



HAL
open science

Dissection génétique du générateur central respiratoire chez la souris : neurones rythmogènes et synchronisation bilatérale

Julien Bouvier

► **To cite this version:**

Julien Bouvier. Dissection génétique du générateur central respiratoire chez la souris : neurones rythmogènes et synchronisation bilatérale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : 2010PA11T049 . tel-00555367

HAL Id: tel-00555367

<https://theses.hal.science/tel-00555367v1>

Submitted on 13 Jan 2011

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-XI
FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS-SUD

2010

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-XI

Spécialité :
NEUROSCIENCES

Ecole doctorale :
SIGNALISATION ET RÉSEAUX INTÉGRATIFS EN BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le 13 octobre 2010 par
JULIEN BOUVIER

**Dissection génétique du générateur central respiratoire
chez la souris : neurones rythmogènes et
synchronisation bilatérale**

Directeur de thèse : Dr. Gilles Fortin

JURY

Pr. Hervé Daniel

Président

Pr. Pascal Branchereau

Rapporteur

Dr. Gérard Hilaire

Rapporteur

Pr. Martyn D. Goulding

Examineur

Dr. Christopher A. Del Negro

Examineur

Dr. Gilles Fortin

Examineur

Remerciements

A mon arrivée, le laboratoire était rattaché à l'UPR2216 du CNRS à Gif-sur-Yvette, dirigée par le Dr. Jean Champagnat. Je le remercie de tout cœur pour m'avoir permis d'y effectuer mes travaux de Master 2 puis de thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à mes recherches, et pour l'enthousiasme et l'optimisme dont il fait preuve continuellement. Début 2010, l'unité a rejoint l'émergent laboratoire de Neurobiologie et Développement (UPR3294) dirigé par le Dr. Philippe Vernier. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir permis d'évoluer au sein de cette nouvelle structure à l'environnement multidisciplinaire particulièrement excitant.

Mes remerciements les plus chaleureux sont distribués à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mon épanouissement scientifique et personnel tout au long de ces années passées au laboratoire, et tout particulièrement :

A mes mentors,

Le Dr. Gilles Fortin qui a assuré ma formation scientifique pendant ces quatre années et qui m'a convaincu de la richesse des approches développementales, avec sérieux, désaccords, acharnement, mais surtout efficacité et bonne humeur.

Le Dr. Muriel Thoby-Brisson, qui a initié ma formation pendant mon Master 2, et avec qui ce fut un immense plaisir de travailler et de partager divers déboires expérimentaux. Je te souhaite une bonne continuation dans ton nouvel environnement.

Aux autres chercheurs de l'équipe, les Drs. Jean Champagnat, Marie-Pierre Morin-Surun, Arthur S. Foutz, Monique Denavit-Saubié et John A. Hayes pour avoir partagé leur expérience et de précieux conseils.

Aux techniciennes et ingénieures, Sandra Autran et Valérie Robert-Mezières, dont la bonne humeur s'ajoute à leur contribution essentielle à ces travaux.

Au Professeur Jack L. Feldman, que j'ai eu l'honneur de rencontrer pendant sa visite au laboratoire, et avec qui j'ai partagé de riches discussions scientifiques, toujours dans la joie et la bonne humeur.

Aux «anciens», aux «nouveaux», et à toutes celles et ceux que j'ai cotoyé pendant ma thèse et avec qui j'ai passé de très agréables moments :

Les «anciens», Anette Mont-Reynaud, Leanne McKay, Karin Persson, Ludovic Wrobel, Amélie Meillerais, Michel et Eliane Boudinot, Heather McLean.

Le «nouveau», Pierre-Louis Ruffaut qui va prendre la relève de ces travaux, et potentiel lecteur de cette thèse le moment venu...

Tous les membres de l'équipe voisine de drosophilistes, ainsi que des autres équipes de l'institut, notamment mes co-utilisateurs du microscope confocal commun pour avoir partagé leurs astuces et m'avoir plusieurs fois cédé, dans l'urgence, de précieux créneaux !

Valérie Lavallée, Morgane Roulot, Simon Agostini et Aurélien Drouard de l'animalerie centrale pour leur gestion efficace de nos nombreuses lignées.

Tout le personnel commun du laboratoire, Odile Lecquyer pour sa gestion efficace des situations (fréquentes) de dernière minute, ainsi que les informaticiens, le Webmestre, le service mécanique de l'INAF.

Toutes celles et ceux qui se sont intéressés de près ou de loin à ces travaux et que je ne peux remercier individuellement ici.

A nos collaborateurs :

Les Dr. Alessandra Pierani et Alain Chédotal, qui m'ont témoigné de leur confiance et ont partagé leur expertise.

A tous les membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

A mes proches, mes amis, qui ont su comprendre mon manque cruel de disponibilité.

Bien évidemment à ma famille qui m'a soutenu pendant ces longues années d'études et toujours encouragé dans mes choix.

Et sans oublier mon ordinateur pour ne m'avoir jamais fait défaut (et pourtant...), les voleurs de Gif-sur-Yvette pour ne me l'avoir jamais pris, les imprimantes de l'INAF pour ce soir, la ligne B du RER pour demain matin notamment, le personnel très chaleureux de la cantine, et toutes les autres bonnes choses agréables du campus de Gif-sur-Yvette qui ont rendu ce «séjour» très agréable.

SOMMAIRE

Résumé	1
Avant Propos	2
INTRODUCTION	4
INTRODUCTION GÉNÉRALE :	
LE COMPORTEMENT RESPIRATOIRE DES MAMMIFÈRES	5
1. Généralités sur le comportement respiratoire	5
2. Eléments de mécanique ventilatoire	6
3. Un comportement d'origine centrale... ..	7
4. ... qui repose sur l'activité d'un générateur central de rythme	8
5. Un comportement à la fois robuste et plastique	9
6. Un comportement parfois défaillant	10
7. L'intérêt d'une approche développementale	11
OBJECTIFS DE LA THÈSE	12
I. LE RÉSEAU NEURONAL RESPIRATOIRE	14
1. Les neurones respiratoires	14
2. Les groupes respiratoires	16
2.1. Les régions respiratoires bulbaires	16
2.1.1. Le groupe respiratoire dorsal (DRG) et les afférences sensorielles	16
2.1.2. Le groupe respiratoire ventral	17
2.1.3. Le groupe respiratoire para-facial et le noyau retrotrapézoïde	19
2.2. Les régions respiratoires pontiques	20
2.2.1. Le groupe respiratoire pontique	20
2.2.2. Le groupe A5	20

II. LE GÉNÉRATEUR CENTRAL DU RYTHME	22
1. L'oscillateur respiratoire du complexe pré-Bötzinger	22
1.1. Le preBötC est à l'origine de la rythmogenèse respiratoire	22
1.1.1. Le preBötC est nécessaire et suffisant à la rythmogenèse respiratoire ..	22
1.1.2. Le preBötC est à l'origine des multiples activités respiratoires	23
1.2. Caractéristiques anatomo-fonctionnelles	25
1.2.1. Les neurones exprimant le récepteur NK1R à la substance P	25
1.2.2. Les neurones exprimant le neuropeptide somatostatine	27
1.2.3. Les récepteurs aux opioïdes	29
1.2.4. Les autres marqueurs anatomiques de l'oscillateur	29
1.3. Connectivité	29
1.3.1. Connectivité vers les groupes pré-moteurs et moteurs	29
1.3.2. Connectivité commissurale	30
1.4. Mécanismes de la rythmogenèse	31
1.4.1. Le rôle essentiel de la transmission glutamatergique	31
1.4.2. Le modèle pacemaker	32
1.4.3. La rythmogenèse, une propriété émergente du réseau ?	34
1.5. Autres acteurs participants à la rythmogenèse	36
1.5.1. Les neuromodulateurs	37
1.5.2. Le rôle de la transmission synaptique inhibitrice	39
1.5.3. Le rôle des cellules gliales	40
2. Le groupe respiratoire para-facial : pFRG/RTN	41
2.1. L'existence d'un second groupe rythmogène	41
2.1.1. Le pFRG/RTN contient des neurones pré-inspiratoires	41
2.1.2. L'expérience dite de « quantal slowing »	43
2.2. La chémosensibilité centrale et le pFRG/RTN	44
2.3. Le pFRG/RTN : l'oscillateur du rythme expiratoire ?	45
3. Conclusions	46
III. EMERGENCE DU GÉNÉRATEUR CENTRAL	
RESPIRATOIRE PENDANT L'EMBRYOGENÈSE	47
1. Emergence des activités rythmiques respiratoires	49
1.1. Respiration fœtale	49
1.2. Emergence des activités rythmiques respiratoires	49
2. Emergence des oscillateurs respiratoires	50
2.1. Oscillateur du preBötC	50
2.1.1. Emergence fonctionnelle	50
2.1.2. Emergence anatomique	53
2.1.3. Connectivité	53
2.1.4. Le rôle des neurotrophines	54
2.2. Le groupe respiratoire para-facial embryonnaire	55
2.2.1. Emergence fonctionnelle	56
2.2.2. Une forme embryonnaire du pFRG/RTN ?	56
2.2.3. Des mécanismes de rythmogenèse différents de ceux du preBötC	58
2.3. La synchronisation des deux oscillateurs	59
3. La neurotransmission inhibitrice aux stades embryonnaires	61

4. Pathologies respiratoires congénitales	62
IV. LA NEUROBIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT POUR L'ÉTUDE DES RÉSEAUX NEURONAUX	65
1. Développement précoce et acquisition du destin neural	65
2. Les morphogènes	67
3. La signalisation dorso-ventrale	68
3.1. L'interprétation des morphogènes : exemple dans les domaines ventraux	69
3.1.1. La régionalisation en domaines de progéniteurs ventraux	69
3.1.2. L'exemple du domaine p0 et des interneurons V0	71
3.2. Des mécanismes retrouvés dans le rhombencéphale	73
4. Signalisation dorso-ventrale et neurophysiologie	74
4.1. Les CPGs : un modèle de choix	74
4.2. Exemples concrets au sein du CPG locomoteur	75
5. Régionalisation selon l'axe antéro-postérieur	78
5.1. Les gènes Hox	78
5.2. En amont des gènes Hox	80
5.3. Des conséquences anatomiques évidentes	80
6. Développement et croissance axonale	81
6.1. Le déploiement des axones commissuraux	82
6.2. La signalisation Slits/Robos	82
6.2.1. Les Slits : des molécules de guidage sécrétées par la ligne médiane	82
6.2.2. Les Robos : récepteurs des Slits	83
6.2.3. Expression dynamique des Robos	83
6.2.4. Le cas particulier de Robo3 chez les mammifères	85
7. L'origine embryonnaire du générateur respiratoire	88
7.1. Le groupe respiratoire para-facial embryonnaire	89
7.2. L'oscillateur respiratoire du preBötC	91
MATÉRIELS ET MÉTHODES	94
1. Lignées murines	95
1.1. Généralités et terminologie	96
1.2. Les lignées de souris Knock-Out / Knock-In	97
1.2.1. Lignée Dbx1LacZ	97
1.2.2. Lignée Dbx1ires-GFP	98
1.2.3. Lignée Robo3GFP	99
1.3. Lignées « double rapporteur »	100
1.4. Les lignées murines conditionnelles	100
1.4.1. Généralités sur le système Cre/lox	100
1.4.2. Les lignées Cre	102
1.4.3. Les lignées floxées	102
1.4.4. Contraintes et limites du système Cre/lox	103
1.5. Génotypage des animaux	105

2. Investigations fonctionnelles in vivo	106
3. Investigations fonctionnelles in vitro	107
3.1. Préparations	107
3.1.1. Prélèvement des embryons	108
3.1.2. La préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolé	108
3.1.3. La tranche transversale contenant le preBötC	110
3.2. Enregistrement des activités	110
3.2.1. Electrophysiologie	110
3.2.2. Imagerie calcique	113
4. Investigations anatomiques	115
4.1. Préparation des tissus	115
4.2. Découpe des sections au cryostat	115
4.3. Protocole d'immunomarquage	116
4.4. Localisation anatomique du preBötC	117
4.5. Marquage rétrograde des neurones commissuraux du preBötC	119
RÉSULTATS	121
I. ORIGINE EMBRYONNAIRE DES NEURONES DU PREBÖTC	122
1. Présentation du problème	122
2. Résultats de la publication résumés en français	123
3. Publication	124
4. Résultats complémentaires	139
4.1. La respécification vers une identité dorsale dB4	139
4.2. L'acquisition d'un phénotype GABAergique	140
4.3. La respécification vers l'identité ventrale p1	141
4.4. Le maintien d'une signature neuronale	142
4.5. Conclusions	143
II. DISSECTION GÉNÉTIQUE DE LA CONNECTIVITÉ AU SEIN DU RÉSEAU NEURONAL RESPIRATOIRE EMBRYONNAIRE	144
1. La synchronisation bilatérale de l'e-pF	144
2. La synchronisation bilatérale des activités motrices	145
3. Conclusions	147
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	148
I. RÔLE FONCTIONNEL DES NEURONES V0	150
1. Les interneurons V0 constituent l'origine embryonnaire unique du preBötC	150
1.1. Les interneurons V0 sont à l'origine de la rythmogenèse	150
1.2. Les interneurons V0 assurent la synchronisation bilatérale du rythme	152
1.3. Le preBötC possède une origine embryonnaire unique	153

2. Les interneurons V0 : un relai des activités de l'e-pF ?	154
2.1. Un relai commissural obligatoire	154
2.2. Un relai prémoteur potentiel	155
3. L'origine embryonnaire distincte des deux oscillateurs	155
4. Les interneurons V0 au sein d'autres réseaux neuronaux	157
II. ENJEUX ET PERSPECTIVES	159
1. La coordination des schémas de régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale	159
2. Spécification du phénotype glutamatergique	161
3. Le contrôle d'un effectif neuronal	163
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 165
 ANNEXE I	 186
 ANNEXE II	 194

Résumé

La respiration est une activité rythmique motrice bilatéralement synchronisée présente chez le fœtus et vitale à la naissance. Au cours du développement, des interneurons dans le tronc cérébral s'organisent en réseaux qui génèrent et modulent la commande rythmique respiratoire. Ils y forment deux oscillateurs, actifs chez l'embryon et vitaux à la naissance : l'oscillateur parafacial et le complexe preBötzinger. Les mécanismes qui gouvernent l'assemblage et contraignent la fonction de ces réseaux sont étudiés dans le laboratoire avec des outils génétiques, des techniques histologiques, électrophysiologiques et d'imagerie chez la souris.

Etudiant le développement du complexe preBötzinger, nous montrons que des progéniteurs neuraux exprimant le gène à homéobox *Dbx1* donnent naissance aux interneurons qui constituent le cœur de l'oscillateur. Ces interneurons (i) sont glutamatergiques et nécessaires à la genèse du rythme, (ii) expriment le gène *Robo3* requis pour que leurs axones croisent la ligne médiane et conditionnent la synchronisation de l'activité. Cette étude illustre et affine les liens existant entre les schémas de régionalisation du tube neural et l'émergence de modules fonctionnels en permettant de proposer une signature transcriptionnelle des neurones rythmogènes principaux de la respiration.

Summary

Breathing is a rhythmic and bilaterally synchronous motor activity present in the fetus and vital at birth. During development hindbrain interneurons are being organized into networks that generate and modulate the rhythmic respiratory command. They form two oscillator networks, active at embryonic stages and vital at birth: the parafacial oscillator and the preBötzinger Complex. The mechanisms that govern the assembling, and constrain the function, of these networks are studied in the laboratory using developmental genetics tools combined with histological, electrophysiological and imaging techniques in mice.

Investigating the development of the preBötzinger complex, we show that neural progenitors expressing the homeobox gene *Dbx1* give rise to the interneurons that constitute core components of this oscillator network. These interneurons (i) are glutamatergic and necessary for rhythm generation, (ii) express the *Robo3* gene required for their axon to cross the midline and enforce bilateral synchronous activity. This study illustrates and further refines the existing links between neural tube regionalization and the emergence of functional modules by proposing a transcriptional signature of the principal respiratory rhythmogenic interneurons.

Avant Propos

Les neurosciences regroupent l'ensemble des disciplines qui s'intéressent au fonctionnement normal et pathologique du système nerveux. Leur ambition commune est de comprendre la manière dont il élabore les différents comportements, qu'ils soient moteurs, liés à l'intégration des sens, voir d'ordre mnésique ou même conscient.

Les recherches jusqu'à ce jour nous ont fourni une vision d'un système nerveux organisé en territoires fonctionnels, chacun assurant un rôle dédié. La complexité des tâches accomplies ne tiendrait pas tant à la complexité des constituants individuels du système nerveux, les neurones, mais plutôt à l'existence d'une connectivité particulière entre neurones hautement spécialisés et localisés en des positions bien particulières.

La neurophysiologie ambitionne de décrypter cette logique de fonctionnement du système nerveux. Cela commence par l'identification des populations neuronales, parfois distantes, et des mécanismes cellulaires impliqués dans l'élaboration de chaque comportement. Elle dispose d'outils d'investigation fonctionnelle dédiés, notamment les expériences de lésions, puis l'électrophysiologie et maintenant l'imagerie fonctionnelle. En outre, s'intéressant à des processus agissant à différentes échelles, la neurophysiologie est devenue une science largement pluridisciplinaire. Elle fait ainsi appel aux données de neuroanatomie, de neurobiologie cellulaire et moléculaire, de neuropharmacologie, etc.

La neurobiologie du développement s'intéresse quand à elle à la formation du système nerveux depuis la cellule-œuf, en passant par les étapes de différenciation des précurseurs neuronaux en neurones spécialisés, et jusqu'à l'agencement de ces derniers en territoires fonctionnels et à l'établissement de connexions précises entre eux. Les travaux dans ce domaine suggèrent d'une part que chaque type cellulaire serait produit précocement à une position bien spécifique du système nerveux en développement. D'autre part, cette diversité neuronale serait sous le contrôle de l'activation de gènes particuliers au sein des précurseurs et de leurs descendants cellulaires. L'organisation du cerveau adulte en territoires fonctionnels dériverait de ces processus précoces de régionalisation. La complexité du système nerveux apparaît ainsi codée génétiquement.

Il semble dès lors évident que la compréhension du fonctionnement du cerveau puisse largement bénéficier d'une approche croisée entre neurophysiologie, déjà largement pluridisciplinaire, et neurobiologie du développement. Les travaux de cette thèse ont mis en œuvre une telle approche appliquée à l'étude des structures centrales qui gouvernent un

comportement vital : l'activité respiratoire. A cet égard, ce comportement présente l'avantage de reposer pour une bonne partie sur un effectif cellulaire confiné du tronc cérébral, le générateur central du rythme. En particulier, l'activité de ce dernier est i) maintenue lorsqu'il est isolé *in vitro*, rendant possible les études fonctionnelles en dehors de l'animal ii) présente dès les stades embryonnaires tardifs ce qui permet d'analyser l'origine de dysfonctionnements autrement létaux à la naissance. Cette seconde propriété permet en outre de se positionner à des stades suivant de peu l'intervention des gènes de développement et l'émergence des neurones différenciés.

Notre approche pluridisciplinaire, et généralement la pluridisciplinarité en neurosciences, a été fortement favorisée par le séquençage récent des génomes et la production d'animaux de laboratoire génétiquement modifiés. L'invalidation sélective d'un gène renseigne ainsi sur le rôle de ce gène à l'échelle moléculaire, cellulaire, et organistique. Des analogies peuvent être faites avec des situations pathologiques humaines ayant une origine génétique. En outre, la disponibilité d'animaux exprimant une protéine fluorescente adressée génétiquement ouvre la voie aux études de populations neuronales identifiées sur la base d'un programme génétique développemental donné. Il est aussi possible de faire appel aux données de la neurobiologie moléculaire pour introduire chez l'animal des anomalies dans les mécanismes assurant l'établissement des connexions entre neurones, et d'en analyser les conséquences anatomiques, fonctionnelles et physiopathologiques.

Pour le neurophysiologiste que je suis, cette thèse aspire à une dissection fonctionnelle du générateur respiratoire. Nous tenterons d'y identifier, sur la base d'un programme génétique de développement, des sous-types neuronaux d'importance vitale. Ils seront caractérisés fonctionnellement et nous analyserons les conséquences de leur absence sur l'activité respiratoire et sur le réseau neuronal respiratoire dans son ensemble. Nous serons ainsi amenés à examiner à quel point les programmes développementaux contrôlant la production de neurones spécialisés instruisent en parallèle le déploiement des axones et la connectivité entre cellules. Ainsi, même si ces travaux sont présentés selon l'œil du physiologiste, le développementaliste pourra y découvrir un modèle de choix pour l'étude de l'influence des processus de régionalisation embryonnaire et des cascades géniques sur la mise en place de populations neuronales spécialisées et précisément interconnectées. Enfin, ces travaux s'insèrent dans un vaste projet qui vise à l'identification de candidats génétiques responsables, chez l'homme, de situations pathologies congénitales affectant le contrôle central du comportement respiratoire.

