New York
39. Vatner SF, McRitchie RJ (1975) Interaction of the chemoreflex and the pulmonary inflation reflex in the regulation of coronary circulation in conscious dogs. *Circulation Research*, 37: 664-673.
40. Zimmermann M, Kalusche D (2001) Fluctuation in autonomic tone is a major determinant of sustained atrial arrhythmias in patients with focal ectopy originating from the pulmonary veins. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12: 285-291.
41. Zimpfer N, Sit SP, Vatner SF. (1981) Effect of anaesthesia on the canine carotid chemoreceptor reflex. *Circulation Research*, 48: 400-406.

## 5.8 Legend

Figure 1 : Change of the mean and standard deviation of AA, SP and AV during control periods.

From left to right, change of the mean (A) and standard deviation (B) of AA, SP and AV in the control period of P2 and P3 relative to control period of P1 in each dog, which number appears on the right of each trace. The blue lines in A correspond to mean and standard deviation.

Figure 2 : Correlation between the mean control values and the standard deviations of SP, AA and AV during control periods.

A) Correlation between the mean control values of SP, AA and AV in P1 to P3 for each dog. B) Idem for standard deviations

Figure 3 : Correlation of mean SF with the mean and standard deviations of SP, AA and AV for the control periods.

Correlation within each dog of mean SF with the mean (A) and standard deviations (B) of SP, AA and AV for the control periods of the three steps of the protocol. The black squares are the correlation between the mean values in the populations (A) and their standard deviation (B).

Figure 4 : Time course of the response following a systemic injection of nicotine for two dogs.

Subplots A to D are results of dog 3 P3 and subplots E to H of dog 4 P3. From top to bottom: SP, AA, AV and SF. Responses are given as a difference from the mean value calculated in the 20 seconds preceding the injection at time 0. The horizontal lines are located at  $\pm 3$  standard deviations calculated from the last 20 seconds before the injection.

Figure 5 : Dog neuronal reactions to systemic injections of nicotine.

For each dog, Right panel:  $\Delta SF_{\text{mean}}$ , the maximum of the response (Spikes/S) to systemic injection of nicotine measured from the mean value in the control period ( $SF_c$ ) for each step of the protocol, from P1 to P3. Left panel:  $\Delta SF_{\text{max}}/SFC$ . SF was determined within each heart cycle.

Figure 6 : Relations between physiological data and SF firing responses of dogs following systemic nicotine injections.

Relation between the amplitude of physiological response to systemic nicotine injection (abscissa, from top to bottom  $\Delta SP$ ,  $\Delta AA$ ,  $\Delta AV$ ) and the change in SF firing (ordinate, in log scale) for each dog. The open circles are the response at P1, the gray circles at P2 and the black circles at P3.

Figure 7 : Time course of the response following a local injection of nicotine for 2 dogs

Left: dog1, p2, second injection. Right: dog4, p2, third injection. Injection occurs at time 0. From top to bottom, variation of AA (ms), AV (ms), SP (mmHG) and SF (Sp/S) measured

from the mean value of the last 100 sec. prior to injection. The black line are at  $\pm 3 *$  standard deviation of the control period.

## 5.9 Tables and figures

Table I: Mean values and standard deviation of the heart rhythm (AA), systolic pressure (SP) and atrio-ventricular conduction time (AV) in the control period at the beginning of each repetition of the protocol (P1 to P3).

|              | AA(ms)   | SP(mmHg)     | AV(ms)       |
|--------------|----------|--------------|--------------|
| P1           | 403 ± 49 | 131.6 ± 23.2 | 106.5 ± 18.4 |
| P2           | 451 ± 88 | 111.2 ± 20.8 | 112.7 ± 19.0 |
| P3           | 457 ± 90 | 111.6 ± 32.7 | 108.1 ± 13.5 |
| Prot. Effect | 0.032    | 0.045        | 0.361        |

The last value of the column corresponds to the significance of the changes assessed by repeated measure ANOVA.

Table II : *Firing of the stellate ganglion during the control periods of P1 to P3 for each dog.*

| dog               | P1   | P2   | P3  |
|-------------------|--|--|---|
| 1 Sp/s<br>Sp/beat | $0.37 \pm 0.95 / 0.39$<br>0.17                       | $7.21 \pm 11.82 / 7.23$<br>3.89                    | $0.32 \pm 0.98 / 0.32$<br>0.18                    |
| 2                 | $1.93 \pm 3.17 / 1.97$<br>0.91                       | $3.87 \pm 5.21 / 3.88$<br>2.33                     | $3.37 \pm 3.93 / 3.75$<br>2.27                    |
| 3                 | 0 / 0<br>0   | $6.30 \pm 30.32 / 6.30$<br>2.63                    | $26.04 \pm 63.59 / 25.93$<br>11.35                |
| 4                 | 0 / 0<br>0   | $0.88 \pm 1.92 / 0.88$<br>0.33                     | $0.66 \pm 1.22 / 0.68$<br>0.25                    |
| 5                 | $1.56 \pm 4.06 / 1.56$<br>0.58                       | $2.18 \pm 3.41 / 2.18$<br>0.77                     | $0.16 \pm 0.84 / 0.16$<br>0.06                    |
| 6                 | $7.60 \pm 7.87 / 7.65$<br>2.66                       | $1.41 \pm 2.34 / 1.41$<br>0.60                     | $2.60 \pm 4.26 / 2.60$<br>1.13                    |
| 7                 | $29.07 \pm 116.06 / 29.18$<br>12.17                  | $11.98 \pm 15.60 / 11.97$<br>5.28                  | $8.17 \pm 9.88 / 8.19$<br>3.38                    |
| total             | $5.59 \pm 10.60 / 5.82 \pm 10.64$<br>$2.36 \pm 4.43$ | $4.83 \pm 3.92 / 4.84 \pm 3.90$<br>$2.26 \pm 1.85$ | $5.90 \pm 9.30 / 5.95 \pm 9.2$<br>$2.66 \pm 4.03$ |

The first line gives the mean and standard deviation of the firing rate (Spikes/sec) calculated within each heart cycle. The number following the / is the global firing rate: total number of spikes/duration of the control period. The number on the second line in the mean number of spike by heart cycle. The last line gives the mean values and its standard deviation of each measure across the population.



Table III : Mean and standard deviation ( $\sigma$ ) of the characteristics of the response to systemic nicotine injection in each repetition of the protocol, from P1 to P3.

|    | <b>SP</b> |               |                    |                     |                              |                        |
|----|-----------|---------------|--------------------|---------------------|------------------------------|------------------------|
|    | $T_B$ (s) | $\sigma(T_B)$ | $\Delta SP$ (mmHg) | $\sigma(\Delta SP)$ | $\Delta t(t_{\max}-t_B)$ (s) | $\sigma(\Delta t)$ (s) |
| P1 | 15.38     | 4.6           | 70.74              | 34.64               | 18.47                        | 6.2                    |
| P2 | 18.94     | 6.44          | 73.64              | 39.15               | 27.84                        | 17.91                  |
| P3 | 20.97     | 10.45         | 63.06              | 39.36               | 24.18                        | 16.01                  |
|    | <b>AA</b> |               |                    |                     |                              |                        |
|    | $T_B$ (s) | $\sigma(T_B)$ | $\Delta AA$ (s)    | $\sigma(\Delta AA)$ | $\Delta t(t_{\min}-t_B)$ (s) | $\sigma(\Delta t)$ (s) |
| P1 | 14.52     | 3.85          | 0.82               | 0.74                | 15.42                        | 4.47                   |
| P2 | 19.67     | 6.91          | 1.31               | 1.01                | 16.27                        | 7.35                   |
| P3 | 16.65     | 5.27          | 1.31               | 1.62                | 15.42                        | 4.47                   |
|    | <b>AV</b> |               |                    |                     |                              |                        |
|    | $T_B$ (s) | $\sigma(T_B)$ | $\Delta AV$ (s)    | $\sigma(\Delta AV)$ | $\Delta t(t_{\min}-t_B)$ (s) | $\sigma(\Delta t)$ (s) |
| P1 | 16.02     | 4.06          | 0.09               | 0.04                | 11.33                        | 6.86                   |
| P2 | 20.23     | 7.04          | 0.06               | 0.03                | 17.61                        | 11.18                  |
| P3 | 16.68     | 6.76          | 0.08               | 0.07                | 23.29                        | 11.55                  |
|    | <b>SF</b> |               |                    |                     |                              |                        |
|    | $T_B$ (s) | $\sigma(T_B)$ | $\Delta SF$ (Sp/s) | $\sigma(\Delta SF)$ | $\Delta t(t_{\min}-t_B)$ (s) | $\sigma(\Delta t)$ (s) |
| P1 | 15.61     | 6.06          | 180.64             | 248.05              | 22.8                         | 5.1                    |
| P2 | 20.68     | 9.07          | 152.94             | 105.68              | 23.31                        | 6.51                   |
| P3 | 19.67     | 11.88         | 107.44             | 104.85              | 26.76                        | 14.87                  |