Introduction

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

LE COMPORTEMENT RESPIRATOIRE DES MAMMIFÈRES

Cette thèse est écrite selon le point de vue du neurophysiologiste qui applique la neurobiologie du développement pour disséquer les composants de la commande centrale respiratoire et sa mise en place pendant le développement embryonnaire. Ce chapitre introductif présentera les aspects généraux du comportement respiratoire et soulignera les intérêts d'une approche développementaliste appliquée à l'étude des réseaux neuronaux qui le gouvernent.

1 - Généralités sur le comportement respiratoire

Pendant l'ère primaire, l'enrichissement de l'air en dioxygène (O₂) permet la sortie des animaux marins vers les terres émergentes. Au cours de l'évolution, diverses stratégies de prélèvement du dioxygène se sont mises en place pour répondre aux besoins de la vie aérienne et à la complexification des organismes. Par exemple, chez certains invertébrés, le dioxygène diffuse simplement à travers les membranes des cellules baignant dans l'hémolymphe. L'apparition des organismes plus complexes, dont les tétrapodes, utilisant des appareils locomoteurs de plus en plus performants va permettre la colonisation de niches écologiques diverses et variées au cours du Carbonifère. Chez les mammifères, l'apport en oxygène est alors fourni par la respiration aérienne pulmonaire, ou ventilation pulmonaire, rendue possible par l'apparition évolutive d'un diaphragme entier et fonctionnel.

La fonction principale de la respiration est d'apporter de l'oxygène aux cellules de l'organisme et de les débarrasser du dioxyde de carbone (CO₂) en excès. Le CO₂ contenu dans le sang veineux doit ainsi être continuellement « échangé » contre du O₂ de l'air ambiant. Chez les mammifères, les échanges gazeux sont assurés au niveau des poumons par une succession d'entrées d'air environnant (inspirations) et de sorties d'air (expirations), elles-mêmes sustentées par des variations rythmiques du volume thoracique (Figure 1). Chez l'animal comme chez l'homme, il est possible d'enregistrer par la méthode non-invasive de la pléthysmographie les différents paramètres du cycle respiratoire (voir matériels et méthodes).

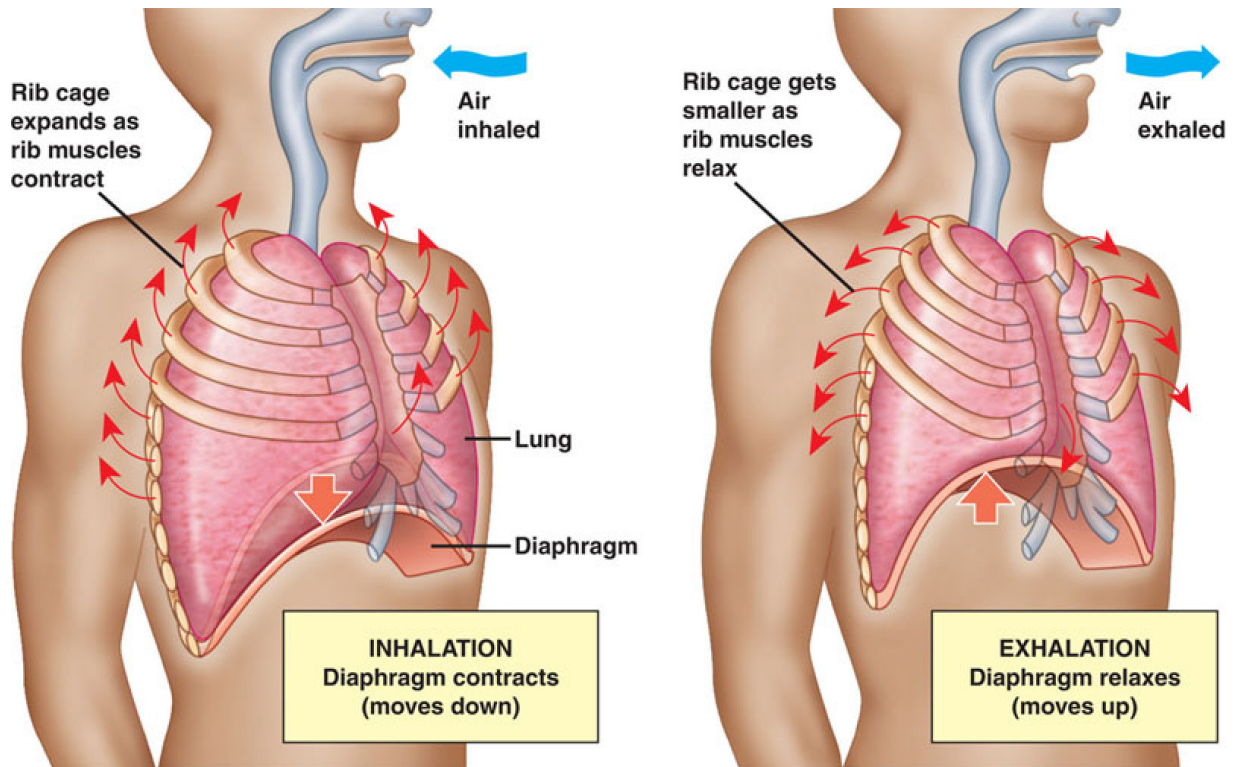


Figure 1 : représentation schématique de la ventilation en pression négative chez l'homme.

Lors de la phase inspiratoire (A) le diaphragme se contracte et s'abaisse (flèche orange). Il en résulte une augmentation du volume thoracique (flèches rouges) et l'installation d'une pression négative au sein des poumons, responsable de l'entrée d'air. L'expiration passive (B) est sous-tendue par la relaxation, et donc du retour dans sa position relevée, du diaphragme. Le volume thoracique est diminué et l'air est chassé des poumons.

2 - Eléments de mécanique ventilatoire

Bien que spontanée, la phase inspiratoire d'inhalation d'air est généralement un mouvement actif : elle résulte d'activités musculaires concertées qui soulèvent la cage thoracique. A cet effet, le diaphragme, commandé par le nerf phrénique issu des segments cervicaux 3, 4 et 5, est le muscle inspiratoire prépondérant. Quand il se contracte, le contenu abdominal est refoulé vers le bas et l'avant, entraînant ainsi une augmentation des volumes thoraciques et pulmonaires (Figure 1A). La pression au sein des poumons devient négative, et l'air y est aspiré selon son gradient : on parle de ventilation en pression négative. L'accroissement thoracique est également facilité par la contraction concomitante des muscles intercostaux externes, connectés à la cage thoracique, et commandés par les nerfs du même nom issus de la moelle épinière. L'air inspiré remplit les alvéoles pulmonaires, lieu d'échanges entre environnement et milieu intérieur. Les gaz diffusent des alvéoles vers le sang capillaire sous l'influence des différences de pression partielle. La pression partielle d'O₂ dans les

alvéoles étant bien supérieure à celle du sang veineux qui circule dans les capillaires alvéolaires, on obtient une charge d'O₂ dans le sang destiné aux cellules. Réciproquement, la pression partielle de CO₂ dans les alvéoles est bien inférieure à celle du sang veineux : ce gaz est chassé vers l'air destiné à l'expiration.

L'expiration est normalement passive en respiration calme ou au repos. La simple relaxation du diaphragme et des muscles intercostaux, associée à l'élasticité naturelle des alvéoles pulmonaires et de la cage thoracique, comprime les poumons (Figure 1B). L'air est expulsé lorsque la pression en leur sein redevient positive. A l'effort et en cas d'hyperventilation, l'organisme peut recruter des effecteurs expiratoires dédiés ; l'expiration devient active. Il s'agit principalement des muscles de la paroi abdominale, qui lorsqu'ils se contractent, repoussent le diaphragme vers le haut et renforcent ainsi la surpression pulmonaire. L'expulsion de l'air en est alors facilitée. Les muscles intercostaux internes aident à l'expiration active en attirant les côtes vers le bas et en dedans, réduisant le volume gazeux thoracique. Enfin, le comportement ventilatoire fait aussi intervenir d'autres groupes musculaires accessoires. Par exemple, des voies aériennes supérieures (trachée, bronches) participent à la modulation du débit respiratoire en modifiant la résistance au passage de l'air.

3 - Un comportement d'origine centrale...

En moyenne, au cours de la vie, nous inspirons et expirons 600 millions de fois, le plus souvent sans effort et même de façon inconsciente. Ceci est rendu possible par l'existence d'une horloge respiratoire dans le cerveau, en d'autres termes une collection de neurones spontanément actifs déclenchant de manière périodique et en alternance la contraction des muscles inspiratoires et expiratoires tels que le diaphragme et les muscles abdominaux.

On soupçonne depuis l'Antiquité et les observations de Gallien que le rythme respiratoire prend naissance au sein du système nerveux central et en amont de la moelle épinière. Les travaux classiques d'électrophysiologie de Flourens (1851), Lumsden (1923a,b) et Stella (1938) ont démontré que le rythme était en effet généré dans le tronc cérébral, faisant intervenir à la fois le pont et le bulbe. Par la suite, des neurones dits respiratoires, c'est à dire présentant une activité électrique en phase avec celle des nerfs respiratoires ont été identifiés au sein de différents groupes du tronc cérébral.

Les préparations *in vitro*, notamment de tronc cérébral et moelle épinière isolés, ont ensuite permis l'identification des structures cérébrales à l'origine même du rythme

respiratoire. Smith et al. (1991) ont procédé à des sections progressives du tronc cérébral et ont observé les modifications des activités motrices. Ils montraient que la genèse de l'activité inspiratoire nécessite une région du bulbe caudal nommée complexe pre-Bötzing (preBötC). Depuis sa découverte, ce réseau fut l'objet de très nombreuses études qui lui ont attribué quasi-unanimement un rôle vital chez de nombreux mammifères. En 2003, d'autres auteurs ont détecté une activité qui précéderait celle du preBötC dans une région plus rostrale du bulbe ventral. Ce groupe respiratoire para-facial (ou pFRG) joue vraisemblablement un rôle dans l'élaboration de la commande respiratoire centrale en interagissant avec le preBötC.

La présentation des différents groupes neuronaux du tronc cérébral impliqués dans le contrôle du comportement respiratoire sera l'objet du premier chapitre de cette introduction.

4 - ... qui repose sur l'activité d'un générateur central de rythme

Dès l'identification du preBötC en 1991, une propriété particulière de ce réseau était mise à jour : son activité rythmique résiste à l'isolement *in vitro*. Ainsi, même en dehors de l'organisme, donc en l'absence de toute information sensorielle, notamment de retours liés aux mouvements, le preBötC continue à émettre spontanément des décharges rythmiques d'activité assimilables aux décharges inspiratoires. Tous les éléments nécessaires à la production du rythme sont donc confinés spatialement et peuvent être préservés sur une préparation réduite, notamment une tranche transversale. Ces propriétés définissent un générateur central de rythme (ou CPG pour Central Pattern Generator) ou oscillateur. Le pFRG semble présenter des capacités similaires. On considère ainsi que la rythmogenèse centrale repose sur l'activité concertée de deux oscillateurs qui forment le générateur central du rythme respiratoire.

On sait maintenant que de nombreux comportements moteurs chez les mammifères reposent sur l'activité de CPGs. Parmi eux, le comportement locomoteur, localisé dans la moelle épinière, est particulièrement étudié, notamment en raison de la simplicité d'accès des mouvements produits. Outre le réseau respiratoire, le tronc cérébral renferme de nombreux CPGs intermittents, c'est-à-dire dont l'activité nécessite des entrées stimulatrices. Parmi eux, on compte le CPG qui pilote les mouvements oro-faciaux associés à la mastication (Chandler and Tal, 1986) ainsi que ceux qui commandent les comportements de succion (Nakamura et al., 1999), de déglutition (Jean, 2001), et de vomissement (Fukuda and Koga, 1991). De manière intéressante, ces comportements, lorsqu'ils sont activés, doivent s'intégrer avec le comportement respiratoire, vital en toutes circonstances. Il existe donc des interactions

fonctionnelles importantes, entre les différents CPGs du tronc cérébral. Elles s'illustrent, dans le cas du vomissement par exemple, par le recrutement de neurones respiratoires du BötC en réponse à des stimulations vagales abdominales. En outre, un dysfonctionnement de cette coordination peut être à l'origine de «fausses-routes».

Les caractéristiques détaillées des deux oscillateurs qui forment le réseau neuronal générateur du rythme respiratoire feront l'objet du second chapitre de cette introduction.

5 - Un comportement à la fois robuste et plastique

Nous respirons en toutes circonstances. Les mouvements respiratoires commencent pendant la vie fœtale, sont continus à la naissance et, à l'exception de très rares et brèves pauses (apnées), persistent toute la vie. Les circuits neuronaux à l'origine du comportement respiratoire se doivent donc d'être parfaitement adaptés à un fonctionnement à la fois continu et adaptatif. Ils doivent par exemple s'adapter à la maturation et au vieillissement des effecteurs, prendre en compte les variations des concentrations des gaz sanguins, qu'elles soient d'origine interne (activité physique) ou externe (altitude) ou encore intégrer l'activité respiratoire dans d'autres comportements, parfois beaucoup plus complexes et pouvant recruter des effecteurs communs (déglutition, phonation). L'activité émise par le générateur, bien que douée d'autonomie, est sous l'influence directe de nombreux autres groupes neuronaux, respiratoires ou non. Ils lui relaient notamment les informations relatives à l'étirement des poumons (réflexe de Hering-Breuer) ou celles en provenance des chémosenseurs périphériques (localisés dans les corps carotidiens), qui détectent les variations de O₂ et CO₂ dans le sang. Certains centres respiratoires seraient eux-mêmes doués de chémosensibilité intrinsèque ; on parle de chémorécepteurs centraux. Enfin, l'existence d'afférences corticales est notamment illustrée chez l'homme par notre capacité à intégrer la respiration au sein de comportements plus complexes (comme la parole, exercice physique), et même de la contrôler parfois de manière surprenante (cas de la nage en apnée par exemple).

6 - Un comportement acquis avant la naissance

Le comportement respiratoire est crucial dès les premiers instants de la vie *ex utero*. Alors que le fœtus reçoit l'O₂ et le CO₂ par le sang maternel, le nouveau-né ne peut plus en

bénéficier après section du cordon ombilical. En réponse à l'effondrement rapide de O_2 et la montée de CO_2 et de H^+ , les centres respiratoires vont subir pour la première fois un intense bombardement de stimuli en provenance des chémorécepteurs périphériques et centraux. Ce phénomène facilite l'arrivée de la première inspiration, souvent d'une amplitude particulièrement grande afin de vaincre tous les facteurs de résistance (les poumons contiennent encore du liquide). Rapidement, le nouveau-né adopte des mouvements de plus en plus réguliers qui dans la plupart des cas, assurent une fonction ventilatoire efficace. Cette capacité à ventiler rapidement après la naissance suggère que les centres respiratoires sont déjà fonctionnels. Renforçant cette idée, la présence de mouvements respiratoires fœtaux (MRFs) a d'ailleurs été observée *in utero*, chez l'homme comme chez de nombreux mammifères. Il est maintenant établi que les centres respiratoires, y compris le réseau neuronal générateur du rythme, sont fonctionnellement actifs dès les stades embryonnaires.

Le troisième chapitre de cette introduction s'intéressera aux activités dites « de type respiratoires » présentes aux stades embryonnaires chez les rongeurs. L'accent sera mis sur l'émergence des oscillateurs respiratoires du réseau neuronal générateur du rythme.

7 - Un comportement parfois défaillant

Le contrôle central de la respiration est affecté dans de nombreuses pathologies comme le syndrome congénital d'hypoventilation centrale ou syndrome d'Ondine (Weese-Mayer et al., 2005), le syndrome de Rett (Ogier and Katz, 2008), l'atrophie multisystématisée (Benarroch, 2007) et probablement le syndrome de mort subite du nouveau-né (SIDS) (Weese-Mayer et al., 2008). La faillite de ce contrôle est aussi une cause probable de la mort de patients affectés de maladies dégénératives, incluant la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques (Nogues and Benarroch, 2008) et les tauopathies (Dutschmann et al., 2010). Mais le plus grand défi en santé publique impliquant les apnées centrales sont les apnées néonatales de l'enfant prématuré (Abu-Shaweesh and Martin, 2008) et la reconnaissance de la contribution croissante des apnées du sommeil (associées aux apnées obstructives du sommeil) au "désordre respiratoire du sommeil" ou "apnées complexes" (Eckert et al., 2009) et leurs escortes de complications neurologiques et cardiovasculaires (Guyenet, 2006; Leung, 2009). La correction de ces pathologies requiert une connaissance des circuits neuronaux sous-jacents bien plus fine que la vision schématique que nous en avons à l'heure actuelle.

8 - L'intérêt d'une approche développementale

Les pathologies respiratoires d'origine centrale restent mal définies d'un point de vue cellulaire et moléculaire, et peu d'explication mécanistiques sont fournies. Beaucoup d'entre elles sont congénitales, donc présentes à la naissance, et vraisemblablement d'origine génétique. Il semble de plus en plus évident qu'une approche associée à la neurobiologie du développement puisse apporter de précieux éléments de réponse. Notamment, on attribue aujourd'hui l'existence de sous types neuronaux variés à une expression différentielle de certains facteurs de transcription précocement au sein des progéniteurs neuraux. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la spécification neuronale : ils orientent la descendance cellulaire vers un destin fonctionnel spécifique, tout en inhibant la différenciation vers des destins alternatifs. Les outils modernes de transgénèse chez la souris permettent l'invalidation sélective d'un de ces acteurs clé du développement, et l'analyse des conséquences anatomiques et fonctionnelles. Par leur relative simplicité, le maintien de leur activité en dehors de l'animal, leur contribution à un comportement moteur vital et facilement mesurable, les CPGs sont particulièrement adapté à une telle approche interdisciplinaire.

Par une telle stratégie multidisciplinaire, le laboratoire a récemment identifié le rôle essentiel du facteur de transcription Phox2b dans le déploiement des neurones constitutifs de l'oscillateur du groupe respiratoire para-facial pendant l'embryogenèse. De manière intéressante, la majorité des patients humains atteints du syndrome d'Ondine portent une mutation sur ce même facteur de transcription. L'introduction, chez la souris, de la mutation humaine la plus fréquente entraîne un phénotype respiratoire comparable à celui observé chez les patients, renforçant encore l'impact de ces approches génétiques chez l'animal. Néanmoins, ces approches appliquées au réseau respiratoire restent encore rares. Notamment, le programme développemental aboutissant aux cellules à l'origine du rythme respiratoire au sein du preBötC reste inconnu.

L'objectif de cette thèse est d'adresser cette dernière question chez l'embryon de souris. Pour bien comprendre l'approche mise en œuvre, nous aborderons au quatrième chapitre de cette introduction les mécanismes développementaux qui opèrent au sein du tube neural embryonnaire pour assurer la genèse de populations neuronales spécialisées en des positions spécifiques.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le laboratoire peut être considéré comme pionnier dans l'utilisation des données de la biologie du développement et des techniques de l'embryologie expérimentale pour comprendre la physiologie des réseaux neuronaux rythmiques du tronc cérébral. De façon remarquable, les travaux précédents établissaient un lien entre événements développementaux précoces, en particulier régionalisation du rhombencéphale, et formation d'un circuit fonctionnel, notamment respiratoire, à la naissance (Jacquin et al., 1996; Champagnat and Fortin, 1997; Fortin et al., 1999; Coutinho et al., 2004; Borday et al., 2006; Chatonnet et al., 2007; Wrobel et al., 2007). La stratégie « interventionniste » utilisée bénéficie continuellement des avancées de la génétique chez la souris, permettant de manipuler des territoires embryonnaires de plus en plus restreints, et de l'imagerie fonctionnelle, permettant une analyse, à l'échelle cellulaire ou des populations de neurones, des modifications du système occasionnées. Cette approche a récemment conduit à l'identification des premiers neurones dont l'activité rythmique spontanée chez l'embryon est liée à la respiration et à la caractérisation de gènes clés contrôlant leur développement (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009). Parmi ces gènes, le facteur de transcription *Phox2b*, qui détermine l'identité neuronale viscérale (Pattyn et al., 1997; Dauger et al., 2003; Tiveron et al., 2003) et dont des mutations chez l'homme sont associées au syndrome d'Ondine, ou CCHS (Amiel et al., 2003). Ces travaux ont ainsi rapidement conduit à proposer des bases cellulaires à l'origine du déficit fonctionnel associé à cette pathologie. Ils représentent un exemple de progrès rapide sur le plan fondamental de l'organisation du réseau neuronal générateur du rythme respiratoire avec des implications directes dans l'étiopathologie d'un syndrome respiratoire majeur (Goridis et al., 2010).

Cette série d'études concernait l'oscillateur respiratoire parafacial (pFRG) ou sa forme embryonnaire (e-pF) dont le rôle peut être qualifié de subsidiaire par rapport à l'oscillateur principal, le complexe preBötzinger (preBötC). Les recherches sur l'origine développementale de ce dernier sont moins avancées. Quelques études ont caractérisé des programmes développementaux influençant l'émergence de l'activité rythmique (Blanchi et al., 2003; Pagliardini et al., 2005). Elles ont cependant désigné des facteurs de transcription exprimés précocement par des territoires embryonnaires étendus, ce qui n'exclue donc pas la possibilité que l'altération d'autres structures cérébrales participent au déficit observé en leur absence, ou

n'aboutissant pas à aux cellules constitutives de l'oscillateur directement impliquées dans la genèse de l'activité rythmique. Ainsi, l'objectif de ma thèse était de déterminer l'origine embryonnaire des cellules constitutives de l'oscillateur preBötC

L'enjeu était l'identification au sein de l'oscillateur de populations d'importance fonctionnelle sur la base d'un programme génétique restreint aboutissant à leur production pendant l'embryogenèse. Nous avons considéré les facteurs de transcription qui forment le code combinatoire caractéristique des différents territoires – ou domaines – de progéniteurs discrètement répartis le long de l'axe dorso-ventral du rhombencéphale embryonnaire et qui jouent un rôle majeur dans la genèse de la diversité neuronale (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000).

La contribution d'un territoire donné de progéniteurs à la commande centrale respiratoire a été étudiée sur des animaux génétiquement modifiés (KO simples et conditionnels, constructions conditionnelles interférant avec l'activité ou la connectivité, lignées rapporteur) en considérant l'influence de sa descendance cellulaire sur i) le comportement respiratoire à la naissance, ii) la mise en place fonctionnelle du preBötC et ses mécanismes opératoires, et iii) à la mise en place des constituants cellulaires du preBötC.

- L'absence totale de comportement respiratoire à la naissance de la lignée portant une mutation nulle du gène *Dbx1* a conduit à l'hypothèse que ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle crucial dans la rythmogenèse.

- L'origine centrale du phénotype a été caractérisée en analysant *in vitro* l'activité des deux oscillateurs formant le générateur respiratoire. Plus précisément, des défauts à la fois anatomiques et fonctionnels ont été recherchés, respectivement par des approches immunohistochimiques et des enregistrements électrophysiologiques couplés à l'imagerie calcique.

- La contribution directe des interneurons dont la spécification dépend de *Dbx1* (interneurons V0) a été questionnée sur des lignées rapporteur. Nous avons recherché des signatures à la fois anatomiques et fonctionnelles connues du preBötC.

- Enfin, nous avons été conduits à examiner le lien existant entre spécification de neurones vitaux par *Dbx1* et établissement des projections commissurales bulbaires à l'origine de la synchronisation bilatérale du rythme. Cette dernière question a été abordée par des approches fonctionnelles (stimulations électriques), anatomiques (traçage des projections axonales) et génétiques (lignées conditionnelles interférant avec l'activité).

I. LE RÉSEAU NEURONAL RESPIRATOIRE

1 - Les neurones respiratoires

L'identification des neurones respiratoires a d'abord été réalisée *in vivo* sur des animaux paralysés, vagotomisés et ventilés artificiellement. Lors de ces expériences, l'enregistrement du nerf phrénique, nerf moteur du diaphragme, est un témoin du cycle respiratoire. Son activité révèle un rythme à trois phases. Le début de la phase inspiratoire ou « on-switch » se traduit par une augmentation transitoire de l'activité phrénique en début d'inspiration. Elle est suivie d'une activité permanente formant progressivement une « rampe inspiratoire » croissante, brutalement interrompue par l'« off-switch » qui marque le début de l'expiration. L'« off-switch » est généralement suivi d'une faible activité résiduelle du nerf phrénique correspondant à la phase « post-inspiratoire » puis du silence du nerf phrénique signifiant l'expiration (Richter, 1982 ; Bianchi et al., 1995).

Les études ultérieures ont mis en évidence la présence, au sein du tronc cérébral, de neurones dits respiratoires : ils émettent des potentiels d'action en relation avec les phases inspiratoires, post-inspiratoires ou expiratoires (Figure 2). Ces neurones ont donc été classés en fonction de deux paramètres : le motif de la décharge (croissante, décroissante, transitionnelle) et la phase de l'activité (inspiration, post-inspiration, expiration) (Richter et al., 1987). Il en résulte au moins six classes de neurones : les neurones pré-inspiratoires (pré-I), les neurones inspiratoires précoces, globaux et tardifs, les neurones post-inspiratoires (post-I) et les

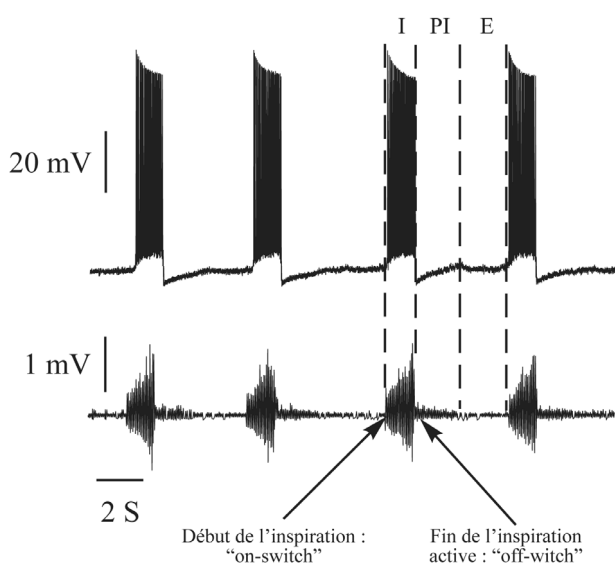


Figure 2 : enregistrements simultanés d'un neurone inspiratoire et de la décharge du nerf phrénique chez le chat *in vivo*.

La décharge du neurone (trace du haut) est synchronisée avec celle du nerf phrénique (trace du bas) qui commande la contraction du diaphragme à l'origine de l'inspiration (I). Il s'agit donc d'un neurone de type inspiratoire. Les enregistrements sont effectués sur un animal anesthésié, vagotomisé, paralysé et ventilé artificiellement. L'activité phrénique représente donc une respiration fictive produite par le générateur central indépendamment du gonflement des poumons.

Le début de l'inspiration est l'« on-switch », la fin de l'inspiration est l'« off-switch ». Après l'inspiration, la décharge du nerf comporte une composante de faible activité : c'est la post-inspiration. La phase d'inactivité du nerf phrénique correspond à l'expiration (E).

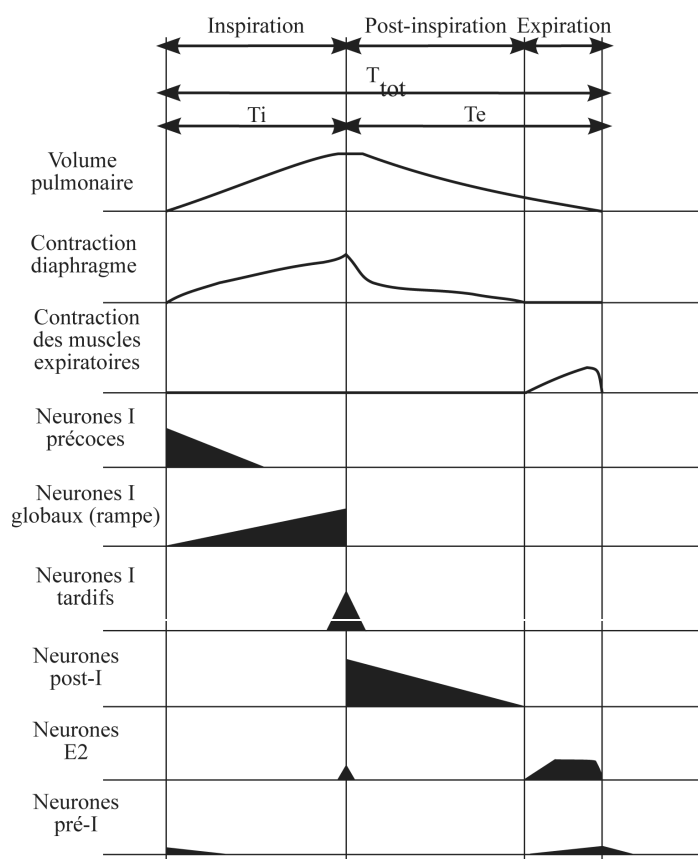


Figure 3 : représentation schématique de six types de neurones respiratoires bulbaire en fonction du cycle respiratoire *in vivo*.

L'enregistrement de ces neurones a été réalisé sur des animaux non anesthésiés, mais décérébrés, paralysés, et ventilés artificiellement. Ces neurones bulbaire, répartis au sein du tronc cérébral, forment le réseau neuronal respiratoire. L'enregistrement intracellulaire et l'étude pharmacologique des relations synaptiques a montré l'existence de puissantes inhibitions, par exemple entre les neurones I précoces et I rampe. Ces relations inhibitrices ainsi que les propriétés électriques membranaires sont importantes pour la genèse du rythme respiratoire normal chez l'adulte.

Adapté d'après Richter et al., 1986.

neurones expiratoires (Figure 3). Dès lors, ces neurones respiratoires sont soupçonnés être à l'origine du contrôle des mouvements organisés

de la musculature respiratoire.

La localisation fonctionnelle des neurones respiratoires au sein du réseau rythmique peut être déduite des sites de leur projection axonale. Trois types cellulaires caractérisés par leur connectivité ont ainsi pu être mis en évidence (Merrill, 1970 ; Bianchi, 1971) : i) des motoneurones bulbaire qui innervent les muscles lisses des voies aériennes supérieures telles que le larynx, innervé par le nerf laryngé récurrent (cf. revue Bartlett, 1989) ; ii) des interneurones bulbospinaux (neurones prémoteurs) qui projettent du bulbe vers les centres moteurs spinaux qui innervent le diaphragme ou les muscles intercostaux (Nakayama & von Baumgarten, 1964 ; Merrill, 1970 ; Bianchi, 1971) ; iii) des interneurones propriobulbaire qui créent des connexions à l'intérieur du bulbe. Ces derniers sont d'un intérêt tout particulier car certains constituent vraisemblablement la source de l'activité rythmique à l'origine du comportement respiratoire, comme nous le verrons par la suite.

Les expériences suivantes sur la génération du rythme respiratoire ont utilisé la préparation de tronc cérébral / moelle épinière isolés de rat nouveau-né, mise au point par Suzue en 1984. Cette préparation préserve l'intégralité du tronc cérébral ainsi que la moelle épinière cervicale et l'essentiel des sorties motrices des nerfs respiratoires, notamment celle du nerf phrénique (C4). L'enregistrement *in vitro* de leur activité révèle la persistance de

décharges spontanées et régulières, assimilables au rythme respiratoire : on parle de respiration fictive. Le tronc cérébral renfermerait ainsi tous les acteurs suffisants à l'élaboration d'une commande respiratoire. Ces préparations ont été largement utilisées depuis pour étudier les mécanismes centraux de la genèse et du contrôle neuronal du rythme respiratoire. De nombreuses expériences montrent que les neurones respiratoires identifiés précédemment *in vivo* peuvent être retrouvés dans ces préparations de tronc cérébral isolé *in vitro* (Feldman, 1986 ; Morin-Surun et al., 1992 ; Rekling et al., 1996).

2 - Les groupes respiratoires

L'ensemble des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* ont permis d'établir que les neurones respiratoires sont répartis au sein du tronc cérébral en différents groupes (Figure 4). Leur contribution fonctionnelle respective a pu être déduite des modifications de l'activité respiratoire suite à des sections étagées du tronc cérébral. Certains exercent principalement un rôle modulateur sur l'activité respiratoire. Ils participeraient au couplage du comportement respiratoire au système cardiovasculaire et à l'intégration de la respiration aux autres activités de l'organisme. D'autres semblent impliqués dans la genèse du rythme à proprement parler. Ces derniers sont l'objet des travaux de cette thèse et seront détaillés lors du chapitre suivant.

2.1 - Les régions respiratoires bulbaires

2.1.1 - Le groupe respiratoire dorsal (DRG) et les afférences sensorielles

Le groupe respiratoire dorsal (Dorsal Respiratory Group, DRG, Figure 4) est une structure bilatérale située dorsalement dans la partie médiane du bulbe caudal. Il est constitué de la partie ventrolatérale du noyau du tractus solitaire (NTS) et s'étend rostralement par rapport à l'obex. Le NTS reçoit des informations périphériques et centrales et constitue donc un carrefour pour l'intégration de phénomènes somatiques et végétatifs impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. Le DRG participe donc à l'élaboration d'un comportement respiratoire adapté à chaque situation physiologique.

Le NTS reçoit notamment les afférences vagales qui véhiculent l'activité des récepteurs broncho-pulmonaires sensibles à l'étirement (Kalia et Mesulam, 1980a, b). Ces derniers sont stimulés à chaque inspiration par les mécano-récepteurs alvéolaires sensibles à l'étirement. Le système respiratoire répond à leur excitation par un arrêt réflexe de l'activité inspiratoire et la transition vers la phase expiratoire : c'est le réflexe d'Hering-Breuer. Il est très important chez

le nourrisson car il participe à la stabilisation du rythme respiratoire. Plusieurs autres types de récepteurs en provenance des voies aériennes envoient des projections vers le NTS via le nerf vague. Ces récepteurs contrôlent différents réflexes participant à la régulation de la résistance et de l'intégrité des voies aériennes. Il s'agit notamment des récepteurs pulmonaires « J » impliqués dans les réponses à l'œdème ou à la congestion pulmonaire, des récepteurs laryngo-trachéaux, capables d'initier le réflexe de la toux, et des récepteurs à l'irritation des voies aériennes dont l'activité entraîne une constriction des voies aériennes et donc une augmentation de leur résistance.

Le NTS intègre également les afférences dopaminergiques glossopharyngiennes en provenance des chémorécepteurs périphériques (Davies et Edwards, 1973 ; Jordan and Spyer, 1977 ; Lipski et al., 1977). Ces derniers sont principalement constitués des corps carotidiens, situés au niveau des bifurcations carotidiennes, qui détectent les variations de PaO₂, de PaCO₂ et de pH artériel. Leur stimulation par une hypoxie (diminution de la PaO₂), une hypercapnie (augmentation de la PaCO₂) ou une acidose (diminution du pH), entraîne une augmentation de l'activité ventilatoire, ou hyperventilation.

La connectivité efférente du NTS s'établit avec de nombreux groupes bulbaires et supérieurs, impliqués dans la régulation de l'homéostasie. Au niveau bulbaire, il projette par exemple vers le noyau moteur dorsal du vague qui contient des neurones pré-ganglionnaires impliqués dans le contrôle des fonctions cardiovasculaire ou digestive. Par l'intermédiaire d'un relais dans le noyau parabrachial médian (groupe respiratoire pontique, voir plus bas), il projette vers le complexe thalamique, le cortex cérébral et l'hypothalamus (Ter Horst et al., 1989; Herbert et al., 1990). Enfin, les axones du NTS sont connectés ventralement aux régions impliquées dans la rythmogenèse respiratoire, incluant vraisemblablement le preBötC (Norgren, 1978 ; Ross et al., 1985 ; Otake et al. 1989 ; Zheng et al., 1998).

2.1.2 - Le groupe respiratoire ventral

Le groupe respiratoire ventral (ou Ventral Respiratory Group, VRG, Figure 4) a été décrit pour la première fois par Bianchi (1971) chez le chat. Il s'agit d'un groupe bilatéral formant une colonne longitudinale dans le bulbe ventrolatéral qui s'étend de la limite ponto-bulbaire (en arrière du noyau moteur du nerf facial) à la limite bulbo-spinale. Elle est subdivisée en trois régions : caudale, intermédiaire, et rostrale. La région caudale (cVRG) s'étend de l'obex à la limite bulbo-spinale et comprend le noyau rétro-ambigu. Elle renferme une majorité de neurones expiratoires bulbo-spinaux qui vont projeter vers la moelle épinière (Bianchi ; 1971). La partie intermédiaire (VRGi) comprend notamment le noyau ambigu, formé des corps

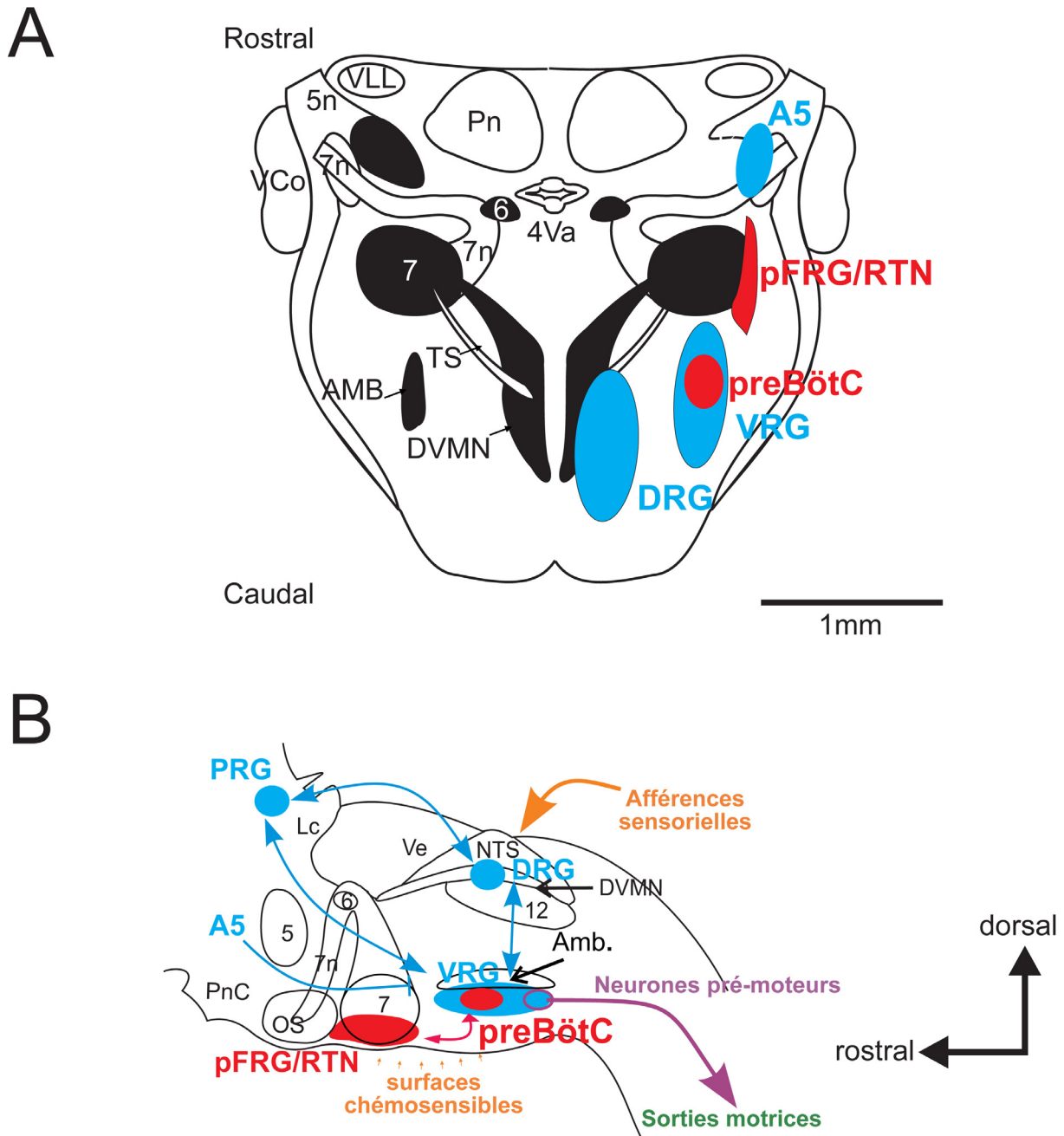


Figure 4 : représentations schématiques des groupes respiratoires du tronc cérébral, de leur localisation et de leurs interactions.