$T_B$ : time from injection to the onset of the response for each variable. For each variable, the mean ( $M_C$ ) and standard deviation ( $S_C$ ) of the control period before each injection were calculated, and  $T_B$  was set as the moment from which the response remained beyond  $M_C \pm 3 S_C$ .  $\Delta SP$  and  $\Delta SF$  are the difference between the maximum response and  $M_C(SP)$  and  $M_C(SF)$  respectively. SF was calculated within each heart beat.  $\Delta AA$  and  $\Delta AV$  are the amplitude of the change (in absolute value) from the minimum to the maximum of the

response if these were on both sides of  $M_C$ , or from the extremum to  $M_C$  otherwise.  $\Delta t$  is the time interval for  $T_B$  to the maximum of the response for SP, and from  $T_B$  to the end of the response for the other variables.

Table IV : Mean value and standard deviation of the characteristic of neural response for each local nicotine injection.

| Injection | T <sub>B</sub> (s)    | T <sub>Max</sub> (s)  | Dur (s)                | ΔSF <sub>max</sub> (Sp/s)  | ΔSF <sub>max</sub> /SF <sub>ref</sub> | ΔSF <sub>mean</sub> (Sp/s) |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| P1-1      | 2.58 ± 0.89<br>(2.50) | 2.98 ± 1.10<br>(2.90) | 2.47 ± 3.30<br>(0.96)  | 114.66 ± 100.22<br>(80.65) | 115.17 ± 150.70<br>(22.92)            | 50.86 ± 24.40<br>(59.04)   |
| P1-2      | 2.43 ± 0.50<br>(2.31) | 2.76 ± 0.70<br>(2.52) | 1.69 ± 1.60<br>(0.89)  | 94.60 ± 48.37<br>(94.69)   | 104.84 ± 138.60<br>(43.50)            | 49.69 ± 22.69<br>(48.27)   |
| P1-3      | 2.35 ± 0.75<br>(2.56) | 2.73 ± 1.04<br>(2.67) | 2.19 ± 2.29<br>(1.04)  | 104.17 ± 48.26<br>(107.62) | 150.45 ± 184.02<br>(55.11)            | 53.75 ± 14.25<br>(57.92)   |
| P2-1      | 3.79 ± 2.08<br>(3.81) | 4.40 ± 2.11<br>(4.21) | 16.1 ± 25.67<br>(8.91) | 98.88 ± 49.15<br>(83.32)   | 30.32 ± 22.02<br>(27.41)              | 37.18 ± 17.12<br>(32.72)   |
| P2-2      | 3.71 ± 2.65<br>(3.15) | 4.07 ± 2.40<br>(3.15) | 5.13 ± 4.25<br>(5.39)  | 74.95 ± 49.50<br>(77.40)   | 62.50 ± 76.96<br>(19.72)              | 32.72 ± 20.08<br>(29.19)   |
| P2-3      | 3.64 ± 2.16<br>(3.50) | 4.06 ± 1.79<br>(3.91) | 8.55 ± 10.95<br>(4.34) | 72.29 ± 52.78<br>(71.03)   | 111.75 ± 196.67<br>(17.91)            | 33.33 ± 33.78<br>(24.49)   |
| P3-1      | 2.20 ± 1.06<br>(1.92) | 2.84 ± 1.33<br>(2.70) | 5.73 ± 3.79<br>(6.27)  | 74.14 ± 53.71<br>(90.73)   | 59.20 ± 95.82<br>(27.34)              | 36.53 ± 35.68<br>(16.82)   |
| P3-2      | 2.35 ± 0.96<br>(2.18) | 2.68 ± 0.96<br>(2.85) | 6.84 ± 8.31<br>(5.77)  | 95.06 ± 75.01<br>(70.22)   | 35.32 ± 20.07<br>(35.48)              | 53.67 ± 43.04<br>(44.84)   |
| P3-3      | 2.63 ± 0.67<br>(2.71) | 2.76 ± 0.76<br>(2.87) | 4.49 ± 4.13<br>(4.23)  | 81.14 ± 70.85<br>(53.55)   | 115.37 ± 213.06<br>(18.50)            | 41.08 ± 39.77<br>(22.80)   |

SF was calculated within each heart beat, and ΔSF calculated with respect to the mean SF in the 20 seconds preceding each injection. The numbers in parenthesis are the median values.

Table V : Value of maximum ( $\Delta SF_{\max}$ ) increase of SF for each dog and each injection.

| $\Delta SF_{\max}$ | 1      | 2*(P3-1) | 3#     | 4*(P1-1) | 5     | 6      | 7      |
|--------------------|--------|----------|--------|----------|-------|--------|--------|
| P1-1               | 68.70  | 297.60   | 37.72  | 93.00    | 19.90 | 205.02 | 80.65  |
| P1-2               | 94.69  | 127.04   | 20.06  | 78.39    | 51.60 | 155.13 | 135.28 |
| P1-3               | 108.14 | 60.24    | 57.92  | 107.62   | 63.51 | 183.28 | 148.48 |
| P2-1               | 151.66 | 162.07   | 134.00 | 83.32    | 44.82 | 57.65  | 58.67  |
| P2-2               | 113.60 | 77.4     | 151.01 | 94.42    | 41.52 | 6.08   | 40.60  |
| P2-3               | 95.01  | 74.81    | 173.37 | 71.03    | 46.80 | 9.06   | 35.91  |
| P3-1               | 90.74  | 104.22   | 154.64 | 22.82    | 10.58 | 29.91  | 106.06 |
| P3-2               | 19.91  | 164.15   | 173.98 | 70.22    | 18.60 | 37.69  | 180.83 |
| P3-3               | 80.43  | 44.28    | 235.49 | 83.20    | 34.05 | 53.55  | 53.55  |
| $\mu$              | 91.43  | 125.95   | 126.47 | 76.37    | 36.82 | 81.93  | 91.49  |
| $\sigma_B$         | 28.21  | 32.99    | 78.14  | 17.60    | 13.64 | 82.29  | 40.78  |
| $\sigma_W$         | 30.00  | 91.74    | 29.05  | 23.33    | 14.80 | 23.16  | 46.96  |

Table VI : Value of relative ( $\Delta SF_{\max} / \text{mean firing before injection}$ ) increase of SF for each dog and each injection.

| $\Delta SF_{\max}/SF_{\text{ref}}$ | 1      | 2*(P3-1) | 3#     | 4*(P1-1) | 5     | 6     | 7     |
|------------------------------------|--------|----------|--------|----------|-------|-------|-------|
| P1-1                               | 188.49 | 128.61   | 419.21 | 13.98    | 11.50 | 21.52 | 22.92 |
| P1-2                               | 155.64 | 43.50    | 401.46 | 20.56    | 27.87 | 35.00 | 49.85 |
| P1-3                               | 385.18 | 29.11    | 447.05 | 7.39     | 55.11 | 88.05 | 41.23 |
| P2-1                               | 20.13  | 37.83    | 36.02  | 72.41    | 14.03 | 27.41 | 4.44  |
| P2-2                               | 41.25  | 19.72    | 179.31 | 168.34   | 10.75 | 5.81  | 12.31 |
| P2-3                               | 62.14  | 17.91    | 127.18 | 546.67   | 9.96  | 10.17 | 8.18  |
| P3-1                               | 275.52 | 24.91    | 27.34  | 33.07    | 32.00 | 11.24 | 10.36 |
| P3-2                               | 14.7   | 37.48    | 41.17  | 72.28    | 35.04 | 11.08 | 35.48 |
| P3-3                               | 99.16  | 12.34    | 53.61  | 593.19   | 18.49 | 17.07 | 13.75 |
| $\mu$                              | 138.02 | 39.05    | 192.48 | 169.77   | 23.86 | 25.26 | 22.06 |
| $\sigma_B$                         | 101.21 | 24.75    | 202.62 | 135.73   | 10.74 | 19.87 | 14.97 |
| $\sigma_w$                         | 105.77 | 35.62    | 44.57  | 253.53   | 13.75 | 21.44 | 11.41 |

Table V and Table VI:  $\sigma_B$  is the standard deviation between the mean responses for each step of the protocol.  $\sigma_w$  is the pooled standard deviation calculated from the standard deviation within each step of the protocol. \* indicated the 2 dogs where the response was lost for the injection indicated in parenthesis. For these, the mean value for the two other injections in the same step of the protocol was used for ANOVA. However, these values were not considered in the calculation of the mean response ( $\mu$ ), of  $\sigma_B$  and  $\sigma_w$  in the table. # indicated the dog which had a systemic response for some injections.

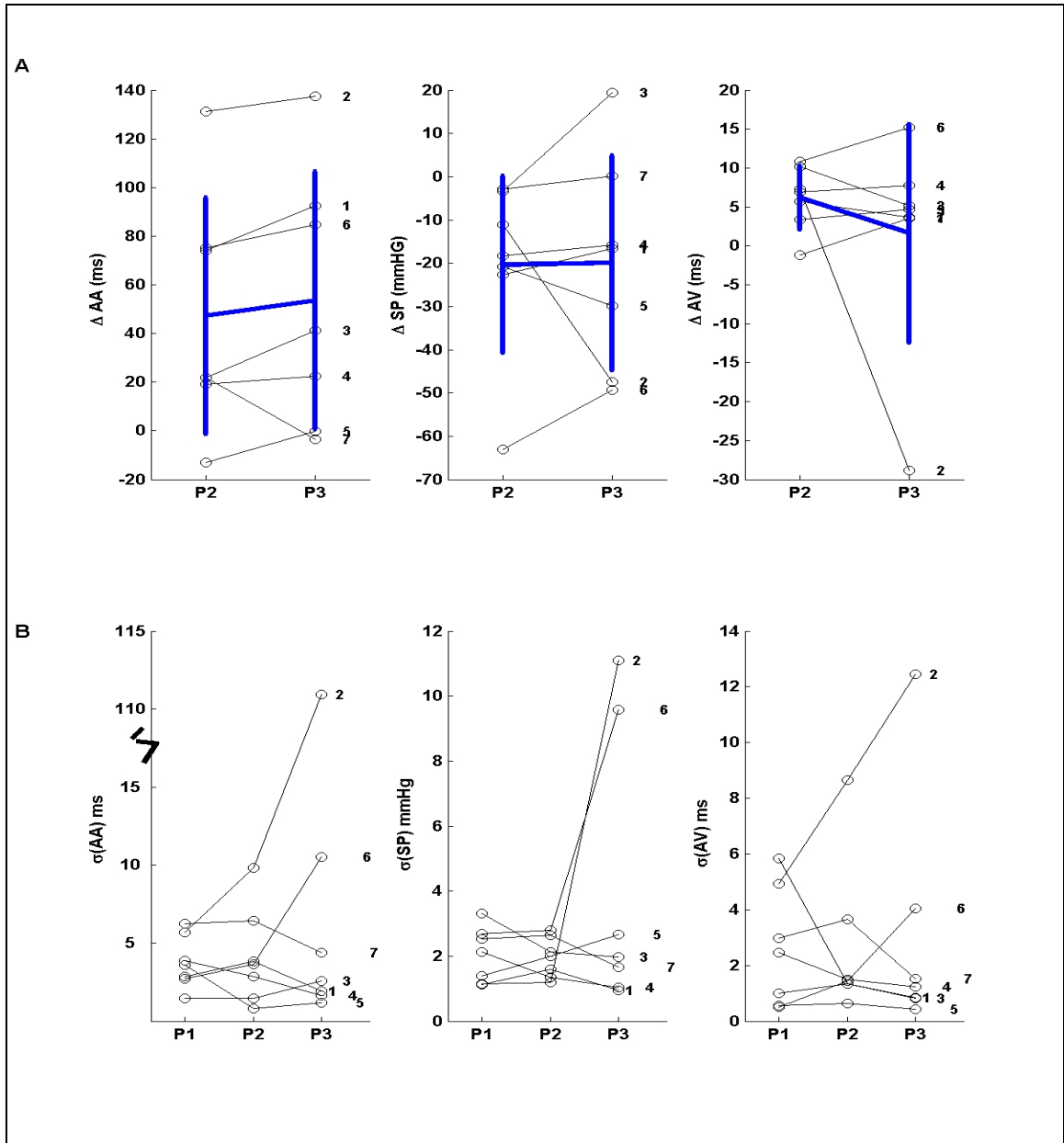


Figure 1

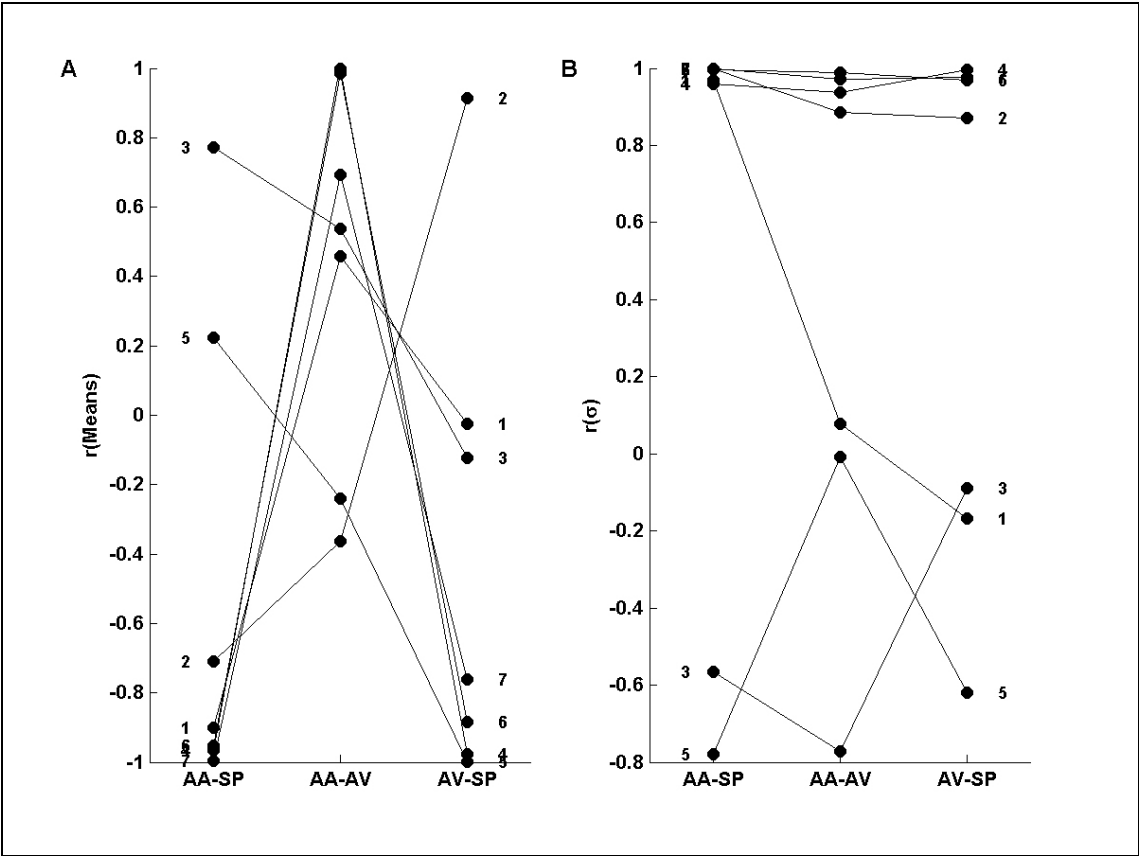


Figure 2



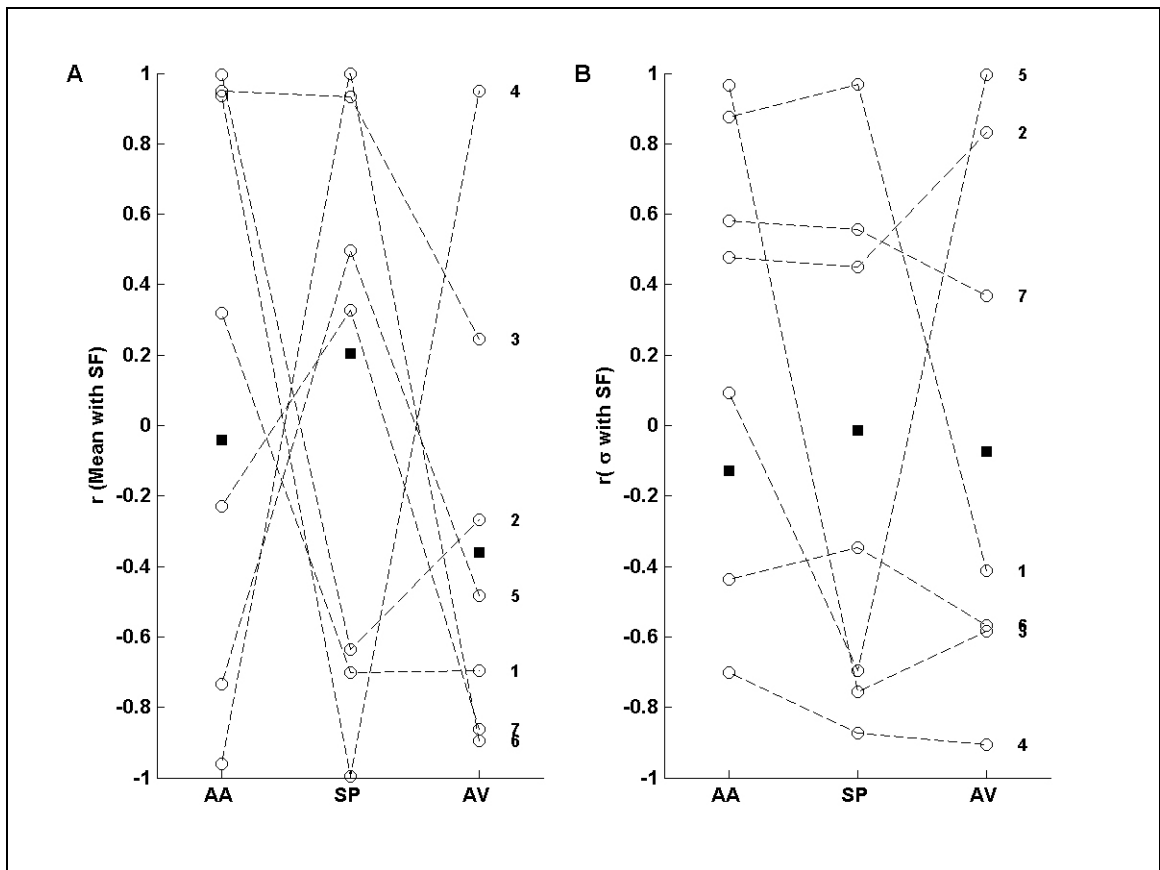


Figure 3

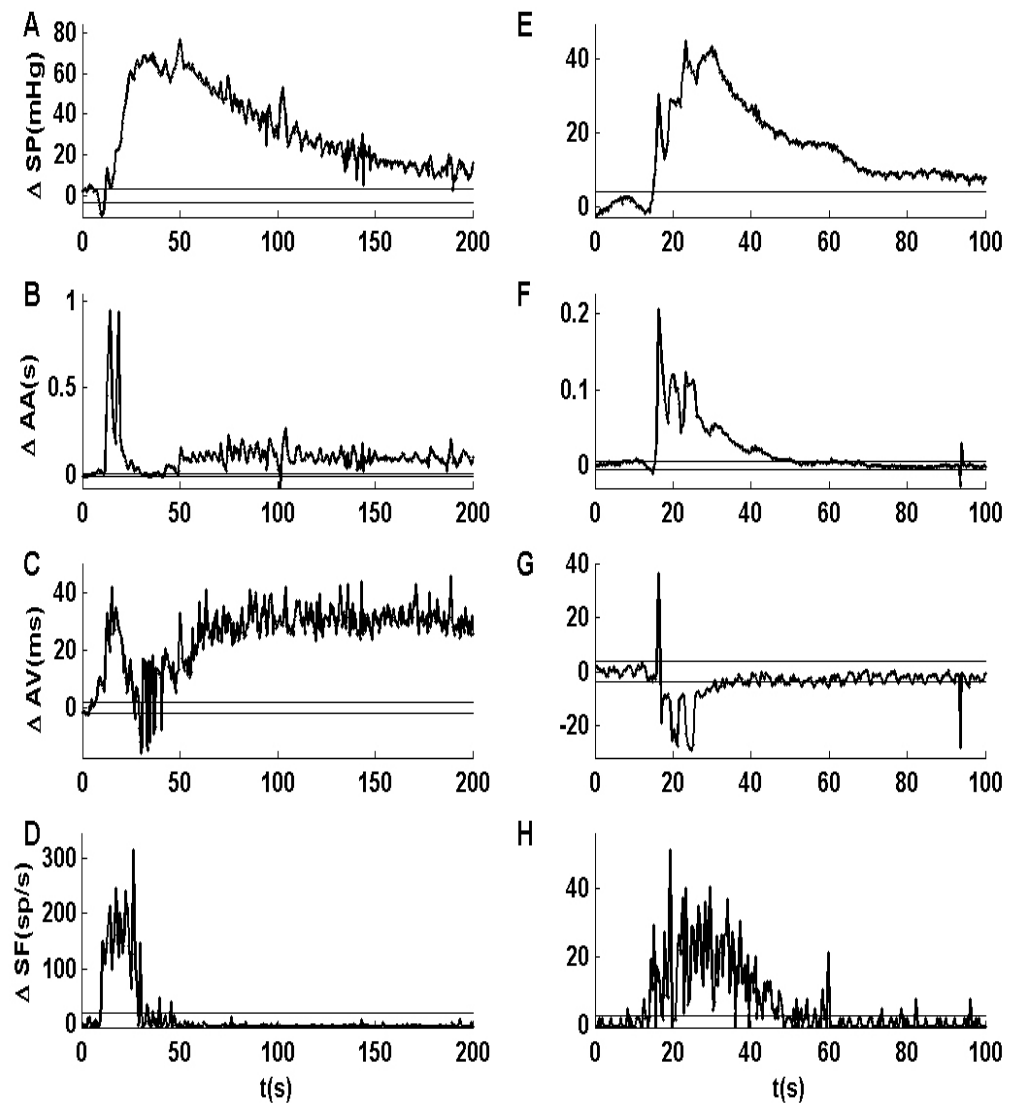


Figure 4

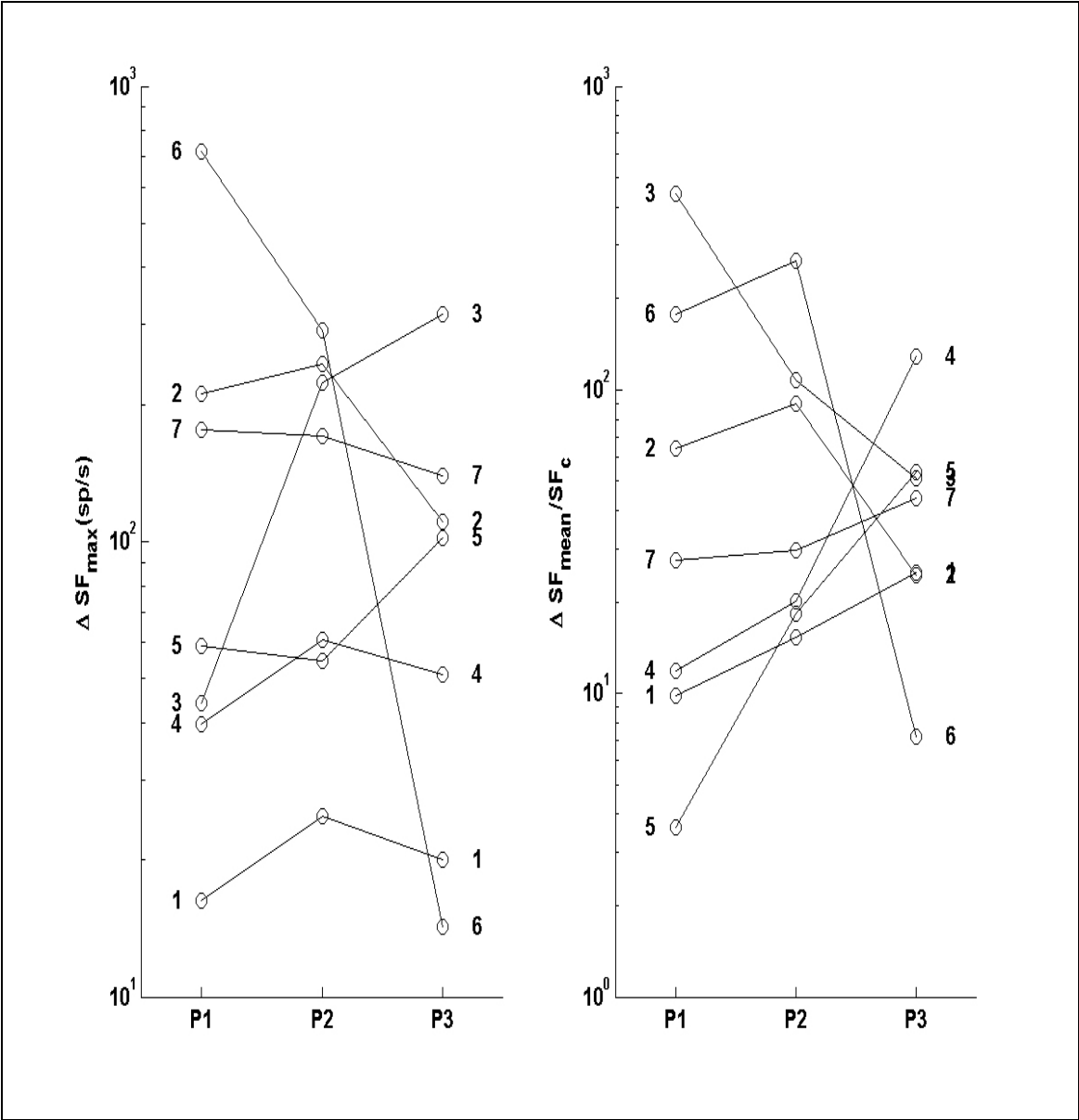


Figure 5

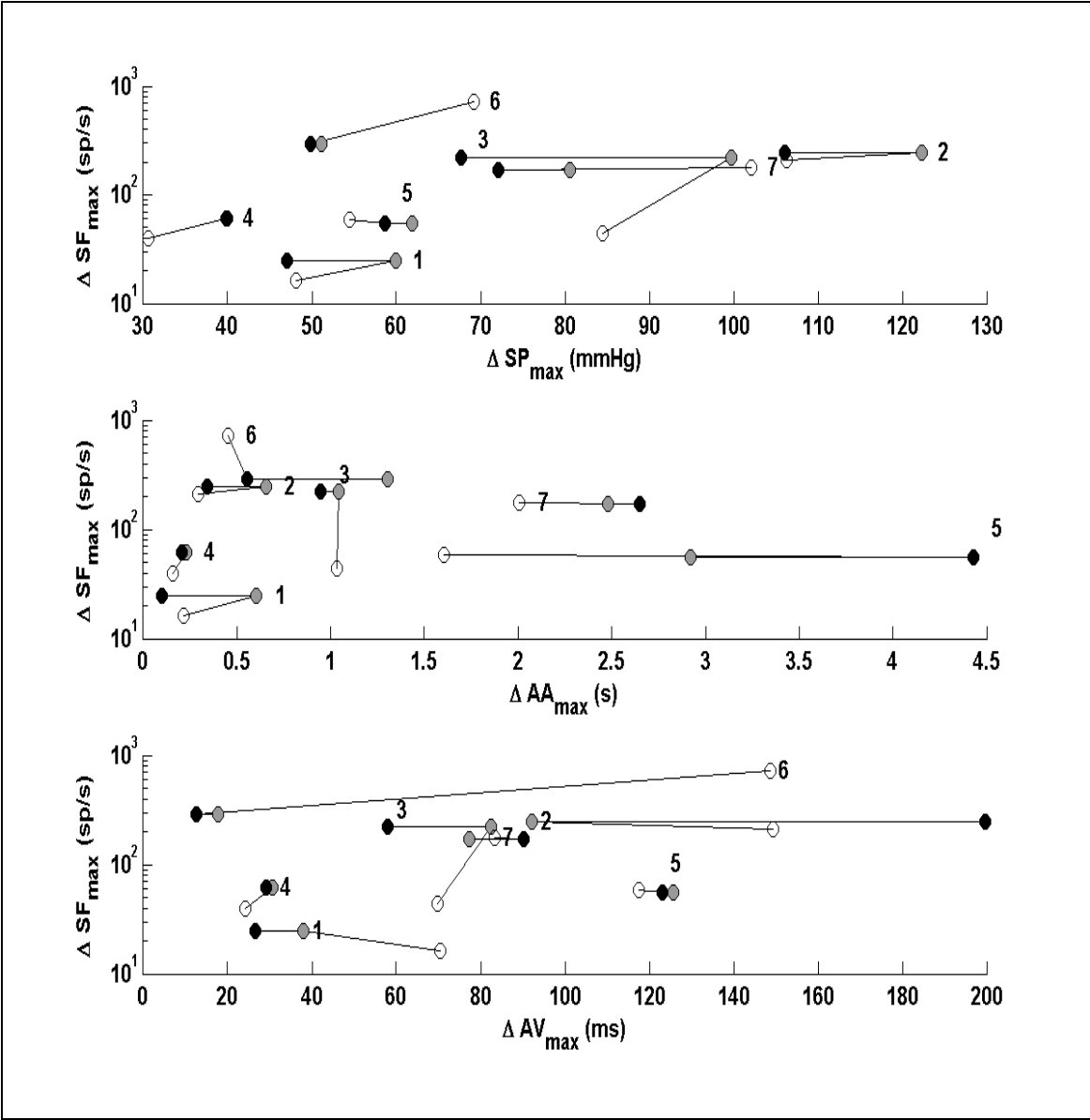


Figure 6

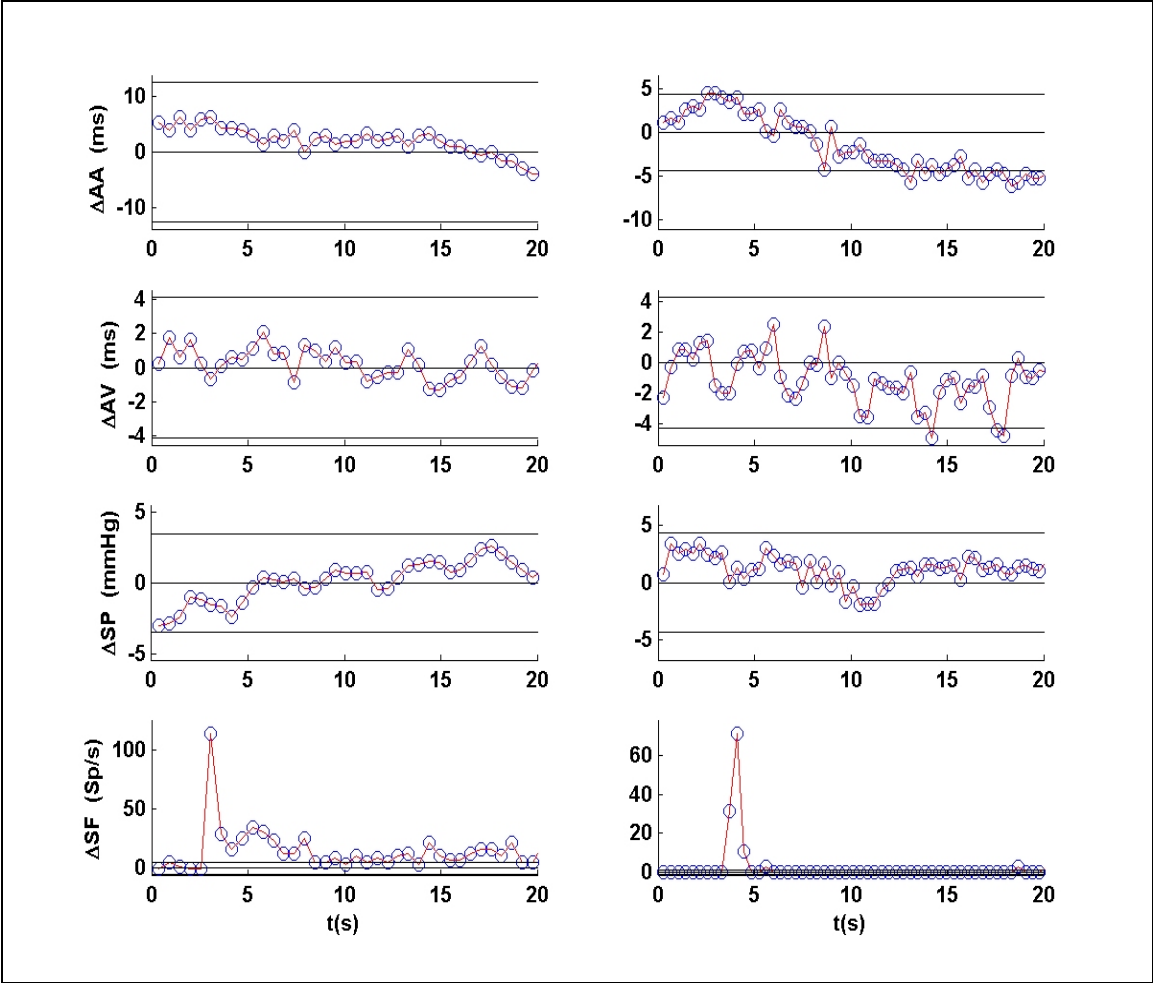


Figure 7

## Chapitre 6 - Discussion

Dans cette étude, les valeurs de contrôle de la pression systolique et du rythme cardiaque sont demeurées stables après la première application du protocole. Il n'y a pas eu de tendance significative pour les autres variables. De plus, comme il est illustré dans la Figure 3 de l'article, toutes les corrélations de l'activité du ganglion stellaire (GS) avec les valeurs moyennes ou les déviations standards de ces variables physiologiques varient de -1 et 1 dans l'ensemble des sujets. Cela suggère que la façon qu'a le système nerveux autonome cardiaque (CANS) de réagir et de participer aux changements de l'état physiologique de base peut être spécifique à chaque individu. En plus, comme il est indiqué dans la Table I et la Table II, quelques chiens avaient des augmentations marquées du taux de décharge du ganglion stellaire (SF) durant la deuxième (P2) et la troisième (P3) étape du protocole alors que les données physiologiques demeuraient les mêmes. Cela suggère qu'après chaque injection le CANS pourrait se réinitialiser à un nouvel état associé à un tonus différent dans le GS même pour des variables physiologiques identiques. Il est important de considérer que l'enregistrement des potentiels extracellulaires