(A) Projection dans un plan horizontal, **(B)** projection dans un plan sagittal.

Les neurones respiratoires sont répartis au sein du tronc cérébral en groupes respiratoires (en bleu) : le groupe respiratoire pontique (PRG), les neurones catécholaminergiques du groupe A5 (A5), le groupe respiratoire dorsal (DRG) et le groupe respiratoire ventral (VRG). Les deux CGPs, ou oscillateurs, qui forment le réseau neuronal générateur de rythme sont représentés en rouge : le complexe preBötzinger (preBötC), localisé dans le VRG rostral, et le groupe respiratoire para-facial/noyau rétrotrapézoïde (pFRG/RTN), situé sous les neurones moteurs du nerf facial (7).

Structures et noyaux : 4Va : partie antérieure du 4^{ème} ventricule, 5 : noyau moteur trijumeau, 6 : noyau moteur abducens, 7 : noyau moteur facial, 7n : nerf facial, 12 : noyau de l'hypoglosse, Amb : noyau ambigu, DVMN : noyau moteur dorsal du vague, Lc : locus coeruleus, NTS : noyau du tractus solitaire, OS : olive supérieure, Pn : noyau pontique, PnC : noyau pontique caudal, TS : tractus solitaire, VCo : noyaux vestibulo-cochléaires, Ve : noyaux vestibulaires, VLL : lemniscus ventro-latéral.

cellulaires des motoneurones des nerfs crâniens glossopharyngiens et vague, actifs à la fois pendant l'inspiration et l'expiration. On y trouve également le noyau para-ambigu qui est constitué de neurones prémoteurs bulbo-spinaux respiratoires projetant sur les motoneurones spinaux qui innervent les muscles respiratoires thoraciques. Le VRGi contient aussi des neurones propriobulbaires chargés de coordonner l'activité des muscles ayant un rôle de pompe et les systèmes gérant la résistance des voies aériennes. La partie la plus rostrale du VRG (VRGr) est localisée à proximité du noyau rétro-facial (partie antérieure du noyau ambigu). Elle comprend un ensemble dense de motoneurones pharyngés inspiratoires et expiratoires (Bianchi et al., 1988) ainsi que des interneurones respiratoires projetant dans le bulbe caudal et vers la moelle épinière (Bystrzycka, 1980). Certains d'entre eux sont caractérisés par une décharge expiratoire croissante et forment un groupe appelé complexe Bötzing (BötC). Ils projettent également sur le VRGr et le VRGi grâce à des collatérales (Otake et al., 1987).

En outre, on considère à présent que le VRG renferme dans sa partie rostrale un groupe neuronal en charge de la genèse même de l'activité rythmique respiratoire, le complexe preBötzing (preBötC). Ces neurones sont en effet nécessaires à la genèse d'une activité rythmique sur une préparation de tronc cérébral isolé et ils maintiennent un profil de décharge rythmique et entretenu lorsqu'ils sont isolés du reste du tronc cérébral dans une tranche transversale. Ils formeraient donc un générateur central de rythme ou CPG.

Les travaux de cette thèse portent essentiellement sur les populations d'interneurones soupçonnées être à l'origine de la rythmogenèse. Le preBötC fera donc l'objet d'une présentation détaillée au chapitre suivant dédié aux structures rythmogènes du tronc cérébral.

2.1.3 - Le groupe respiratoire para-facial et le noyau retrotrapézoïde

Le groupe respiratoire para-facial (pFRG) est décrit chez le nouveau né, comme une population neuronale situé rostralement dans le bulbe ventral, sous les neurones moteurs du noyau facial. Des découvertes récentes en font un candidat important à la rythmogenèse respiratoire, en association avec le preBötC. D'une part, il renferme des neurones qui déchargent avant la phase inspiratoire. D'autre part, des expériences suggèrent une interaction fonctionnelle avec le preBötC et une contribution à la rythmogenèse. Enfin, cette région anatomique du bulbe semble chevaucher considérablement la région du noyau retrotrapézoïde (RTN) décrit chez le rongeur adulte. Le RTN est une structure particulièrement impliquée dans les mécanismes de chémosensibilité. L'activité de ses neurones augmente par exemple en

réponse à une hypercapnie. De manière intéressante, certains neurones du pFRG sont aussi doués de chémosensibilité intrinsèque chez le nouveau-né. Ainsi le pFRG et le RTN seraient, du moins en partie, des structures équivalentes à des âges développementaux différents. Ce sujet est largement débattu de nos jours et ce serait hors de propos d'en présenter tous les arguments ici. En conséquence, nous allons faire référence à cette région comme pFRG/RTN. Les arguments qui lui attribuent un rôle dans l'élaboration de l'activité rythmique respiratoire seront présentés au cours du chapitre suivant.

2.2 - Les régions respiratoires pontiques

2.2.1 - Le groupe respiratoire pontique

Chez l'animal vagotomisé, l'ablation d'un groupe neuronal pontique comprenant les noyaux parabrachial médian et Kolliker-Fuse entraîne une respiration apneustique formée d'inspirations très longues (Cohen et Wang, 1959 ; Bertrand et Hugelin, 1971 ; Feldman et Gautier, 1976 ; Von Euler et al., 1976). Cette structure, nommée groupe respiratoire pontique ou PRG (Feldman, 1986) comporte des neurones qui déchargent de façon tonique avec une fréquence correspondant aux phases respiratoires. On retrouve donc des neurones inspiratoires, expiratoires ou transitionnels, c'est-à-dire actifs entre les deux phases respiratoires (Bertrand et Hugelin, 1971). Le PRG reçoit des afférences du noyau du tractus solitaire, de l'area postrema et de la surface ventrale du bulbe qui sont en relation avec les fonctions viscérales, cardiovasculaires, gustatives et neuroendocrines. Les neurones du PRG projettent leur axone vers les thalamus et l'hypothalamus et entretient des connexions réciproques avec l'amygdale et le noyau paraventriculaire. L'ensemble des données fonctionnelles suggère que le PRG influence la terminaison de l'inspiration et la durée des différentes phases du cycle respiratoire.

2.2.2 - Le groupe A5

Il existe un autre mécanisme de contrôle du rythme respiratoire en provenance du pont latéral et ventrolatéral, et plus particulièrement des neurones noradrénergiques du groupe A5. Les neurones A5 exercent une modulation négative de la genèse du rythme dans une préparation de tronc cérébral isolé (Hilaire et al., 1989 ; Errchidi et al., 1991). Des stimulations électriques de ces neurones entraînent une diminution de la fréquence respiratoire et deviennent inefficaces en présence d'antagonistes noradrénergiques (Hilaire et al., 1989). Réciproquement, l'élimination du pont entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire (Errchidi et al., 1991).

Les neurones respiratoires sont donc répartis au sein du tronc cérébral en différents groupes. Chacun d'eux joue un rôle particulier dans l'élaboration de l'activité motrice respiratoire. La connectivité particulière entre groupes respiratoires ayant des propriétés distinctes serait à l'origine d'une commande complexe et capable de s'adapter aux changements de situations physiologiques. Parmi ces groupes, deux seraient intrinsèquement rythmogènes et directement impliqués dans la genèse de l'activité rythmique: le preBötC, en position para-ambiguale au sein du VRG, est considéré comme la source de l'activité rythmique inspiratoire ; le pFRG/RTN, en position para-faciale, pourrait constituer un second générateur. Le rythme respiratoire serait donc produit par l'activité concertée de deux réseaux rythmogènes, ou oscillateurs, qui forment ainsi un générateur central. Le chapitre suivant lui est consacré.

II. LE GÉNÉRATEUR CENTRAL DU RYTHME

Ce chapitre décrira les structures du tronc cérébral qui présentent une activité rythmique spontanée, candidates à l'initiation des décharges motrices respiratoires. J'insisterai tout d'abord sur le preBötC, considéré comme le site de genèse de l'activité inspiratoire et principal objet ma thèse. J'évoquerai ensuite les travaux qui suggèrent une participation du pFRG/RTN dans la rythmogenèse centrale. Nous aboutirons ainsi au concept d'une rythmogenèse centrale assurée par un réseau neuronal générateur de rythme, constitué de deux réseaux rythmogènes assimilables à des CPGs, ou oscillateurs, interconnectés.

1 - L'oscillateur respiratoire du complexe pré-Bötzinger

Dès les travaux pionniers du neurophysiologiste Jean-Pierre Flourens, la notion de « nœud vital » apparaît : l'ablation chez le lapin d'une petite partie du bulbe caudal entraîne un arrêt respiratoire. Il est alors proposé que ce « nœud vital » contienne la source de l'activité respiratoire (Flourens, 1851, 1858). Ce n'est qu'à partir de 1991 que la localisation des neurones responsables de la genèse de l'activité rythmique respiratoire est attribuée au complexe pré-Bötzinger (preBötC), une région ventrolatérale du bulbe caudal (Smith et al., 1991). Cette étude initiale, largement complétée par de nombreuses autres depuis, confèrent au preBötC le caractère à la fois nécessaire et suffisant pour la rythmogenèse.

1.1 - Le preBötC est à l'origine de la rythmogenèse respiratoire

1.1.1 - Le preBötC est nécessaire et suffisant à la rythmogenèse respiratoire

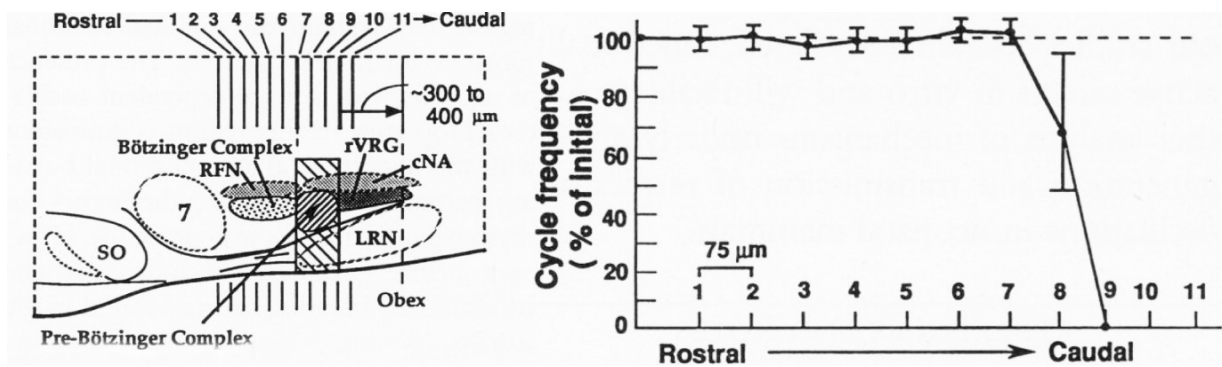
L'étude originale, réalisée sur une préparation réduite de tronc cérébral de rat isolé *in vitro* (Smith et al., 1991), démontrait le caractère nécessaire du preBötC pour la genèse d'une activité rythmique respiratoire. Cette dernière est en effet préservée lorsque des sections coronales sont effectuées sur le tronc cérébral selon l'axe antéro-postérieur jusqu'au niveau du preBötC, mais disparaît lorsque la section le contenant a été effectuée (Figure 5A). L'implication cruciale pour la rythmogenèse respiratoire d'une région anatomique assimilable au preBötC a été depuis décrite chez d'autres mammifères dont la souris (Ramirez et al., 1996), le chat (Connelly et al., 1992; Ramirez et al., 1998) et la chèvre (Wenninger et al., 2004a; Wenninger et al., 2004b).

Indispensable pour la genèse d'une activité respiratoire normale, le preBötC a aussi la capacité d'émettre une activité spontanée lorsqu'il est isolé *in vitro* dans une tranche transversale de tronc cérébral (Figure 5B). Cette activité rythmique, qui a lieu en l'absence de toute stimulation périphérique, supérieure ou chimique, lui vaut la dénomination de CPG, ou oscillateur. Elle serait la source initiale de l'activité respiratoire (Smith et al., 1991). L'activité rythmique de l'oscillateur peut même être maintenue sur des préparations encore plus réduites d'isolats ou « islands » (Johnson et al., 2001). Tous les éléments suffisants à la genèse d'une activité rythmique spontanée seraient ainsi présents au sein du preBötC et préservés lorsqu'il est isolé *in vitro*. On y retrouve notamment différents types de neurones respiratoires précédemment décrits dans l'ensemble du tronc cérébral et impliqués dans la réalisation de la commande respiratoire : des neurones pré-inspiratoires (pre-I), des neurones inspiratoires (Insp), des neurones post-inspiratoires (post-I) et des neurones expiratoires (E) (Connelly et al., 1992). Les neurones pre-I sont d'un intérêt particulier pour expliquer la genèse de l'activité rythmique comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre.

1.1.2 - Le preBötC est à l'origine des multiples activités respiratoires

La ventilation chez les mammifères est caractérisée par différents types d'activité, et implique notamment la capacité à émettre des soupirs et hoquets. Il est possible de détecter au sein de l'oscillateur isolé *in vitro*, outre l'activité rythmique rapide sous-tendant l'eupnée, des décharges biphasiques de plus grande amplitude, intervenant beaucoup plus rarement et systématiquement suivies d'une brève pause dans l'activité eupnéique (Lieske et al., 2000). Ces activités s'apparentent aux soupirs (ou «sighs») définis chez l'animal *in vivo* (Cherniack et al., 1981; Orem and Trotter, 1993). Par ailleurs, en réponse à une absence d'oxygénation du milieu (anoxie), le preBötC serait capable de générer un troisième type d'activité différent de l'eupnée notamment par une plus grande amplitude, une montée rapide et une durée plus courte de la décharge (Lieske et al., 2000). Ce dernier profil se substitue intégralement à l'eupnée en cas d'anoxie prolongée et est assimilable à la suffocation (ou «gasps») décrite *in vivo* (Fung et al., 1994; Wang et al., 1996). Ces trois d'activités (eupnée, soupirs et suffocation) sont générées par les mêmes populations neuronales et le passage d'un type vers l'autre résulterait d'une modulation des propriétés ou du couplage entre les neurones constitutifs du preBötC. Une reconfiguration d'un réseau rythmique résultant en la capacité à produire plusieurs types d'activité existe notamment chez certains invertébrés (Marder and Calabrese, 1996). La capacité de l'oscillateur à générer des activités variées et assimilables à des comportements respiratoires renforce l'hypothèse qui le place au cœur de la rythmogenèse.

A



B

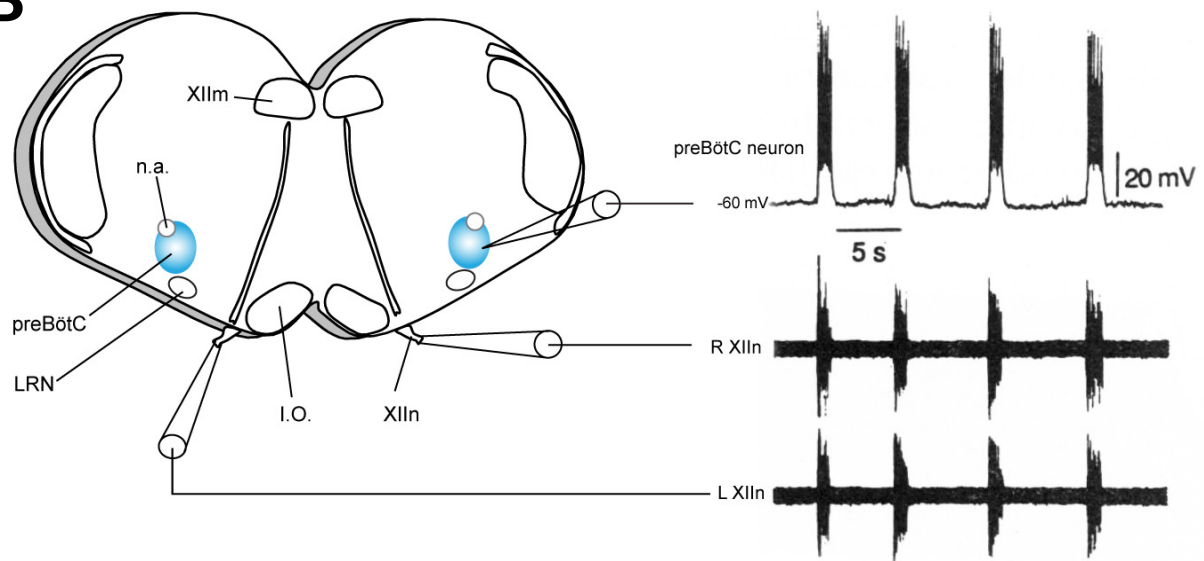


Figure 5 : le preBötC est à l'origine de la rythmogenèse respiratoire.

(A) A gauche : représentation schématique sagittale du tronc cérébral illustrant la position du preBötC et des structures adjacentes. Le rectangle hachuré indique la région nécessaire à la rythmogenèse. Le preBötC s'étend depuis la face caudale du noyau rétro-facial (RFN) jusqu'à environ 200 μm de l'obex. Des sections transversales successives sont effectuées aux positions indiquées par les lignes verticales numérotées au dessus du schéma. A droite : graphique illustrant les variations de la fréquence de décharge du nerf phrénique, dont l'activité est enregistrée sur une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés, au cours d'expériences de sections du tronc cérébral réalisées dans le sens rostro-caudal et séparés de 75 μm (1 vers 11 sur l'image de gauche). Les sections au niveau du preBötC (section 8 à 10) éliminent l'activité rythmique, démontrant le caractère nécessaire de ce réseau neuronal.

SO : olive supérieure; 7 : noyau moteur facial; LRN : noyau latéral réticulé; RFN : noyau retro-facial; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral; cNA : division caudale (semi-compacte) du noyau ambigu.

(B) L'image de gauche illustre une tranche transversale de 500 μm d'épaisseur contenant le preBötC (en bleu) positionné ventralement au noyau ambigu (n.a.), ainsi que les motoneurons (XIIIm) et les racines motrices (XIIIn) du nerf XII. L'enregistrement de ces dernières par des électrodes de succion révèle la persistance d'une activité rythmique motrice spontanée, entretenue, et bilatéralement synchronisée (droite, deux traces du bas). La présence au sein du preBötC de neurones dont l'activité est en phase avec celle des sorties motrices est détectée par la méthode du patch-clamp (droite, tracé du haut). Ces neurones respiratoires seraient la source de l'activité rythmique.

I.O.: olive inférieure, LRN : noyau réticulaire latéral.

Adapté de Smith et al., 1991.

1.2 - Caractéristiques anatomo-fonctionnelles

L'ensemble des données de lésion/isolement positionnent l'oscillateur respiratoire du preBötC en position ventrolatérale dans le bulbe caudal. Son extension rostro-caudale dépend de l'âge et de l'espèce considérée mais se définit globalement par les critères suivants (Figure 5A): à mi-chemin entre la limite caudale du noyau moteur facial et l'obex, immédiatement caudal au complexe Bötzinger (comprenant principalement des neurones expiratoires), rostral au rVRG (ou contenu dans le rVRG, selon les auteurs), ventral au neurones moteurs de la division compact du noyau ambigu (Smith et al., 1991; Rekling and Feldman, 1998). A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur exclusif de l'ensemble des neurones du preBötC. Toutefois des populations neuronales, parfois chevauchantes, peuvent être caractérisées sur la base de l'expression de récepteurs à différents neuromodulateurs respiratoires. Les outils pharmacologiques puis la génétique moderne ont permis de disséquer plus précisément leur rôle fonctionnel.

1.2.1 - Les neurones exprimant le récepteur NK1R à la substance P

La région anatomique du preBötC est anatomiquement caractérisée par l'expression du récepteur NK1R à la substance P (SubP), alors que les structures immédiatement adjacentes (rVRG, BötC) en sont dépourvues, à l'exception des motoneurones du noyau ambigu (Nakaya et al., 1994; Wang et al., 2001). Le marquage contre l'acétylcholine transférase (Choline Acetyl Transferase, ChAT), un marqueur exclusif des motoneurones, permet toutefois de distinguer le preBötC de ces derniers. En outre, l'activation des neurones NK1R⁺ par application exogène de SubP directement sur le preBötC entraîne une augmentation de la fréquence des décharges rythmique (Gray et al., 2001). Ces observations suggèrent que cette population cellulaire est directement impliquée dans le contrôle de la rythmogenèse. D'un point de vue fonctionnel, on retrouve au sein de la population de neurones NK1R⁺ l'essentiel des types neuronaux requis pour l'élaboration d'une commande respiratoire normale (Connelly et al., 1992 ; Guyenet and Wang, 2001 ; Hayes and Del Negro, 2007). En particulier, on notera l'abondance de neurones dont l'activité est en phase (neurones inspiratoires) ou précède légèrement (neurones pré-inspiratoires) la décharge inspiratoire. Par ailleurs, les neurones NK1R⁺ sont majoritairement glutamatergiques (Stornetta et al., 2003) comme l'illustre la co-expression du transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2) qui conditionne, dans l'ensemble du tronc cérébral, le remplissage en glutamate des vésicules pré-synaptiques. Nous verrons plus loin que le caractère pre-inspiratoire et glutamatergique de ces neurones en font des candidats privilégiés pour expliquer, à l'échelle cellulaire, la rythmogenèse

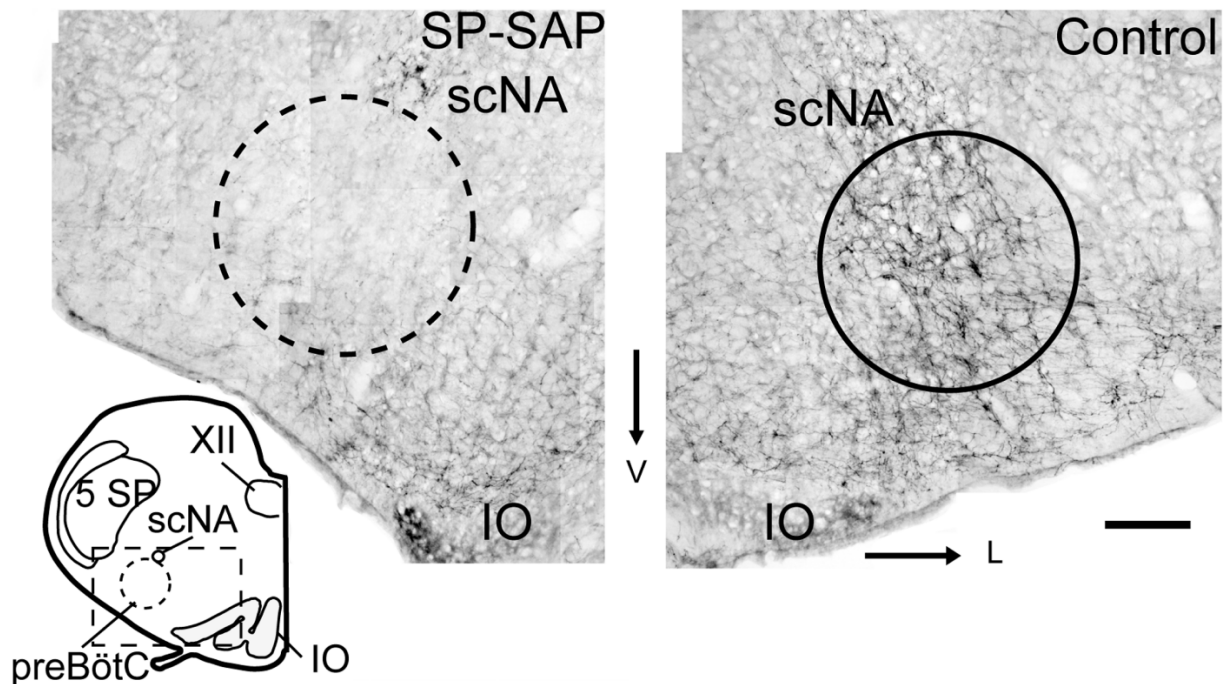
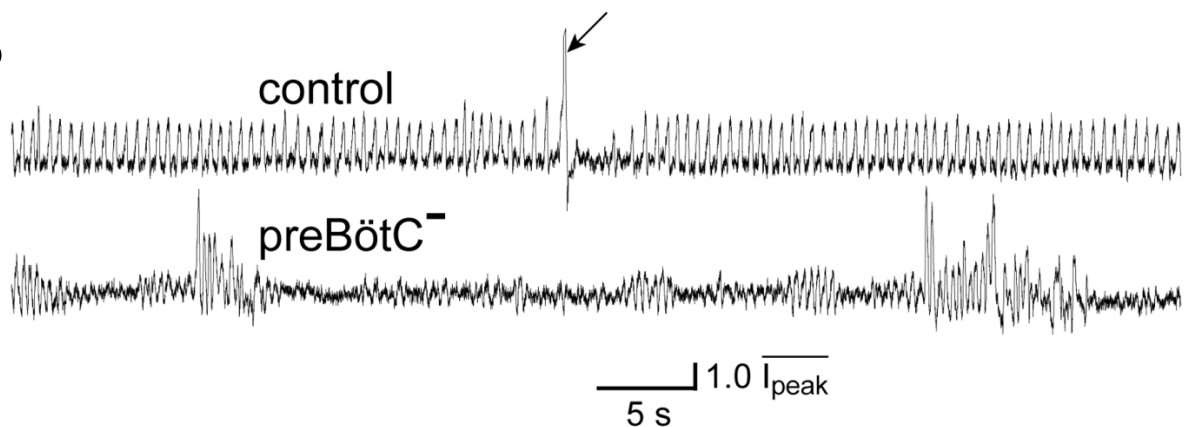
A**B**

Figure 6 : la rythmogenèse respiratoire requiert les neurones NK1R-positifs du preBötC chez le rat.

Les auteurs ont injecté localement au sein du preBötC chez des rats adultes un conjugué (SP-SAP) alliant Substance-P, ligand des récepteurs NK1R, et Saporine, une protéine qui conduit à la mort cellulaire par inactivation enzymatique des ribosomes. Les conséquences sur les neurones NK1R-positifs (A) et le comportement ventilatoire (B) ont été recherchées 10 à 18 (A) et 4 à 5 (B) jours après l'injection.

(A). L'injection locale de SP-SAP permet l'ablation sélective et quasi-complète des neurones du preBötC exprimant les récepteurs NK1R. La présence (rats contrôle, à droite) ou l'absence (rats injectés, SP-SAP, à gauche) de ces derniers est détectée par immunohistochimie sur des sections transversales effectuées au niveau du preBötC. scNA : division semi-compacte du noyau ambigu ; IO : olive inférieure ; 5SP : noyau trigéminal ; XII : noyau moteur de l'hypoglosse. Barre d'échelle : 200 μ m.

(B). Respiration spontanée de rats adultes éveillés, enregistrée par pléthysmographie. Après injection bilatérale de SP-SAP et lésion de l'essentiel des neurones NK1R-positifs (voir ci-dessus), les animaux (preBötC⁻, trace du bas) présentent une respiration ataxique, comparée à celle des contrôles (traces du haut). Les déflexions vers le haut représentent l'inspiration.

D'après Gray et al., 2001.

respiratoire (Rekling et al., 1996). Il faut toutefois noter que tous les neurones inspiratoires ne co-expriment pas NK1R au sein du preBötC (Guyenet and Wang, 2001; Hayes and Del Negro, 2007). Ce marqueur n'identifierait ainsi qu'un contingent limité d'environ 300 neurones par preBötC.

Des expériences d'ablation ou de lésion chimique témoignent du rôle vital joué par les neurones NK1R⁺ dans la rythmogenèse respiratoire, en dépit de leur faible effectif. Par exemple, l'élimination bilatérale de l'essentiel (>80%) des neurones NK1R⁺ du preBötC chez le rat *in vivo* suffit à entraîner une activité respiratoire hautement irrégulière, une altération des gaz sanguins et des réponses pathologiques à des stimulations hyperoxiques et hypoxiques (Gray et al., 2001; McKay et al., 2005; Figure 6). De manière intéressante, une région du bulbe ventral exprimant les récepteurs NK1R et assimilable au preBötC a été décrite chez d'autres mammifères dont la chèvre (Wenninger et al., 2004a; Wenninger et al., 2004b; Krause et al., 2009) et l'homme (Lavezzi and Maturri, 2008).

En résumé, le fort impact fonctionnel de la modulation par la SubP, les propriétés cellulaires particulières des neurones NK1R⁺ et les conséquences fonctionnelles dramatiques résultantes de leur absence suggèrent que ce contingent cellulaire joue un rôle essentiel dans la genèse de l'activité rythmique au sein du preBötC. Ainsi NK1R est de nos jours le marqueur anatomique le plus abondamment utilisé pour définir anatomiquement la région du preBötC.

1.2.2 - Les neurones exprimant le neuropeptide somatostatine

Des travaux plus récents ont révélé au sein de l'oscillateur un contingent de neurones glutamatergiques caractérisés par l'expression du neuropeptide somatostatine (Sst). Ils représenteraient un sous-type des neurones NK1R⁺ (Stornetta et al., 2003b). A ma connaissance, aucune caractérisation électrophysiologique des neurones Sst⁺ n'est encore disponible. En revanche, des travaux récents ont adressé leur rôle fonctionnel par un procédé élégant d'inactivation moléculaire (Tan et al., 2008). Les auteurs ont injecté dans le preBötC de rats adultes un vecteur destiné à induire, sous le contrôle du promoteur à la somatostatine, l'expression d'un canal potassique, le récepteur à l'allatostatine (AlstR). La fixation du ligand allatostatine entraîne l'ouverture du canal et l'hyperpolarisation, donc la mise en silence, des neurones transfectés (Tan et al., 2006). Chez les souris injectées, l'administration d'allatostatine a pour conséquence de stopper toute activité respiratoire (Figure 7). L'ensemble de ces observations suggère un rôle clé des neurones Sst⁺ pour l'activité de l'oscillateur.

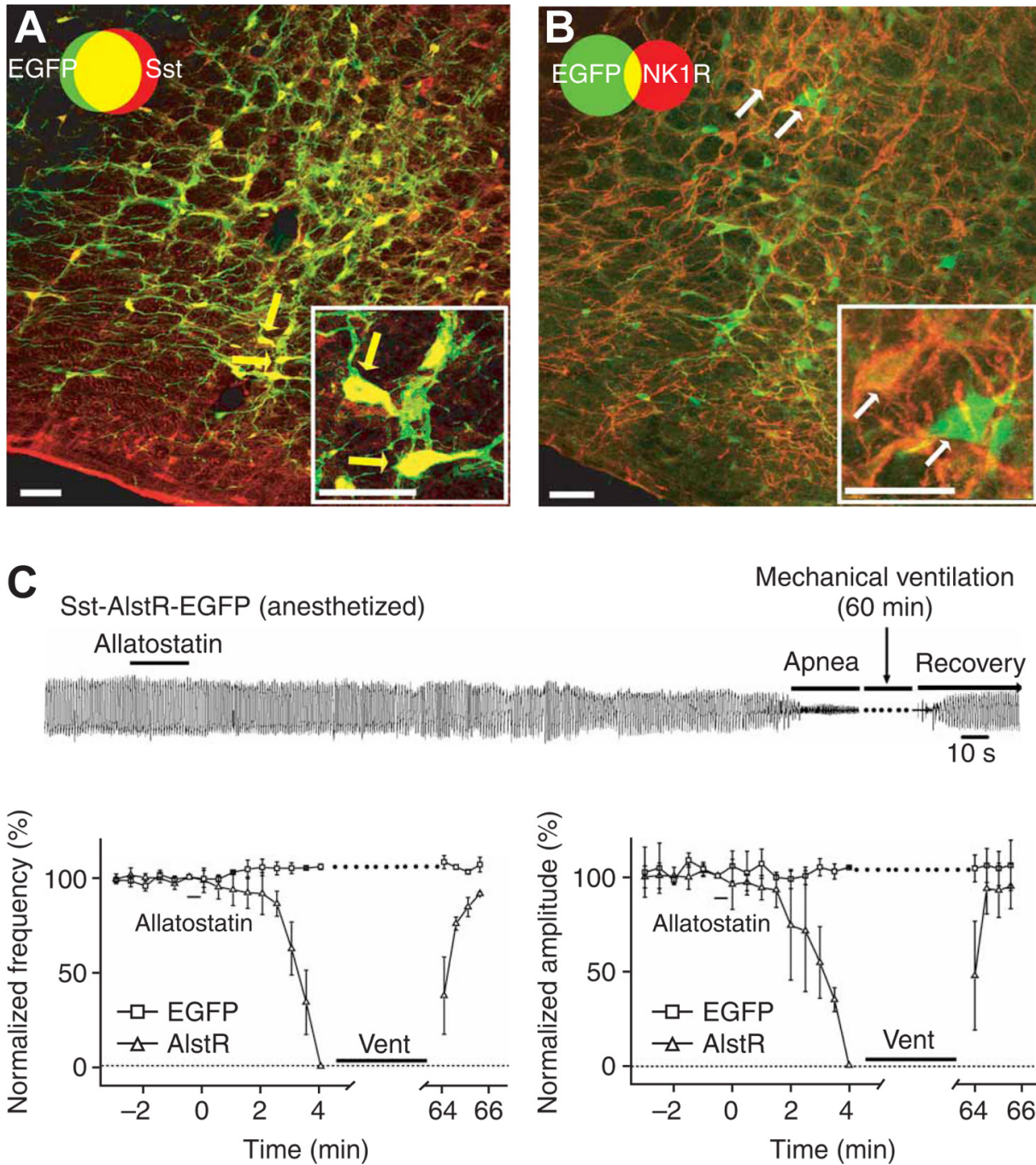


Figure 7 : les neurones Sst⁺ définissent un sous-groupe vital des neurones NK1R⁺ du preBötC.

Un vecteur permettant l'expression conjointe de la protéine fluorescente verte (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) et du récepteur à l'allatostatine (AlstR) sous le contrôle du promoteur de la somatostatine (Sst) est injecté dans le preBötC de rats adultes.

(A). L'expression de l'EGFP (vert) reproduit fidèlement l'expression de Sst révélée par immunohistochimie (rouge).

(B). Certains neurones EGFP⁺ (en vert), donc exprimant Sst, représentent un sous-groupe de neurones NK1R⁺ (rouge).

(C). L'administration d'allatostatine (courbe \triangle) sur des animaux anesthésiés induit une diminution progressive de la fréquence (en bas à gauche) et de l'amplitude (à droite) respiratoire jusqu'à l'apnée complète nécessitant une ventilation artificielle (Vent).

D'après Tan et al., 2008.

1.2.3 - Les récepteurs aux opioïdes

L'expression du récepteur μ aux opioïdes (μ OR) est également relativement spécifique au preBötC. L'essentiel des neurones μ OR⁺ co-expriment NK1R et présentent une signature électrophysiologique caractéristique de neurones pré-inspiratoires (Gray et al., 1999). Le puissant effet inhibiteur sur la respiration connu des opioïdes impliquerait ainsi une action directe sur les neurones à l'origine même de la rythmogenèse. Il n'existe à ma connaissance aucune étude ayant étudié les conséquences fonctionnelles de l'ablation sélective des neurones μ OR⁺.

1.2.4 - Les autres marqueurs anatomiques de l'oscillateur

Parmi les autres marqueurs histologiques connus de l'oscillateur, on retiendra notamment TrkB, les récepteurs à la neurotrophine Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). L'expression de TrkB est détectée dès les stades post-nataux dans la région anatomique du preBötC, comme l'illustre le chevauchement avec le territoire d'expression de NK1R (Thoby-Brisson et al., 2003). L'application exogène de BDNF exogène sur des tranches de preBötC de souris nouveau-né induit une diminution de la fréquence des décharges rythmiques, suggérant que ces récepteurs sont fonctionnels et impliqués dans la genèse du rythme. Outre son rôle neurotrophe pendant le développement embryonnaire, cette neuropeptide exercerait ainsi un rôle neuromodulateur sur l'activité rythmique de l'oscillateur. La source endogène de BDNF reste inconnue mais pourrait impliquer les neurones de l'oscillateur lui-même (Thoby-Brisson et al., 2003).

Enfin, des récepteurs fonctionnels à d'autres molécules, de moindre importance dans le contexte de cette thèse, ont été détectés au sein de l'oscillateur et participeraient à la modulation de l'activité rythmique : les récepteurs à l'ATP et à ses métabolites (Huxtable et al., 2009), à la TRH (Rekling et al., 1996b), et à la sérotonine (Manzke et al., 2008).

1.3 - Connectivité

1.3.1 - Connectivité vers les groupes pré-moteurs et moteurs

Le preBötC contient essentiellement des neurones respiratoires propriobulbaires, ou interneurons, déployant des projections axonales au sein du bulbe lui-même (Dobbins and Feldman, 1994). L'oscillateur est localisé à proximité immédiate et contacte directement des neurones prémoteurs respiratoires notamment ceux, immédiatement caudal du VRG, chargés de relayer l'activité rythmique vers les motoneurons du nerf phrénique. Une étude récente montre par ailleurs l'existence de neurones prémoteurs respiratoires en position dorso-médiale

du noyau ambigu, contactés par les axones de certains neurones du preBötC (Koizumi et al., 2008). Ils transmettent à leur tour l'activité rythmique de manière ipsilatérale vers les neurones moteurs de l'hypoglosse. Cette connectivité peut d'ailleurs être préservée dans une tranche transversale épaisse (~600 μm) de tronc cérébral contenant à la fois le preBötC et le noyau moteur de l'hypoglosse, dont l'activité rythmique peut alors être enregistrée comme témoin de l'activité de l'oscillateur (voir Figure 6B). Enfin, une étude très récente a fait appel à la lignée génétiquement modifiée présentée Figure 7 pour caractériser les sites de projections des neurones Sst^+ du preBötC chez le rat adulte (Tan et al., 2009, Figure 8). Les auteurs concluent que ces cellules envoient des projections axonales vers 1) le preBötC contralatéral (voir ci-dessous), 2) les complexe Bötzinger contra et ipsilatéraux, 3) le VRG immédiatement caudal, 4) le pFRG/RTN, 5) la région entourant les neurones moteurs de l'hypoglosse et le NTS, 6) le groupe respiratoire pontique constitué des noyaux parabrachial et Kölliker-Fuse et 7) la matière grise péri-aqueducale. Ainsi, les neurones du preBötC, et notamment ceux soupçonnés de constituer le cœur rythmogène, projettent vers l'ensemble des groupes neuronaux bulbaires et pontiques impliqués dans le contrôle respiratoire.

1.3.2 - Connectivité commissurale

Les activités rythmiques au niveau des sorties motrices respiratoires sont synchronisées bilatéralement aussi bien chez l'animal intact que dans les préparations de tronc cérébral isolé. Pour autant, chaque « moitié » du tronc cérébral est capable de générer une activité rythmique respiratoire indépendante (Peever et al., 1998). Ces observations sont retrouvées au niveau de l'oscillateur : dans une tranche transversale intacte, les activités des preBötC localisés de part et d'autre de la ligne médiane sont synchronisées. Il existe donc des commissures préservées dans le plan transverse de la tranche qui assurent cette synchronisation. En revanche, après section de la ligne médiane (hémi-tranche), la synchronisation bilatérale est perdue et chaque preBötC maintient une activité rythmique spontanée indépendante (Thoby-Brisson et al., 2005; Tarras-Wahlberg and Rekling, 2009). Ainsi, la synchronisation bilatérale de la commande respiratoire serait acquise, au même titre que la rythmogénèse, au niveau de l'oscillateur. De nombreuses études ont confirmé l'existence de neurones au sein du preBötC possédant un axone qui traverse la ligne médiane (Koshiya and Smith, 1999; Wang et al., 2001; Stornetta et al., 2003b; Koizumi et al., 2008; Tan et al., 2009). Les neurones Sst^+ , essentiels à la genèse d'une activité rythmique, sont eux-mêmes commissuraux (Figure 8, Tan et al., 2009). En outre, la connectivité commissurale en aval de l'oscillateur participerait à un renforcement de cette synchronisation. Par exemple, les neurones moteurs de l'hypoglosse reçoivent les activités

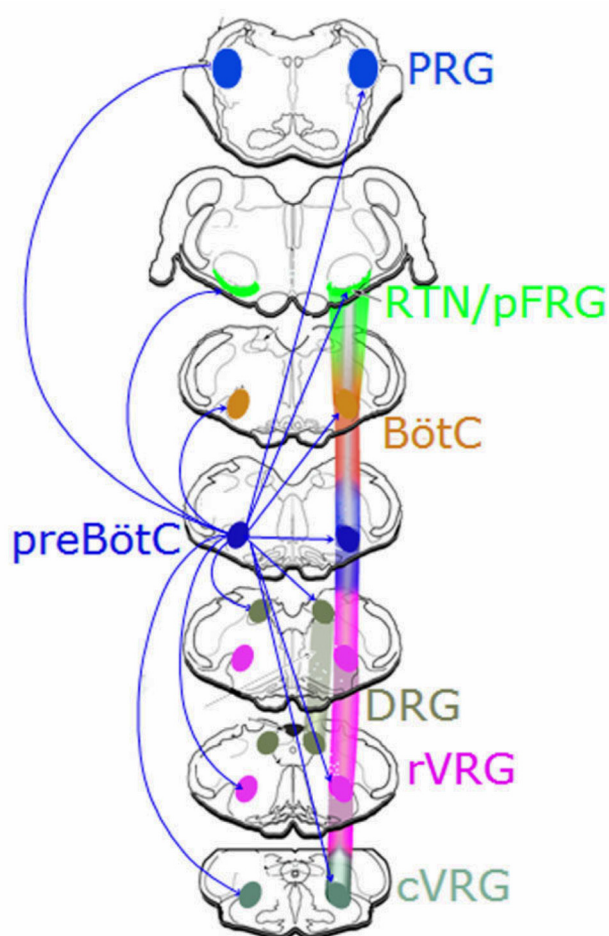


Figure 8 : représentation schématique des projections du preBötC au sein du tronc cérébral. Les sites de projections ont été déterminés par injection d'un vecteur gouvernant l'expression de la protéine fluorescence verte (EGFP) sous le contrôle du promoteur de la Sst, comme décrit dans le texte et à la figure 7. La présence de terminaux Sst-positifs au sein des groupes respiratoires du tronc cérébral a été identifiée par un marquage immunohistochimique dirigé contre la protéine EGFP. Les neurones du preBötC envoient des projections vers : le preBötC contralatéral, les complexes Bötzinger ipsi- et contra-latéraux (BötC), le groupe respiratoire ventral rostral (rVRG), le groupe respiratoire pontique (PRG), le groupe para-facial/retrotrapézoïde (pFRG/RTN). Adapté de Tan et al., 2009.

rythmiques provenant à la fois du preBötC ipsilatéral et de son homologue contralatéral (Tarras-Wahlberg and Rekling, 2009). Il en va de même pour les neurones moteurs du nerf phrénique, qui sont contactés par les neurones pré-moteurs du VRG via des connexions ipsi- et contralatérales (Tian and Duffin, 1996, 1997; Tan et al., 2009).