dans le GS gauche procure une image partielle du système nerveux cardiaque sympathique. Par contre, selon la vision classique de spécialisation droite/gauche du GS (Shih 1985), une corrélation négative devrait être attendue entre le nombre de potentiels dans le GS (SF) et le temps de conduction AV. Une telle corrélation n'a été observée que chez une minorité de chiens.

On peut aussi affirmer que quatre électrodes ne sont pas assez pour fournir une image représentative de l'activité dans le GS, qui est un ensemble complexe de neurones afférents, efférents et d'interneurones (Shih 1985). Comme il est montré dans la Table II, le SF était très bas en contrôle dans la plupart des cas. Cette activité neuronale pauvre ne peut être due à l'absence de neurones à proximité des électrodes puisqu'il y avait une énorme activité enregistrée après les injections systémiques et locales de nicotine. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer si, comme le suggèrent nos données, il existe une sous-population de chiens qui peuvent maintenir un état stable sans rétroaction importante du système nerveux cardiaque sympathique.

L'injection de nicotine locale permet d'activer les neurones ganglionnaires intrathoraciques périphériques tout en induisant des effets cardiovasculaires systémiques minimaux. L'effet court et rapide exclut toute contribution majeure du système nerveux central et permet de se concentrer sur l'étude des propriétés ganglionnaires. De plus, il n'y a pas eu de changements systématiques entre les différentes injections et répétitions du protocole (Table IV). Par contre, il n'y a pas d'explication claire concernant la fluctuation de la réponse qui pouvait se produire entre les injections de la même étape ou d'étapes différentes du protocole ( $\sigma_B$  et  $\sigma_W$  respectivement, dans la Table V et la Table VI). Toutefois, il y avait toujours une augmentation importante de la réponse comparée à l'activité avant l'injection. Quoiqu'il en soit, ces variances fournissent les données nécessaires pour calculer la puissance statistique en fonction de la dimension des groupes pour tout nouveau protocole incluant ce type de stimulation nicotinique locale.

Récemment, l'imagerie calcique et les sondes fluorescentes ont été adaptées pour évaluer macroscopiquement la fonction des circuits du cerveau et l'activité individuelle des neurones dans des préparations *in vivo* (Garaschuk 2006). Si cette technique pouvait être adaptée pour enregistrer dans le GS, l'injection de nicotine locale pourrait fournir une stimulation appropriée pour identifier les neurones et étudier la dynamique locale du réseau intact avec une interférence minimale d'une rétroaction externe.

L'injection systémique de nicotine a des effets cardiovasculaires complexes en raison de son action sur des cibles cellulaires multiples. Celles-ci incluent les terminaisons nerveuses sympathiques, la portion médullaire de la glande surrénale, les ganglions sympathiques, les chémorécepteurs de la carotide et de l'arche aortique et des sites du système nerveux central. La nicotine agit aussi directement sur les muscles lisses vasculaires entre autres en stimulant la sécrétion d'épinéphrine par les terminaisons nerveuses