1.4 - Mécanismes de la rythmogenèse

1.4.1 - Le rôle essentiel de la transmission glutamatergique

De nombreuses études convergent vers un rôle crucial du neurotransmetteur exciteur glutamate dans la rythmogenèse respiratoire au sein du preBötC. D'une part, l'activité de l'oscillateur est préservée après blocage pharmacologique des connexions inhibitrices dépendantes du chlore mais disparaît après application de bloquants de la signalisation par les récepteurs AMPA/Kainate au glutamate (Feldman and Smith, 1989; Onimaru et al., 1989, 1990; Funk et al., 1993). Par ailleurs, des enregistrements électrophysiologiques des neurones du preBötC révèlent que les bouffées inspiratoires sont sous-tendues par un bombardement synaptique exciteur dépendant de l'activation des récepteurs AMPA/Kainate au glutamate (Smith et al., 1991; Ireland et al., 2008). D'autre part, l'essentiel des neurones proposés comme essentiels à la rythmogenèse, tels que ceux exprimant NK1R ou Sst sont glutamatergiques

(Guyenet et al., 2002a; Stornetta et al., 2003b). Des afférences glutamatergiques faisant synapse sur les neurones du preBötC ont également été décrites par microscopie électronique (Liu et al., 2003a). Enfin, les animaux chez qui la libération de glutamate est génétiquement invalidée (mutants *Vglut2*) présentent une absence d'activité rythmique au sein de l'oscillateur et meurent à la naissance de défaut respiratoire (Wallen-Mackenzie et al., 2006). La neurotransmission glutamatergique rapide, médiée par les récepteurs AMPA/Kainate est donc un élément essentiel à la rythmogenèse au sein du preBötC. Le glutamate est également le principal neurotransmetteur impliqué dans la transmission de l'activité rythmique vers les groupes pré-moteurs et moteurs du tronc cérébral.

1.4.2 - Le modèle *pacemaker*

La persistance de l'activité rythmique après blocage pharmacologique des connexions inhibitrices médiées par le chlore (Feldman and Smith, 1989; Onimaru et al., 1989) suggérait que les mécanismes conventionnels d'inhibition réciproque entre groupes de neurones ne peuvent être la base cellulaire de la rythmogenèse respiratoire. En outre, après blocage ou invalidation génétique de la transmission glutamatergique, certains neurones au sein du preBötC maintiennent un profil de décharge rythmique dépendant du voltage membranaire (Figure 9). Sur ces observations notamment, il a été alors proposé que la rythmogenèse respiratoire repose sur l'activité de neurones, possédant des propriétés dites *pacemaker* (neurones *bursters*) : leur potentiel de membrane peut présenter des oscillations autonomes

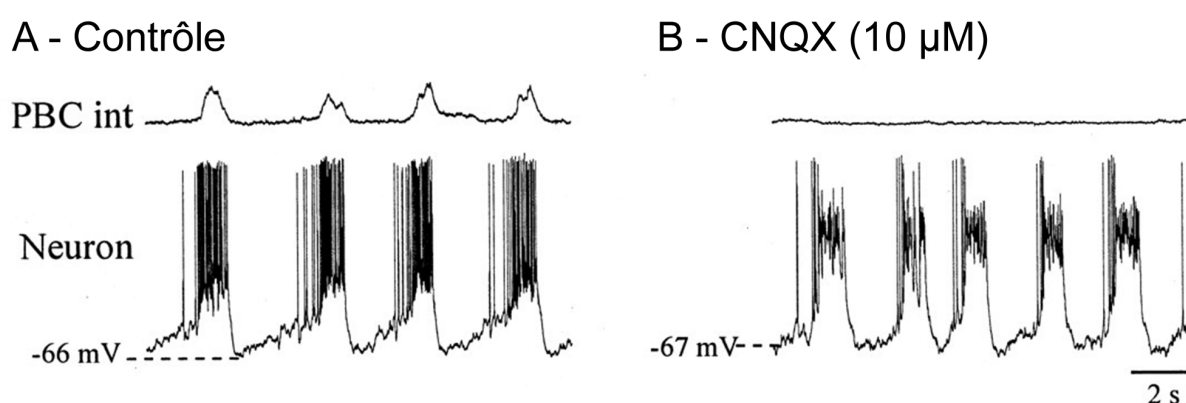


Figure 9 : le preBötC renferme des neurones à propriétés *pacemaker*, ou *bursters*.

Enregistrements simultanés sur une tranche transversale de l'activité de la population neuronale du preBötC (signal intégré, traces du haut, PBC Int.) et d'un neurone respiratoire (neurone, traces du bas) avant (A) et après (B) application de CNQX dans le milieu de perfusion.

(A). En situation contrôle, le neurone émet des trains de potentiels d'action en phase avec l'activité globale de l'oscillateur.

(B). Le blocage de la neurotransmission glutamatergique par application de CNQX bloque l'activité de l'oscillateur (trace plate en haut). Le neurone possède des propriétés *pacemaker* comme l'illustre le maintien d'une activité rythmique semblable à celle présente avant le traitement pharmacologique.

-66 mV et -67 mV indiquent le potentiel de repos du neurone.

D'après Thoby-Brisson et al., 2001.

résultantes d'activations/inactivations cycliques de conductances membranaires dépendantes du voltage. Une rythmogenèse dépendante de neurones bursters est d'ailleurs caractérisée au sein de diverses structures cérébrales (Bal et al., 1995; McCormick and Bal, 1997) et de certains CPGs. Cela semble clairement le cas de celui qui gouverne les contractions stomato-gastriques chez le crustacé (Stomatogastric ganglion, STG) qui repose sur une circuiterie réduite de 11 neurones, dont 5 neurones bursters (Selverston and Miller, 1980; Miller and Selverston, 1982). Une rythmicité dépendante de neurones bursters a également été proposée au sein du CPG locomoteur, du moins chez la lamproie (Wallen and Grillner, 1987, voir aussi Tresch and Kiehn, 2000 chez les mammifères). De très nombreuses études ont été réalisées pour tenter de caractériser les différentes populations de neurones bursters au sein du preBötC et de décrire leur contribution à la rythmogenèse respiratoire.

La présence de neurones bursters au sein du preBötC isolé *in vitro* est détectée par leur capacité à émettre des bouffées de potentiels d'action « ectopiques » (en dehors des décharges inspiratoires) et des décharges rythmiques même en l'absence de toute transmission synaptique, notamment excitatrice (Figure 9, Smith et al., 1991; Johnson et al., 1994; Reikling and Feldman, 1998; Koshiya and Smith, 1999). Le recrutement de conductances intrinsèques dépendantes du voltage se reflète i) par la nécessité d'appliquer expérimentalement une dépolarisation sur le neurone isolé pour évoquer un éventuel comportement pacemaker et ii) par l'accélération de la fréquence des décharges lorsque l'expérimentateur augmente leur potentiel de membrane. En conséquence, l'activation de ces conductances au sein du réseau intact implique l'existence d'entrées excitatrices toniques. Des interconnexions excitatrices locales sont par ailleurs nécessaires à la synchronisation du rythme, et des modèles ont été proposés pour expliquer l'influence d'un tel couplage sur la genèse d'une activité globale synchrone (Butera et al., 1999). L'activité des neurones bursters se transmettrait également à des populations de neurones inspiratoires non-bursters, dit « suiveurs » (ou « followers ») qui participent à l'amplification de l'activité. Cependant, l'origine des excitations toniques et la connectivité entre les différentes populations cellulaires au sein de l'oscillateur restent largement inconnues, notamment en raison de l'absence de marqueurs histologiques spécifiques.

L'identification électrophysiologique de conductances membranaires conférant à certains neurones leurs propriétés pacemaker offre des outils pharmacologiques permettant d'étudier plus précisément leur contribution à la rythmogenèse. Dans de nombreuses régions du système nerveux telles que l'hippocampe ou l'aire tegmentale ventrale, la rythmogenèse

intrinsèque repose sur une conductance cationique activée par l'hyperpolarisation qui induit un courant entrant dépolarisant, connue sous le nom de I_h (Pape and McCormick, 1989; Liu et al., 2003b; Schweitzer et al., 2003). Cependant, même si I_h est exprimé par certains neurones du preBötC, et préférentiellement par ceux dotés de propriétés pacemaker, il n'en est pas une signature spécifique. Par ailleurs, I_h n'est pas requis pour la genèse d'une activité rythmique par les neurones isolés et par l'oscillateur *in vitro* (Thoby-Brisson and Ramirez, 2000). Une étude ultérieure a conduit à l'identification de deux classes de neurones bursters au sein du preBötC (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001) : ceux (5-15%) qui dépendent d'une conductance membranaire sodique voltage-dépendante, le courant sodique persistant (I_{NaP}) et ceux (7-10%) qui requièrent des courants calciques (I_{Ca}) et des courants cationiques non-spécifiques indépendants du voltage activés par le calcium (I_{CAN}) (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001; Del Negro et al., 2002b; Del Negro et al., 2005). De manière intéressante, l'activité rythmique du preBötC est préservée après blocage pharmacologique de l'un ou l'autre de ces types de neurones bursters (Del Negro et al., 2002a). Lorsque les deux types de conductances sont inactivés, un arrêt du rythme est observé, mais une augmentation de l'excitabilité neuronale restaure l'activité (Del Negro et al., 2005).

Les données recueillies à ce jour suggèrent donc que la rythmogenèse basale au sein de l'oscillateur respiratoire du preBötC ne repose pas sur l'activité des neurones dotés de propriétés pacemaker. Ces neurones pourraient cependant participer à la rythmogenèse en favorisant l'excitabilité neuronale.

1.4.3 - La rythmogenèse, une propriété émergente du réseau ?

Le modèle alternatif au modèle pacemaker considère que la rythmogenèse est une propriété émergente du réseau, c'est-à-dire qui repose sur les interactions entre les neurones constitutifs. Des couplages chimiques et/ou électroniques excitateurs récurrents assurent une amplification positive (feedback positif) des activités entre neurones possédant des propriétés similaires, et conduisent à la genèse de décharges rythmiques à l'échelle du réseau sans invoquer de propriétés pacemaker. L'ensemble neuronal se comporte donc comme un « group-pacemaker » du rythme respiratoire (Figure 10, Rekling and Feldman, 1998; Del Negro et al., 2002a). Ce modèle implique que certains neurones présentent un potentiel de repos au-dessus du seuil de déclenchement des potentiels d'action et sont donc spontanément actifs. Ils activent des neurones voisins silencieux, lesquels recrutent à leur tour des neurones additionnels et ré-excitent par ailleurs les neurones déjà activés. Parallèlement à ces excitations récurrentes, le recrutement de certaines conductances intrinsèques participe à la fois à l'amplification positive

en modulant l'excitabilité cellulaire et à la terminaison de l'inspiration en hyperpolarisant le neurone.

Ce modèle est notamment sous-tendu par l'identification de neurones inspiratoires au sein du preBötC qui reçoivent des courants synaptiques excitateurs avant (~400 ms) l'initiation de la décharge inspiratoire (Rekling et al., 1996a). Ces cellules, dénommés neurones de type-1, présentent en outre une hyperpolarisation prolongée de leur potentiel de membrane, sous-

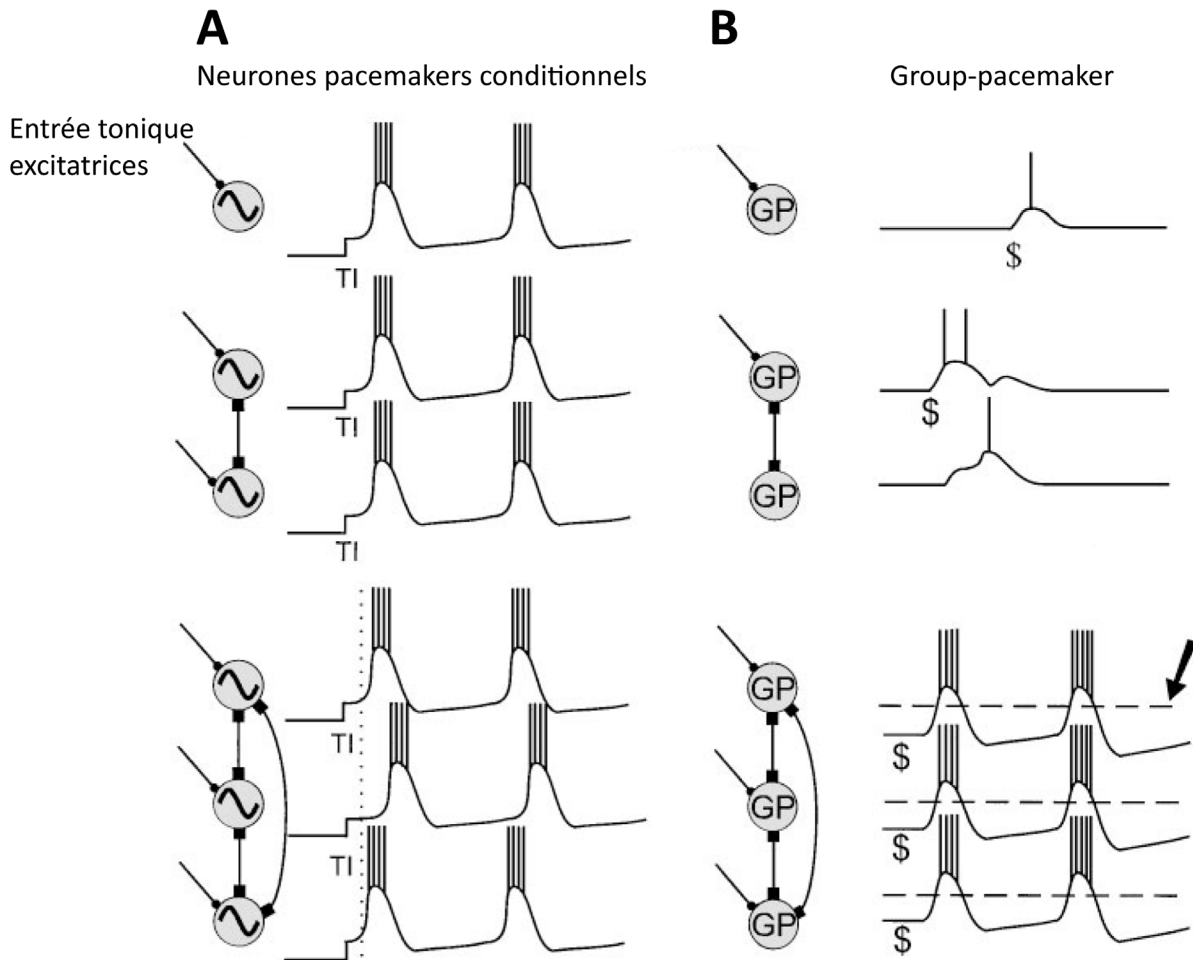


Figure 10 : les deux modèles de rythmogenèse au sein du preBötC.

(A). Modèle pacemaker. En haut : quand isolé du reste du réseau, un neurone pacemaker est capable d'émettre spontanément des décharges de potentiels d'action. Une excitation tonique (TI) est vraisemblablement nécessaire pour dépolariser le neurone à un seuil de déclenchement de la décharge. Deux traces du milieu : deux neurones pacemaker couplés synchronisent leurs activités via des connexions excitatrices réciproques. Trois traces du bas : plusieurs neurones pacemaker couplés synchronisent leurs activités, bien qu'il puisse exister une dispersion temporelle de l'initiation et de la terminaison des décharges en raison de variabilités dans l'intensité des entrées excitatrices toniques.

(B). Modèle de propriété émergente du réseau ou "groupe-pacemaker". Les neurones individuels (trace du haut) ne sont pas capables d'émettre des décharges de potentiels d'action, même en réponse à des stimulations synaptiques ou des injections de courant intracellulaires (\$). Deux neurones couplés par des excitations réciproques (traces du milieu) s'excitent mutuellement mais les dépolarisations associées sont de trop faible amplitude pour initier une décharge. La stimulation de plusieurs neurones couplés (traces du bas) entraîne la genèse auto-entretenu de décharges, en réponse à l'activation de conductances intrinsèques dépolarisantes et hyperpolarisantes.

D'après Rekling and Feldman, 1998.

tendue par l'activation de conductances intrinsèques, pendant toute la phase expiratoire. En somme, ces neurones oscillent entre décharges inspiratoires, initiées par l'accumulation d'entrées synaptiques excitatrice avant l'inspiration, et hyperpolarisations gouvernées par l'activation de propriétés intrinsèques. De manière intéressante, l'essentiel de ces neurones expriment NK1R et μ OR (Gray et al., 2001), suggérant qu'ils sont requis pour la rythmogenèse. L'ensemble de ces propriétés font de ces neurones respiratoires de type-1 des candidats privilégiés au modèle group-pacemaker (Rekling et al., 1996b; Rekling and Feldman, 1998). Des boucles d'excitations récurrentes initient la décharge inspiratoire et l'activation de conductances intrinsèques participe à la fois à l'amplification de l'activité, à la terminaison de l'inspiration, et au maintien d'un état hyperpolarisé (période réfractaire). Ces neurones vont progressivement se repolariser et les plus excitables vont commencer à décharger, amplifiant la dépolarisation des neurones voisins. Ainsi s'initie une nouvelle décharge inspiratoire. Selon ce modèle, la fréquence respiratoire dépend du temps nécessaire pour atteindre le seuil de déclenchement de la décharge inspiratoire. Elle est alors directement dépendante de l'état d'excitabilité des neurones. Une hyperpolarisation du potentiel de membrane engendrera un ralentissement de la fréquence de décharge alors qu'une dépolarisation résultera en l'effet inverse. De telles variations du potentiel de membrane peuvent résulter de modifications de la balance des entrées toniques excitatrices et inhibitrices, ainsi que de l'activation de certaines conductances intrinsèques.

Ce modèle d'une décharge inspiratoire initiée par des connexions excitatrices récurrentes n'est ainsi pas incompatible avec les données pharmacologiques qui attribuent à certaines conductances intrinsèques un rôle dans la rythmogenèse. La neurotransmission glutamatergique joue ici un rôle essentiel en assurant les connexions excitatrices récurrentes. Les courants I_{NaP} et I_{CAN} participeraient à l'amplification des excitations récurrentes, favorisant ainsi l'excitabilité neuronale. En outre, les conductances I_{Ca2G} , K_c ou dépendante des pompes électrogéniques seraient activées pendant l'inspiration et participeraient à la terminaison de la décharge en repolarisant le neurone.