locales (Diana 1990). L'activation nicotinique des chémorécepteurs carotidiens a été largement étudiée dans des préparations canines conscientes et anesthésiées (Nagata 1988, Zimfer 1981). Chez le chien conscient, on a démontré que l'injection de nicotine provoque une réponse diphasique. La première phase, composée d'une bradycardie intense et d'une augmentation de la pression artérielle systémique, est suivie par la seconde phase caractérisée par une tachycardie et une diminution de la pression systémique. La deuxième phase, concomitante avec une augmentation dans la profondeur et les rythmes de la respiration, est associée avec le réflexe d'inflation pulmonaire (Nagata 1988, Zimfer 1981).



L'étude des mécanismes de contrôle responsables des différents éléments de la réponse diphasique induite par la stimulation des chémorécepteurs révèle que le système nerveux parasympathique semble jouer un rôle prédominant dans la deuxième phase puisqu'une vagotomie a pour effet d'empêcher la pression de redescendre suite à la première phase. Le rythme cardiaque varie tout de même de la même manière qu'avant la vagotomie et ce durant les deux phases. La dénervation des nerfs carotidiens a quant à elle pour effet d'éliminer complètement le réflexe des chémorécepteurs tandis que l'utilisation de bêtabloqueurs et de bloqueurs histaminiques n'entraîne aucun changement. Les bloqueurs cholinergiques affectent la réponse du rythme cardiaque, mais pas celle de la pression. Inversement, les bloqueurs alpha-adrénergiques inhibent les changements de pression, mais pas ceux du rythme cardiaque (Rutherford 1978).