1.5 - Autres acteurs participants à la rythmogenèse

Nous avons vu que la rythmogenèse repose vraisemblablement sur des neurones possédant des propriétés intrinsèques particulières, et interconnectés par une signalisation excitatrice médiée par le glutamate. Nous allons maintenant évoquer d'autres mécanismes qui, sans être requis pour la rythmogenèse basale, participent à l'élaboration d'une commande respiratoire normale. Nous verrons notamment que les mécanismes qui sous-tendent l'action

des deux principaux neuromodulateurs respiratoires, la Substance P et les enképhalines, convergent vers les neurones inspiratoires de type-1, et renforcent ainsi l'hypothèse du rôle crucial de ces derniers dans la genèse de l'activité rythmique selon le modèle du group-*pacemaker*. Dans le même ordre d'idée, l'étude des mécanismes d'adaptation à des conditions extrêmes, notamment l'hypoxie, apporte de précieuses indications sur le rôle de certaines conductances membranaires dans la rythmogenèse. Nous évoquerons enfin le rôle des interneurons inhibiteurs et des cellules gliales.

1.5.1 - Les neuromodulateurs

1.5.1.1 - La Substance P

Un rôle excitateur du ligand endogène des récepteurs NK1R, la SubP, sur l'activité respiratoire était connu de longue date (Von Euler and Pernow, 1956) mais un effet directement imputable au preBötC fut démontré bien plus récemment (Chen et al., 1990a,b; Gray et al., 1999). Des micro-injections de SubP directement sur le preBötC isolé en tranche transversale induisent une augmentation significative de la fréquence des décharges rythmiques. A l'échelle cellulaire, l'application de SubP exogène *in vitro* entraîne une dépolarisation lente du potentiel membranaire de certains neurones inspiratoires du preBötC, qu'ils soient *pacemakers* ou non-*pacemakers* (Pena and Ramirez, 2004). Cette réponse est préservée après blocage de toute transmission synaptique. L'action excitatrice du neuropeptide sur l'activité de l'oscillateur serait donc sous-tendue par une modulation des propriétés intrinsèques et de l'excitabilité des cellules exprimant son récepteur. En outre, les auteurs proposent que la dépolarisation des neurones en réponse à la SubP repose sur l'activation de courants cationiques, et principalement sodiques, insensibles à la TTX. L'origine des structures cérébrales à l'origine de la libération endogène de SubP dans la région du preBötC est à ma connaissance peu documentée. Des terminaisons synaptiques susceptibles de libérer la SubP ont bien été détectées sur les neurones NK1R⁺ (Liu et al., 2004). Elles pourraient provenir du raphé caudal et de la région parapyramidale (Holtman and Speck, 1994), voire des corps carotidiens (Leibstein et al., 1985 ; Finley and Katz, 1992). Enfin, en dépit d'exercer un puissant rôle modulateur, la signalisation dépendante des récepteurs NK1R n'est pas indispensable à la rythmogenèse proprement dite : la délétion génétique du récepteur n'entraîne pas de perturbations de la genèse basale de l'activité rythmique (Ptak et al., 2000, 2002).

1.5.1.2 - Les enképhalines

L'effet inhibiteur bien connu des agonistes opiacés sur l'activité respiratoire mérite d'être évoqué ici en raison de son implication potentielle dans certaines situations physiopathologiques. Par exemple, une prise abusive d'héroïne ou de la morphine peut entraîner la mort par arrêt respiratoire. Une concentration anormalement élevée d'endorphines a par ailleurs été retrouvée dans le tronc cérébral de nouveau-nés humains décédés de défauts respiratoires du type mort-subite du nourrisson. De même, des nouveau-nés prématurés souffrant d'apnées et d'hypoventilations présentent des taux anormalement élevés d'endorphines dans le liquide céphalo-rachidien. Ces phénotypes peuvent être allégés par l'administration de naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes.

Les études *in vitro* ont démontré que le preBötC était directement sensible aux agonistes opiacés, notamment à ceux présentant une forte spécificité pour les récepteurs opioïdes de la famille μ (μ OR) (Gray et al., 1999). L'expression de ces récepteurs est d'ailleurs détectée sur les neurones de type-1, une sous-population de neurones NK1R⁺ du preBötC. A l'échelle cellulaire, l'activation des μ OR entraîne une hyperpolarisation du potentiel membranaire indépendante des entrées synaptiques, résultant vraisemblablement de l'ouverture de canaux potassiques (Gray et al., 1999). Ainsi, comme nous l'avons vu plus haut, les neurones de type-1 sont dépolarisés par la SubP et hyperpolarisés par le DAMGO. Ces deux neuropeptides exercent ainsi des effets opposés tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle du réseau neuronal. De telles relations entre modulation du potentiel membranaire et de changement d'activité du réseau sont cohérentes avec le modèle du group-pacemaker et un rôle central des neurones inspiratoires de type-1 NK1R⁺/ μ OR⁺ dans la genèse de l'activité rythmique et dans le contrôle de la fréquence des décharges. Enfin, des terminaisons susceptibles de libérer des enképhalines faisant synapse sur les neurones NK1R⁺ du preBötC ont été observées (Liu et al., 2004). Elles pourraient provenir des neurones enképhalinerigiques du noyau du tractus solitaire ou des régions ventrolatérales du bulbe rostral (Guyenet et al., 2002b; Stornetta et al., 2003a). De manière intéressante, les enképhalines sont majoritairement contenues au sein de boutons synaptiques glutamatergiques et/ou à SubP (Liu et al., 2004). Comme c'est le cas dans la régulation de la douleur, il est ainsi possible que l'effet des enképhalines sur l'activité respiratoire repose également sur une modulation pré-synaptique de la transmission excitatrice impliquant le glutamate et la SubP.

1.5.1.3 - Les neurotrophines

Les neurotrophines (NTs) sont des peptides diffusibles qui jouent un rôle important

dans la survie, la croissance, la différenciation et le maintien de la fonction des neurones au niveau central et périphérique (voir pour revue Lewin and Barde, 1996; Bibel and Barde, 2000). Ces actions neurotrophes impliquent des effets à long terme (quelques heures à plusieurs jours). La famille des NTs comprend notamment les neurotrophines NT3, NT4, le Nerve Growth Factor (NGF), le Glial-Derived Growth Factor (GDNF) et le Brain-Derived Growth Factor (BDNF). Deux principales familles de récepteurs sont impliquées dans la transduction des effets cellulaires des NTs : le récepteur p75 pan-neurotrophine, à faible affinité, et les récepteurs Trk, à haute affinité et présentant une activité tyrosine-kinase intrinsèque (Patapoutian and Reichardt, 2001; Huang and Reichardt, 2003). Un rôle essentiel du BDNF dans la mise en place de la commande centrale a été précédemment documenté. Nous évoquerons ce point au cours du chapitre suivant dédié à l'émergence des activités respiratoires pendant l'embryogenèse.

En plus de cette action neurotrophe à long terme il a été récemment mis en évidence que les NTs, et plus particulièrement le BDNF via l'activation de son récepteur TrkB, peuvent aussi être impliquées dans des actions à plus court terme (secondes ou minutes) de type neuromodulation (voir pour revue Rose et al., 2004). Une telle action aigue du BDNF sur l'activité du preBötC a été décrite l'expression aux stades post-nataux (Thoby-Brisson et al., 2003, 2004). Comme nous l'avons mentionnée plus haut, l'expression du récepteur TrkB au BDNF est retrouvée sur certains neurones du preBötC et en constitue donc un marqueur anatomique. La neurotrophine participerait à la modulation de l'activité de l'oscillateur par une action à la fois les propriétés intrinsèques des neurones et sur la neurotransmission excitatrice. Les actions aigues du BDNF sur le réseau respiratoire à la naissance sont résumées dans une revue publiée dans *Journal of Physiology (Paris)* et présentée en Annexe 1 (Bouvier et al., 2006). Pendant mon Master 2, je me suis en effet intéressé à ces mécanismes de neuromodulation de l'oscillateur par les neurotrophines, et en particulier aux stades embryonnaires. Une partie des résultats obtenus (Bouvier et al., 2008, Annexe 2) sera évoquée au cours du chapitre suivant.

1.5.2 - Le rôle de la transmission synaptique inhibitrice

Outre l'abondance de neurones glutamatergiques et leur rôle crucial dans la rythmogenèse, le preBötC renferme également des populations de neurones inhibiteurs. Ces derniers sont notamment identifiés par l'expression d'un composant moléculaire impliqué dans la synthèse des acides aminés inhibiteurs GABA (acide Gamma-amino-butirique) et Glycine ou dans le remplissage des vésicules pré-synaptiques. Encore une fois, l'étude du nombre, de

la localisation et du rôle précis de ces neurones inhibiteurs a été favorisée par la disponibilité de lignées de souris génétiquement modifiées exprimant des protéines rapporteur sous le contrôle de promoteurs spécifiques (Winter et al., 2007). Par exemple, des études sur des lignées exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur GAD67, enzyme impliqué dans la biosynthèse du GABA, ont décrit la présence de neurones inspiratoires GABAergiques au sein du preBötC (Kuwana et al., 2006). Un profil de décharge inspiratoire a également été retrouvé au sein de neurones de l'oscillateur caractérisés par l'expression du transporteur vésiculaire de la glycine de type 2 (Glyt2) (Winter et al., 2009). Certains neurones glycinergiques du preBötC présentent même des propriétés pacemaker (Morgado-Valle et al., 2010), bien que leur rôle dans la rythmogenèse reste à déterminer.

En dépit de la présence de neurones inhibiteurs variés au sein du preBötC, le blocage pharmacologique des transmissions synaptiques glycinergiques et GABAergiques n'altère pas significativement la genèse des décharges rythmiques. Ils ne seraient donc pas directement impliqués dans la rythmogenèse respiratoire, qui ne repose donc pas sur des boucles d'inhibition réciproque. En revanche, la neurotransmission inhibitrice pourrait avoir un rôle dans la modulation de la fréquence des décharge inspiratoires, en participant au contrôle du potentiel membranaire des neurones à l'origine de la rythmogenèse. Des terminaisons axonales glycinergiques et GABAergiques ont d'ailleurs été détectées sur les neurones NK1R⁺ constitutifs de l'oscillateur (Liu et al., 2002). En outre, ils participeraient à l'élaboration de l'activité expiratoire, par inhibition phasique de l'activité d'autres populations neuronales intra ou extra-oscillateur (Onimaru et al., 1990).

1.5.3 - Le rôle des cellules gliales

L'essentiel des études visant à documenter les mécanismes cellulaires participant à la rythmogenèse au sein du réseau respiratoire et en particulier du preBötC se focalisent sur les propriétés des neurones. Cependant, il est bien connu que les populations gliales, et en particulier astrocytaires, peuvent jouer un rôle crucial dans la modulation de l'activité neuronale. En outre d'un apport de substrats énergétiques aux neurones, les astrocytes participent au contrôle de l'homéostasie potassique de l'espace extracellulaire et contribuent à la régulation de la dispersion synaptique de neurotransmetteurs dont le glutamate (Kullmann and Asztely, 1998; Rusakov and Kullmann, 1998). Le blocage du métabolisme glial induit une dépression de l'activité rythmique générée par le preBötC isolé *in vitro* (Hulsmann et al., 2000). Cet effet reflète l'implication cruciale des cellules gliales astrocytaires comme source essentielle de glutamine, et par conséquent de glutamate dans le SNC. Ainsi, un couplage

métabolique astrocyte-neurone conditionnant la disponibilité en glutamate contribuerait à stabiliser la rythmogénèse au sein du preBötC par une action indirecte sur l'excitabilité neuronale. Par ailleurs, certaines cellules astrogliales du preBötC expriment des transporteurs et/ou des récepteurs ionotropiques au glutamate de type AMPA (Grass et al., 2004). Elles pourraient donc également participer à une modulation de la rythmogénèse par une participation directe à la transmission synaptique excitatrice.

2 - Le groupe respiratoire para-facial : pFRG/RTN

Depuis 1991, il était proposé que la rythmogénèse repose sur l'activité d'un unique générateur central, le preBötC. Cependant, certaines expériences réalisées depuis suggèrent qu'un autre groupe neuronal, lui aussi assimilable à un CPG, participe à l'élaboration du rythme. Ces études désignent une région ventrale du bulbe, sous les motoneurones du nerf facial (7), connue chez le rongeur nouveau-né sous le nom de groupe respiratoire parafacial (pFRG, Figure 4). Chez l'adulte, cette localisation anatomique correspondrait au noyau retrotrapézoïde. (RTN), acteur clé dans la chémosensibilité centrale. Il est ainsi possible que pFRG et RTN définissent en fait des structures identiques ou chevauchantes à des âges différents. Ce sujet est très controversé et fait l'objet de nombreux débats. Ce serait hors de propos dans cette thèse d'en présenter et d'en discuter tous les arguments ; nous emploierons donc la terminologie pFRG/RTN. Cette section étant consacrée à la rythmogénèse respiratoire, nous évoquerons les études qui suggèrent que le pFRG/RTN y joue un rôle essentiel.

2.1 - L'existence d'un second groupe rythmogène

Deux séries d'expériences récentes ont remis en cause la participation exclusive du preBötC à la rythmogénèse respiratoire. D'une part, il existe au sein du pFRG des neurones rythmogènes qui s'activent avant la décharge inspiratoire. D'autre part, les modifications de l'activité du nerf phrénique après inhibition pharmacologique du preBötC sont incompatibles avec une rythmogénèse gouvernée par un oscillateur unique.

2.1.1 - Le pFRG/RTN contient des neurones pré-inspiratoires

Le concept de pFRG est né d'observations réalisées sur la préparation tronc cérébral/moelle épinière de rat nouveau-né (Onimaru et al., 1987 ; Onimaru and Homma, 1987). Les auteurs rapportent la présence de neurones ayant un profil de décharge jusqu'alors jamais observé sur les préparations similaires réalisées chez l'animal adulte. Ce profil consiste

en deux décharges de potentiels d'action qui entourent la décharge du nerf phrénique. Ces neurones sont ainsi qualifiés de pré-inspiratoires (pre-I). Les mêmes auteurs montrent que ces neurones possèdent en outre des propriétés pacemaker (Onimaru et Homma, 1987 ; Onimaru et al., 1995). Ces neurones pre-I sont essentiellement confinés à la surface ventrolatérale du bulbe rostral sous les motoneurones du nerf facial. La dénomination de groupe respiratoire para-facial, ou pFRG, est alors proposée pour y faire référence.

Par la suite, la séquence d'activation des différentes populations neuronales de la surface ventrale du bulbe par rapport à la décharge motrice inspiratoire a été étudiée à l'aide d'indicateurs fluorescents sensibles au voltage membranaire (Figure 11). Onimaru et Homma (2003) montrent ainsi que la décharge phrénique est précédée d'environ 500 ms par l'activation de populations neuronales en position para-faciale. Cette activité précéderait également celle du preBötC. Les mêmes auteurs révèlent qu'une lésion partielle bilatérale de la région para-faciale perturbe fortement la rythmogenèse respiratoire : la fréquence respiratoire

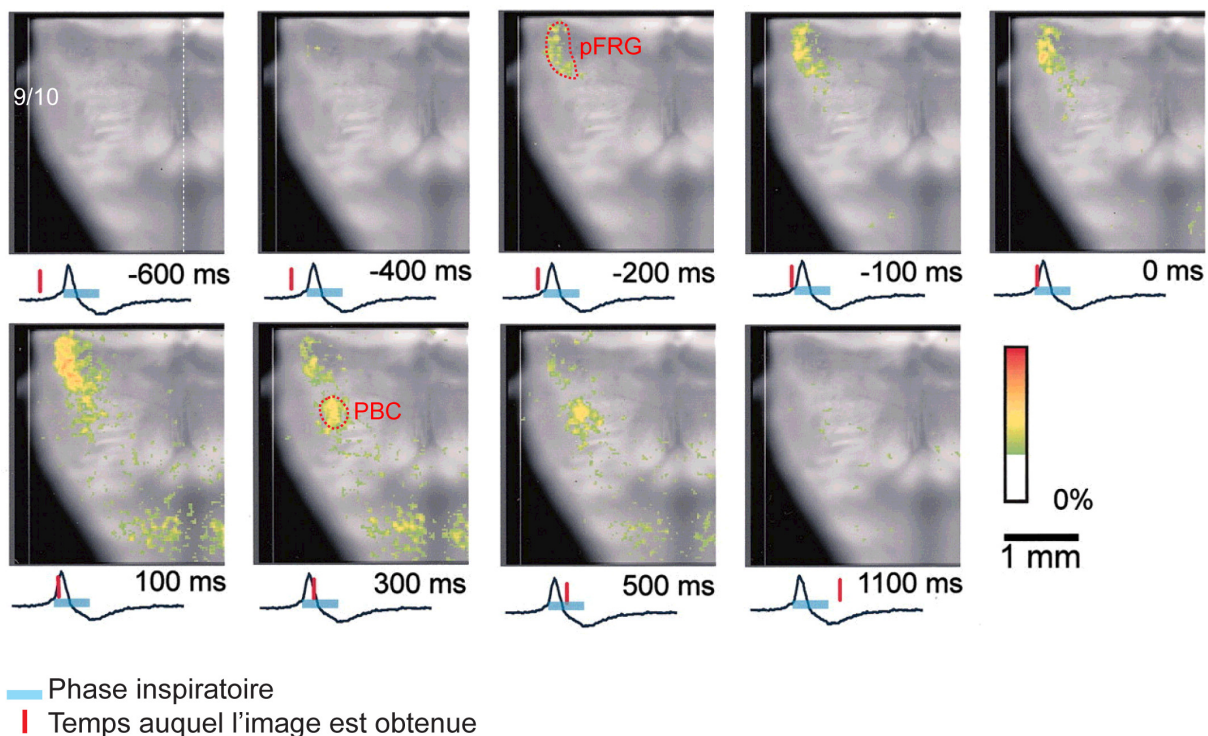


Figure 11 : activation spatio-temporelle des neurones du pFRG et du preBötC.

Les observations sont faites sur préparation de tronc cérébral isolé à l'aide d'un indicateur sensible au voltage membranaire. La photographie représente la surface ventrale de la partie gauche du tronc cérébral, située entre la sortie du nerf facial et la première racine cervicale. Chaque image est prise à un temps précis, indiqué en bas à droite, par rapport à la décharge du nerf phrénique (non illustrée) qui définit la phase inspiratoire. Les signaux optiques reflétant l'activité des neurones apparaissent en premier lieu au niveau de la partie ventrolatérale du tronc cérébral, à la limite entre le pont et le bulbe. Cette région correspond au groupe respiratoire para-facial (pFRG). Cette activité, qualifiée de pré-inspiratoire, survient environ 200 ms avant la décharge du preBötC observée plus caudalement (PBC) et définissant la phase inspiratoire.

D'après Onimaru and Homma, 2003.

est significativement diminuée et la durée de la décharge inspiratoire est allongée.

Ces travaux, ici résumés, indiquent que l'activité inspiratoire du preBötC est précédée par celle de neurones pre-I du pFRG. Ces derniers pourraient ainsi jouer un rôle essentiel dans l'initiation de la décharge inspiratoire et dans l'organisation temporelle du cycle respiratoire.

2.1.2 - L'expérience dite de « quantal slowing »

L'implication des neurones pre-I du pFRG dans la rythmogenèse respiratoire est renforcée par une seconde étude faisant appel aux mécanismes de neuromodulation par les opioïdes. Comme nous l'avons vu, les opioïdes exercent une puissante action inhibitrice sur la rythmogenèse au sein du preBötC (Gray et al., 2001). Les neurones pre-I du pFRG y sont en revanche insensibles (Takeda et al., 2001). Compte-tenu de ces propriétés, l'étude de Mellen et al. (2003) propose de trancher entre deux hypothèses : 1/ la rythmogenèse repose uniquement sur les neurones inspiratoires du preBötC. Dans ce cas, l'effet des opioïdes sur l'activité rythmique générée par le tronc cérébral isolé, contenant à la fois le preBötC et le réseau pre-I, doit être similaire à celui directement imputable au preBötC, donc à celui observé sur les tranches transversales. 2/ la rythmogenèse repose uniquement sur les neurones pre-I. L'effet des opioïdes sur l'activité du tronc cérébral isolé doit alors refléter l'effet sur le rythme pre-I, et sera donc minime. Les auteurs rapportent en fait un phénomène intermédiaire, que nous allons brièvement décrire.