Il faut aussi ajouter que l'anesthésie générale interfère grandement avec le contrôle de la circulation effectué par les chémorécepteurs (Zimpfer 1981). Premièrement, le contrôle mécanique de la respiration associé à l'anesthésie élimine les changements spontanés ce qui a pour effet d'augmenter l'amplitude de la première phase et de supprimer la seconde phase (Rutherford 1978, Murrau 1984). L'anesthésie elle-même peut également jouer un rôle dans la modulation de la réponse provoquée par l'activation des chémorécepteurs. La stimulation nicotinique des chémorécepteurs nicotiniques et aortiques augmentent toutes les deux la pression systémique, mais provoquent respectivement une tachycardie et une bradycardie sur des chiens anesthésiés (Stern 1967). L'alpha-chloralose,

bien que moins perturbante que les autres anesthésiques, diminue quand même l'amplitude de la première phase de la réponse (Zimfer 1981, Cox 1972). Par contre, dans toutes ces études sur l'activation des chémorécepteurs nicotiniques, la nicotine était injectée près des récepteurs à des doses qui étaient au moins dix fois inférieures à celles utilisées dans notre expérience.

Les barorécepteurs réagissent aussi à l'augmentation systémique de pression provoquée par l'activation des chémorécepteurs. Les résultats portant sur l'effet de l'alpha-chloralose sur la réceptivité des barorécepteurs sont contradictoires. Il a été rapporté qu'elle est augmentée par Brown et al. et Armstrong et al. (Brown 1956, Armstrong 1961), et diminuée par Cox et al. (Cox 1972).

Dans nos expériences, les chiens ont été anesthésiés avec de l'alpha-chloralose et la respiration était contrôlée. La variation temporelle de la pression était similaire à celle observée à la suite de stimulation des chémorécepteurs nicotiniques dans les protocoles expérimentaux décrits précédemment, mais avec une amplitude plus élevée et des délais plus longs. Cela peut être expliqué par la dose élevée qui a été injectée dans un site périphérique. Cela pourrait conduire à une réponse systémique plus globale, pouvant inclure, en plus de chémorécepteurs aortiques et carotidiens, la sécrétion d'épinéphrine des terminaisons nerveuses locales et l'activation du système parasympathique. L'épinéphrine provoque la contraction des muscles vasculaires lisses et des myocytes ventriculaires et un effet inotrope positif résultant de l'activation nicotinique direct du GS.

Une autre hypothèse serait que l'alpha-chloralose augmente la pression artérielle et le SF par rapport aux autres anesthésiants. Le système nerveux au niveau du GS serait donc plafonné, est c'est pour cette raison qu'une injection de nicotine locale ne produirait pas d'augmentation de pression artérielle systémique. Par contre, l'injection de nicotine systémique agit sur plusieurs sites et finit par faire augmenter la pression.

Chez cinq des sept chiens, la bradycardie à laquelle étaient superposées les fluctuations d'un battement cardiaque à l'autre est en accord avec ce qui a été observé suite à l'activation des chémorécepteurs. Comme le rythme cardiaque est le résultat d'effets antagonistes cholinergiques et adrénérgiques, des différences au niveau du gain et de la sensibilité des composantes multiples de deux systèmes peuvent expliquer pourquoi la tachycardie a été observée chez deux chiens et pourquoi la dynamique du nœud atrio-ventriculaire était variable. Malgré des dynamiques AA et AV différentes observées chez les chiens, il est étonnant de constater que chaque chien maintenait une séquence de réponse identique suite aux injections répétitives de nicotine. Cela suggère que chaque chien, même s'il gère différemment de multiples entrées, maintient une réponse cohérente qui permettrait une recherche plus approfondie des boucles de rétroactions.

Tous les chiens ont aussi démontré une séquence similaire dans le GS : une augmentation énorme et prolongée du nombre de potentiels d'action extracellulaires

concomitante avec la phase montante de la pression. Comme il est illustré dans la Figure 4 de l'article, une large fluctuation entre les battements est superposée à une évolution de la moyenne mobile du nombre de potentiels extracellulaires en forme de cloche. Même si une fluctuation était aussi présente pour AA et AV, il n'y avait pas de relation constante entre ces derniers et le SF. Un grand SF arrivait toujours sur un fond de pression élevée, ce qui suggère que l'activation nicotinique directe et chémodépendante du ganglion devait être d'une manière ou d'une autre contrebalancée par une certaine inhibition centrale provoquée par les barorécepteurs. L'effet du SF pouvait aussi être contrebalancé par une influence cholinergique importante au nœud sinusal.

Limites : L'absence de groupe contrôle fait en sorte qu'il n'est pas possible d'éliminer la contribution du facteur temps. En effet, la réponse de la préparation aux interventions après une série de répétition du protocole peut varier seulement en raison du temps qui s'est écoulé depuis le début de l'expérience. La présence d'un groupe contrôle nous permettrait d'exclure cette possibilité ou tout au moins d'en tenir compte dans les analyses statistiques. Par contre, notre but était plutôt de s'assurer de la stabilité de la préparation à l'application de différents stimuli et de l'élaboration d'un protocole de plus en plus complexe. Il serait maintenant important d'inclure un groupe contrôle dans toutes nouvelles séries d'expériences.

Dans le but d'augmenter la stabilité des préparations canines, il serait intéressant de faire une présélection en contrôlant la race, le sexe, l'âge et l'état de santé des chiens. Faire

des expériences avec des chiens de même race pourrait peut-être réduire la variabilité des résultats. Cependant, cela augmenterait énormément le coût des expériences. On pourrait aussi passer à des animaux plus petits, comme le rat ou le lapin où une telle sélection est moins coûteuse. Cependant, dans tous ces cas, on peut s'interroger sur la portée des résultats quant à leur généralité et leur signification clinique.

Il faudrait aussi déterminer un temps maximal alloué pour trouver un emplacement satisfaisant pour les électrodes puisque le temps nécessaire pour trouver une réponse neuronale suffisante pouvait varier. L'insertion de différents types d'électrodes, soit groupées ou individuelles, peut aussi faire varier la qualité de la réponse neuronale obtenue et les emplacements d'enregistrement possibles. En effet les électrodes groupées qui étaient utilisées au départ étaient très difficiles à insérer dans le ganglion en plus de limiter les sites d'enregistrement possibles. Les électrodes individuelles que nous avons finalement choisies d'utiliser étaient donc une évolution vers un mode d'enregistrement plus flexible et moins traumatisant pour le ganglion.

La grande amplification de potentiel d'action extracellulaire provoquée par l'injection de nicotine systémique et locale chez tous les chiens prouve qu'il y avait toujours une sous-population à proximité des électrodes d'enregistrement. Par contre, l'ampleur avec laquelle ces enregistrements représentent réellement le nombre de potentiels extracellulaires du GS reste inconnue, particulièrement durant la période de contrôle où le SF était particulièrement bas chez un sous-ensemble de chiens. Des techniques comme

l'imagerie optique diffuse, qui dépend du spectre d'absorption de l'hémoglobine selon son statut d'oxygénation, pourrait procurer un index de l'activité globale du GS (CRC press 2002). Utilisés simultanément, les enregistrements optiques et électriques pourraient procurer des informations complémentaires pour évaluer la représentativité du SF dérivé électriquement. Par contre, il est peu probable que même des enregistrements électriques multiples puissent produire une représentation claire de l'intégration des informations faite par les sous-populations de neurones du GS. Pour ce faire, les percées récentes dans l'imagerie calcique et les sondes fluorescentes sont plus prometteuses.

Orientations futures : Puisque la réponse de chaque chien demeure relativement stable, il est possible d'envisager le développement de protocoles plus complexes qui permettraient d'étudier la contribution des différents mécanismes de contrôle de l'activité du GS et de leurs actions sur les variables physiologiques. De plus, nous avons fait des expériences préliminaires dont nous n'avons pas traité dans cette thèse, qui comportaient plusieurs pistes expérimentales intéressantes. D'abord, nous avons tenté l'enregistrement simultané dans les deux GS, ce qui requiert une chirurgie pour exposer les deux ganglions, une procédure beaucoup plus complexe. Ensuite, nous avons essayé l'enregistrement dans le GS et le MCG simultanément du côté gauche. Par contre, la très grande variabilité entre la taille et la position des MCG rend l'exercice ardu. Pour ce qui est du côté droit, la position élevée du MCG dans le thorax requiert une chirurgie plus importante. Nous avons aussi effectué des stimulations électriques en aval et en amont du GS et des répétitions de protocoles avant et après l'ablation réversible de boucles de contrôle par le froid, ce qui

semble être des pistes d'études prometteuses. L'avenue des interventions pharmacologiques pourrait aussi nous révéler des comportements neuronaux supplémentaires. Nous avons d'ailleurs essayé la phényléphrine et la vératridine. L'injection de la nicotine systémique ne nous semble plus pertinente pour des expériences futures puisque la réponse systémique provoquée est très complexe et ne nous permet pas de nous concentrer strictement sur le ganglion.

Nous pourrions aussi maintenir les chiens sous isofluorane suivant les acquisitions à l'alpha-chloralose. En fait, l'isofluorane bloque les synapses, permettant d'enregistrer dans un GS isolé du cœur et de la moelle épinière. Il serait alors intéressant de voir comment varie l'activité du GS suivant l'injection de la nicotine locale.

Finalement, il serait intéressant de visualiser les sites d'insertion des électrodes en effectuant la coupe et la coloration des ganglions. Après l'expérience, nous pourrions appliquer un courant à travers les électrodes ce qui marquerait l'endroit où elles étaient insérées. Par la suite, l'étude du ganglion permettrait de visualiser les neurones à proximité du site d'enregistrement. Ces données pourraient être comparées à celles obtenues par l'enregistrement pour tenter de découvrir des relations entre la position et la fonction, entre la qualité et la quantité des potentiels extracellulaires enregistrés.

## **Chapitre 7 - Conclusion**

La relation entre les indices cardiovasculaires et le nombre de potentiels extracellulaires dans le GS était variable à travers les chiens. Par contre, chaque chien était cohérent avec lui-même à travers les protocoles. Cette conclusion influence définitivement l'interprétation des résultats des futures expériences, comme elle démontre qu'aucune réponse à un stimulus n'est unique chez l'ensemble des chiens. Chaque chien devra être comparé avec lui-même dans des études ultérieures sur les mécanismes de rétroaction pour vérifier la présence d'un changement de réponse à un stimulus.



## Chapitre 8 - Bibliographie

**Armour JA** (1983) Synaptic transmission in the chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of the dog, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 61:1149-1155.

**Armour JA** (1984) Activity of *in situ* middle cervical ganglion neurons in dogs, using extracellular recording techniques, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63:704-716.

**Armour JA.**(2007) *Cardiac nervous system*, Montréal, Université de Montréal.

**Armour JA, Collier K, Kember G, Ardell JL** (1998) Differential selectivity of cardiac neurons in separate intrathoracic autonomic ganglia, *American Journal of Physiology*, R939-R949.

**Armour JA, Hopkins DA** (1981) Localization of sympathetic postganglionic neurons of physiologically identified cardiac nerves in the dog, *The Journal of Comparative Neurology*, 202:169-184.

**Armour JA, Janes RD** (1987) Neuronal activity recorded extracellularly from *in situ* canine mediastinal ganglia, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66:119-127.

**Atwood, Harold L. et MacKay WA** (1989) *Essential of Neurophysiology*, Toronto, Bc Dereck inc.

**Berne RM, Levy MN** (1997) *Cardiovascular Physiology*. St-Louis, The C.V. Mosby Company.

**Berne RM, Levy MN** (1981) *Cardiovascular Physiology*. St-Louis, The C.V. Mosby Company.

**Blinks, JR** (1956) Positive chronotropic effect of increasing right atrial pressure in the isolated mammalian heart, *American Journal of Physiology*, 186: 299-303.

**Cooper PJ, Lei M, Cheng LX, Kohl P** (2000) Selected contribution: axial stretch increases spontaneous pacemaker activity in rabbit isolated sinoatrial node cells, *Journal of Applied Physiology*, 89:2099-104.

**Eckberg DL** (1997) Sympathovagal balance: a critical appraisal, *Circulation*, 9:3224-3232.

**Elias M** (2000) Cervical sympathetic and stellate ganglion blocks, *Pain Physician*, 3:294-304.

- Hopkins DA, Armour JA** (1989) Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves, *Journal of the Autonomic Nervous System*, 26:213-222.
- Hopkins DA, Gootman PM, Gootman N, Armour JA** (1997) Anatomy of medullary and peripheral autonomic neurons innervating the neonatal porcine heart, *Journal of the Autonomic Nervous System*, 64:74-84.
- Huang MH, Smith FM, Armour JA** (1993) Modulation of in situ canine intrinsic cardiac neuronal activity by nicotinic, muscarinic and B-adrenergic agonist, *American Journal of Physiology Regulation Integrated Comprehensive Physiology*, 265:659-669.
- Julien C** (2006) The enigma of Mayer waves: Facts and models, *Cardiovascular Research*, 70:12-21.
- Kooreman KM, Fessier JF, Geddes LA** (1998) Phrenic nerve stimulated respiration in the anaesthetized horse : a comparison with intermittent positive pressure ventilation, *Journal of Equine Veterinary Science*, 18:684-688.
- Lee KH, Kim J, Chung JM** (1984) Segmental distribution of dorsal root ganglion cells with axons in the inferior cardiac nerve, *Neuroscience Letters*, 52:185-190.

- Levy M.N** (1971) Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart, *Circulation Research*, 29:437-445.
- Mallani A, Pagiani M, Lombardi F, Cerutti S** (1991) Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain, *Circulation*, 84:482-492.
- Masliukov PM** (2001) Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 89:48-53.
- Masliukov PM, Pankov VA, Strelkov AA, Masliukova E, Shilkin VV, Nozdrachev AD** (2000) Morphological features of neurons innervating different viscera in the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 84:169-175.
- Maslyukov PM, Shilkin VV, Timmermans, JP** (2006) Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis, *Neuroscience and Behavioural Physiology*, 36:851-855.
- Miller, M.E., Christensen, G., Evans HE** (1964) *Anatomy of the dog*, Philadelphia, W.B. Saunders Company.

- Nozdrachev AD, Fatveev MM, Jiménez B, Morales MA** (2003) Circuits and projections of a stellate ganglion, *Archives of Medical Research*, 34:106-115.
- Pagani M, Montano M, Porta A, Malliani A, Abboud F, Birkett C, Somers V** (1995) Relationship between component of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in human, *Circulation*, 95:1441-1448.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, Lamantia A, McNamara J, Williams M** (2004) *Neurosciences*, 2<sup>ième</sup> edition, Bruxelles, de Boeck.
- Richardson, RJ, Grkovic I, Anderson CR** (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart, *Cell and Tissue Research*, 314:337-350.
- Ruhle W, Dembowski K, Czachurski J, Seller H** (1985) Segmental distribution of afferent fibres in the left inferior cardiac nerve of the cat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase, *Neuroscience Letters*, 56:353-358.
- Rutherford JD, Vatner SF** (1978) Integrated carotid chemoreceptor and pulmonary inflation reflex control of peripheral vasoactivity in conscious dogs, *Circulation Research*, 43:200-208

- Shih CJ, Chuang KS, Tsai SH, Liu JC** (1985) Horsadish peroxidase localization of the sympathetic postganglionic neurons innervating the cat heart, *Journal of the Autonomic Nervous System*, 13:179-189.
- Thompson GW, Collier, Ardell JL, Kember G, Armour JA** (2000) Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglionated plexus, *Journal of Physiology*, 3:561-571.
- Tomney PA, Hopkins DA, Armour JA** (1985) Axonal branching of canine sympathetic postganglionic cardiopulmonary neurons. A retrograde fluorescent labelling study, *Brain Research Bulletin*, 14:443-452.
- Vatner SF** (1978) Effects of Anaesthesia on Cardiovascular Control Mechanisms, *Environmental Health Perspectives*, 26:193-206.
- Waldmann M, Thompson GW, Kember G, Ardell JL, Armour JA** (2006) Stochastic behaviour of atrial and ventricular intrinsic cardiac neurons, *Journal of Applied Physiology*, 101:413-419.
- Yuan, BX, Ardell, JL, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA** (1994) Gross and microscopic anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system, *Anatomy Record*, 239:75-87.

**Zimpfer N, Sit SP, Vatner SF** (1981) Effect of anaesthesia on the canine carotid chemoreceptor reflex, *Circulation Research*, 48:400-406.