L'application de DAMGO, agoniste des récepteurs opioïdes μ , sur une tranche transversale contenant uniquement le preBötC induit un ralentissement continu et linéaire de la fréquence des décharges (Gray et al., 2001 ; Mellen et al., 2003). Sur une préparation de tronc cérébral isolé, la fréquence de décharge des neurones pre-I n'est pas affectée. En revanche, les décharges phréniques voient leur fréquence diminuer. Cette diminution n'est pas continue, comme c'est le cas pour l'activité intrinsèque du preBötC isolé en tranche, mais graduelle (Mellen et al., 2003). Autrement dit, la période qui sépare deux décharges successives ne s'allonge pas linéairement, mais augmente par paliers correspondants à des multiples de la période initiale avant le traitement pharmacologique. Tout se passe comme si, sous l'effet du DAMGO, certains cycles respiratoires évitaient la décharge inspiratoire, pourtant présente à l'échelle du réseau pre-I. La période séparant les décharges phréniques est certes allongée, reflet de l'inhibition du preBötC, mais est toujours sous le contrôle du réseau pre-I, épargné. Ce phénomène, qualifié de « quantal slowing » suggère l'implication d'au moins deux groupes neuronaux distincts dans la rythmogenèse respiratoire : le générateur inspiratoire sensible aux opioïdes, vraisemblablement le preBötC, et le réseau neuronal pre-I

insensible aux opioïdes et vraisemblablement localisé au sein du pFRG.

2.2 - La chémosensibilité centrale et le pFRG/RTN

Nous venons de voir que le pFRG a été initialement défini chez le rongeur nouveau-né comme un groupe de neurones pre-I en position para-faciale. Son implication potentielle dans la rythmogenèse est par ailleurs renforcée par la possibilité qu'il constitue toute ou partie d'un réseau neuronal essentiel à la chémosensibilité centrale, le noyau rétro-trapézoïde (RTN).

Chez l'animal adulte, le RTN borde latéralement, ventralement, médialement et caudalement le noyau moteur du nerf facial (nerf 7). La portion caudale jouxte la limite rostrale du complexe Bötzing (BötC). Une implication du RTN dans le contrôle de l'activité respiratoire fut proposée dès son identification anatomique, en raison des projections qu'il envoie vers les groupes respiratoires dorsaux et ventraux (Smith et al., 1989 ; Connelly et al., 1989). Par ailleurs, une large population des neurones du RTN peut être identifiée sur la base de l'expression de Vglut2, de NK1R, et du facteur de transcription Phox2b ; certains auteurs parlent alors de RTN au sens biochimique (chemically-coded RTN ou ccRTN, voir la revue de Guyenet et al., 2010).

Il est maintenant bien établi que le RTN joue un rôle clé dans les mécanismes de chémosensibilité centrale. D'une part, la région du RTN exprime le proto-oncogène cFos en réponse à l'hypercapnie (Sato et al., 1992 ; Fortuna et al., 2009). D'autre part, l'acidification de cette région *in vivo* induit une augmentation de l'activité ventilatoire (Li et al., 1999). Des enregistrements intracellulaires des neurones du RTN montrent qu'ils sont activés par une augmentation de la pCO₂ et par la stimulation des chémorécepteurs périphériques (Mulkey et al., 2004 ; Takakura et al., 2006). La réponse des neurones du RTN au changement local de la pCO₂ persiste en l'absence de transmission synaptique (Mulkey et al., 2004), suggérant une chémosensibilité intrinsèque. L'origine moléculaire de ce mécanisme est encore peu connue, mais des conductances potassiques sensibles au pH, notamment médiées par les canaux de la famille TASK pourraient être recrutées (Mulkey et al., 2004, 2007 ; Dubreuil et al., 2009). Enfin, la photo-activation sélective de neurones du RTN transfectés pour exprimer la Channelrhodopsine2 induit une augmentation de la fréquence des décharges phréniques (Abbott et al., 2009). En somme, les neurones du RTN sont intrinsèquement capables de détecter des variations locales de la pCO₂ et de moduler en retour l'activité du rythme.

De manière intéressante, les neurones pre-I du pFRG décrits chez l'animal nouveau-né par Onimaru et ses collègues partagent de nombreuses propriétés avec les neurones du RTN chez l'adulte. Outre leur position anatomique comparable, ils expriment NK1R, sont

majoritairement glutamatergiques et expriment le facteur de transcription Phox2b (Onimaru et al., 2008). Par ailleurs, ils sont dépolarisés par une acidification du milieu, une réponse qui fait intervenir la fermeture d'une conductance potassique (Mulkey et al., 2004, 2007 ; Onimaru et al., 2008).

Ces observations suggèrent que le pFRG et le RTN pourraient constituer des structures identiques ou largement chevauchantes à des âges différents. Par sa chémosensibilité intrinsèque et sa capacité à moduler l'activité rythmique respiratoire, le pFRG/RTN est donc un acteur essentiel à la rythmogenèse centrale.

2.3 - Le pFRG/RTN : l'oscillateur du rythme expiratoire ?

Il est maintenant bien admis que la décharge inspiratoire est générée par le preBötC. L'activité du pFRG participerait à cette rythmogenèse basale, mais n'est pas absolument requise. Certains ont rapidement proposé que le pFRG serait impliqué dans l'initiation de l'expiration. Au repos, celle étant passive, elle ne nécessiterait pas de générateur attitré. En revanche, à l'effort, l'expiration devient active et recrute des effecteurs musculaires additionnels, notamment les muscles abdominaux. En raison de ses propriétés rythmogènes et chémosensibles, il était tentant de proposer que le pFRG/RTN soit un générateur conditionnel de l'activité expiratoire. Il pourrait intervenir en cas d'augmentation de la pCO₂, modification métabolique survenant notamment au cours des phases précoces de l'effort. Cette hypothèse, a été confortée par l'enregistrement des muscles genioglossaux et abdominaux, témoins de l'activité inspiratoire et expiratoire respectivement, chez le rat juvénile décérébré (Janczewski and Feldman, 2006). Les auteurs sont parvenus à manipuler indépendamment les activités inspiratoires et expiratoires par deux types d'approches. Pharmacologiquement, l'administration d'agonistes opiacés réduit, voire abolit, l'activité inspiratoire sans affecter la genèse des contractions musculaires expiratoires. Réciproquement, les antagonistes des récepteurs opioïdes accélèrent l'inspiration mais pas l'expiration. Mécaniquement, une augmentation artificielle du volume pulmonaire, connue pour favoriser l'expiration, entraîne une augmentation de la fréquence expiratoire sans modifier la genèse des contractions inspiratoires. Enfin, une transection caudale au noyau moteur facial, donc visant à éliminer la région du pFRG, entraîne la disparition des décharges expiratoires, alors que l'activité inspiratoire est préservée. Les auteurs concluent que l'expiration active est produite par un second générateur localisé dans le bulbe rostral. Ce n'est que très récemment que la même équipe a pu attribuer précisément ce rôle au pFRG/RTN. Les auteurs ont transfecté *in vivo* les neurones du pFRG/RTN avec un vecteur gouvernant l'expression du canal photosensible

Channelrhodopsine2. Chez le rat anesthésié, chaque stimulation lumineuse de cette région induit une contraction abdominale assimilable à l'activité expiratoire forcée (Feldman et al., 2010, en révision).

3 - Conclusions

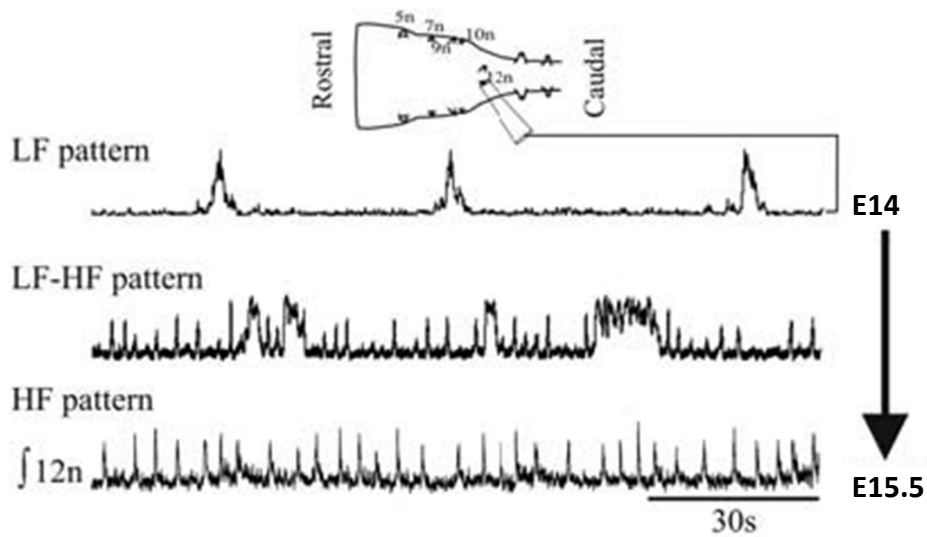
Il a longtemps été considéré que la respiration était gouvernée par un unique CPG bulbaire de la colonne respiratoire ventrale, le preBötC. Ce réseau neuronal est constitué d'une population très hétérogène de neurones respiratoires, dont les neurones glutamatergiques N1KR⁺/Sst⁺, prétendants cellulaires à l'origine à la rythmogenèse. Depuis 2003, on attribue cependant au pFRG/RTN, et particulièrement aux neurones Phox2b⁺ qui le constituent, un rôle essentiel, voir tout aussi important pour certains, dans l'élaboration du comportement respiratoire. Le concept actuel considère donc que l'activité rythmique respiratoire repose sur un réseau neuronal générateur de rythme, composé de deux oscillateurs, réseaux rythmogènes interconnectés assimilables à des CPGs. Le preBötC garde un rôle crucial par son implication dans la genèse de l'activité inspiratoire. Le rôle exact du pFRG/RTN reste lui très controversé. Il pourrait participer à l'entraînement du preBötC pendant la période péri-natale, et constituer par la suite l'oscillateur de l'activité expiratoire. Par ailleurs, il est un acteur essentiel des mécanismes de chémosensibilité centrale.

III. EMERGENCE DU GÉNÉRATEUR CENTRAL RESPIRATOIRE PENDANT L'EMBRYOGENÈSE

Chez les mammifères, la plupart des comportements et des structures centrales les sous-tendant ne deviennent parfaitement fonctionnels qu'après des étapes de développement suivant la naissance. Le fœtus n'est cependant pas immobile et l'absence de mouvements *in utero* (du corps, des yeux, de la face et de la cage thoracique notamment) est souvent un signe de mauvais pronostic. Ces derniers seraient indispensables au bon développement des appareils musculaires, et c'est particulièrement le cas de l'appareil respiratoire. Le pronostic vital à la naissance semble être en effet fortement conditionné par la présence d'un comportement moteur de type respiratoire chez le fœtus, représenté sous la forme de mouvements respiratoire fœtaux (MRFs). Chez l'homme, ils peuvent être détectés dès la 10^{ème} semaine de gestation et deviennent de plus en plus amples et réguliers jusqu'à la 36^{ème} semaine. Sans rôle ventilatoire (l'apport d'oxygène est assuré par la vascularisation maternelle), les MRFs conditionnent cependant la bonne maturation de différents effecteurs respiratoires. Les variations du volume thoracique qu'ils engendrent assurent par exemple un remplissage des poumons par du liquide amniotique, ce qui participe à la stimulation de la production précoce de surfactant pulmonaire. Ils exerceraient également les muscles respiratoires.

La présence de MFRs suggère que les centres nerveux à l'origine de la rythmogenèse respiratoire sont déjà actifs in utero. Au cours de ce chapitre, nous verrons qu'il existe bien des « formes embryonnaires » des oscillateurs respiratoires qui présentent des propriétés particulièrement proches des formes matures. Ce chapitre sera aussi l'occasion de comprendre l'enjeu des études, encore balbutiantes, chez l'embryon pour la compréhension de nombreuses pathologies respiratoires congénitales. Ce dernier point soulignera en outre l'importance des approches associant neurobiologie du développement et physiologie respiratoire, et ouvrira ainsi sur la dernière partie de cette introduction.

A- Brainstem



B- Medullary slice

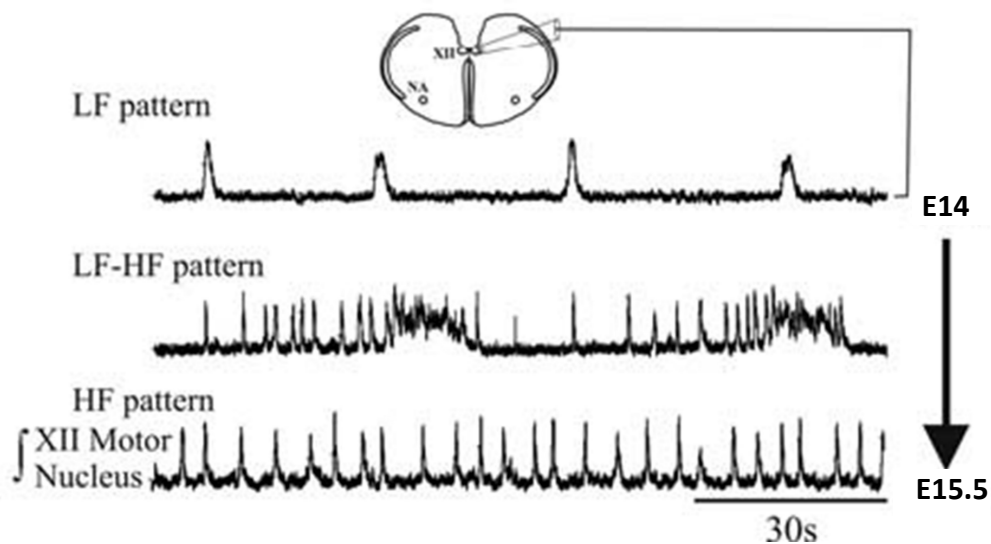


Figure 12 : émergence des activités rythmiques générées par le tronc cérébral isolé et le preBötC au cours du développement embryonnaire chez la souris.

(A). Evolution des activités rythmiques générées par la préparation de tronc cérébral isolé (Brainstem, vue schématique en haut) entre les stades embryonnaires E13 et E15. Les tracés représentent les neurogrammes intégrés obtenus à l'aide d'une électrode de succion positionnée sur la racine du nerf de l'hypoglosse (XII_n). Au stade E14 (trace du haut), seule une activité à basse fréquence (Low Frequency, LF pattern) peut être enregistrée. Entre les stades E14 et E15 (trace du milieu) apparaît une activité à haute fréquence (High Frequency, HF pattern). L'activité à basse fréquence est toujours présente sur certaines préparations, dont celle illustrée ici (LF-HF pattern). A partir du stade E15 (trace du bas), seule l'activité à haute fréquence persiste (HF pattern).

(B). Evolution des activités rythmiques générées par le preBötC isolé dans une tranche transversale (Medullary slice, vue schématique en haut). Les tracés représentent les neurogrammes intégrés de l'activité du noyau moteur de l'hypoglosse (XII). L'évolution des activités est similaire à celle observée en **(A)** sur la préparation de tronc cérébral isolé.

5n : sortie motrice du nerf trigéminal ; 7n : sortie motrice du nerf facial ; 9n : sortie motrice du nerf glossopharyngien ; 10n : sortie motrice du nerf vague. NA : noyau ambigu.

D'après Thoby-Brisson et al., 2005.

1 - Emergence des activités rythmiques respiratoires

1.1 - Respiration fœtale

Chez la souris, des mouvements coordonnés de la cage thoracique, d'ouverture de la bouche et de flexion du corps et de la tête ont été mis en évidence dès E15.5, grâce à une méthode d'observation *ex utero* des activités motrices du fœtus perfusé de façon transplacentaire (Suzue, 1994). Ces premiers mouvements respiratoires fœtaux suivent de quelques jours l'apparition des mouvements du corps du fœtus. Ces observations ont été retrouvées chez le rat par une approche non-invasive permettant, chez une femelle gestante, l'enregistrement par ultrasons de l'activité motrice des fœtus (Kobayashi et al., 2001). L'évolution de la maturité du système respiratoire embryonnaire peut aussi être simplement étudiée par l'analyse et l'enregistrement par pléthysmographie *in vivo* de l'activité ventilatoire d'embryons délivrés par césarienne à des dates embryonnaires précises. Viemari et al. (2003) ont ainsi rapporté l'existence d'activités motrices respiratoires visibles au stade E16.5 chez la souris. Toutefois, ces inspirations profondes, survenant rarement et apparentées à des hoquets, ne permettent pas encore d'assurer une ventilation efficace suffisante à la survie de l'animal. En revanche, à partir de E18.5, les fœtus obtenus par césarienne développent en quelques minutes une activité ventilatoire dont la fréquence (~110 cycles/min) est comparable à celle d'animaux nouveaux-nés (P0-02). Ces « prématurés » sont d'ailleurs capables de survivre s'ils sont rapidement pris en charge par une femelle allaitante. Le passage des stades E18.5 à P0 est caractérisé par une stabilisation de la régularité des inspirations, alors les autres paramètres respiratoires principaux (VT et VE) ne présentent pas de différence significative. Il n'y aurait donc pas de processus de maturation particulier entre ces deux stades, ce qui suggère que la commande centrale respiratoire à E18.5 est déjà au niveau de maturité requis pour la survie à la naissance.

1.2 - Emergence des activités rythmiques respiratoires

L'approche par césarienne permet, à l'issue de l'observation de l'embryon intact, de poursuivre l'étude sur des préparations réduites *in vitro* de tronc cérébral isolé. L'enregistrement électrophysiologique des sorties motrices innervant le nerf phrénique (C4) ou hypoglossal (XII_n) aux stades embryonnaires révèle l'émergence des activités motrices respiratoires selon la séquence décrite à la Figure 12A (Thoby-Brisson et al., 2005). En particulier, entre les stades E13 et E15, s'opère une transition entre une activité primordiale de basse fréquence (~1,5 cycles / min) vers une activité à haute fréquence (~10 cycles / min). La

fréquence des décharges à haute fréquence s'accroît avec l'âge jusqu'à atteindre à E18.5 des valeurs similaires à celles observées à la naissance (Viemari et al., 2003). Cette activité est qualifiée de respiratoire, notamment en raison de son site d'origine (l'oscillateur lui-même) et de sa sensibilité aux neuromodulateurs respiratoires classiquement décrits (voir ci-dessous). L'absence de capacité ventilatoire des souriceaux avant E18.5, alors qu'une activité rythmique spontanée est détectable sur les sorties motrices *in vitro* dès E15.5, reflète vraisemblablement une immaturité des effecteurs respiratoires de la cage thoracique, du surfactant pulmonaire, du système cardiovasculaire ou de boucles de régulation.

2 - Emergence des oscillateurs respiratoires

2.1 - Oscillateur du preBötC

2.1.1 - Emergence fonctionnelle

2.1.1.1 - Premières activités

En réalisant des préparations de tranches transversales contenant le preBötC à différents stades embryonnaires, il a été possible de dater et de caractériser son activité précoce (Thoby-Brisson et al., 2005). Sur une tranche préparée à partir d'embryon de souris au stade E13.5, il est possible de retrouver l'activité basse fréquence observée sur les sorties motrices, en enregistrant par électrophysiologie l'activité de l'oscillateur ou la population de motoneurones de l'hypoglosse (Figure 12B). Toutefois, une approche par l'imagerie calcique, qui permet de visualiser l'activité neuronale en temps réel sur l'ensemble de la tranche, montre que cette activité primordiale trouve son origine, dorsalement, en dehors de la région anatomique de l'oscillateur. Par ailleurs, l'initiation de ces longues décharges requiert l'activation des synapses électriques mais est insensible aux bloquants de la neurotransmission glutamatergique, une propriété incompatible avec les mécanismes de rythmogenèse décrits chez l'adulte. En conséquence, cette activité à basse fréquence ne serait pas assimilable à une activité de nature respiratoire. En revanche, à partir du stade E15/E15.5, une activité spontanée à haute fréquence apparaît au sein de l'oscillateur et représente vraisemblablement la source des décharges enregistrées sur les sorties motrices des préparations de tronc cérébral entier. En effet, cette activité présente des caractéristiques des décharges inspiratoires décrites chez l'adulte : elle est synchronisée bilatéralement, la fréquence des décharges est modulée par l'application de substance P exogène (accélération) ou d'agonistes opiacés (ralentissement

voire mise sous silence), et requiert la transmission synaptique médiée par les récepteurs AMPA/Kainate au glutamate.

L'émergence d'activités rythmiques respiratoires au sein de l'oscillateur du preBötC a donc lieu entre les stades E14.5 et E15.5.

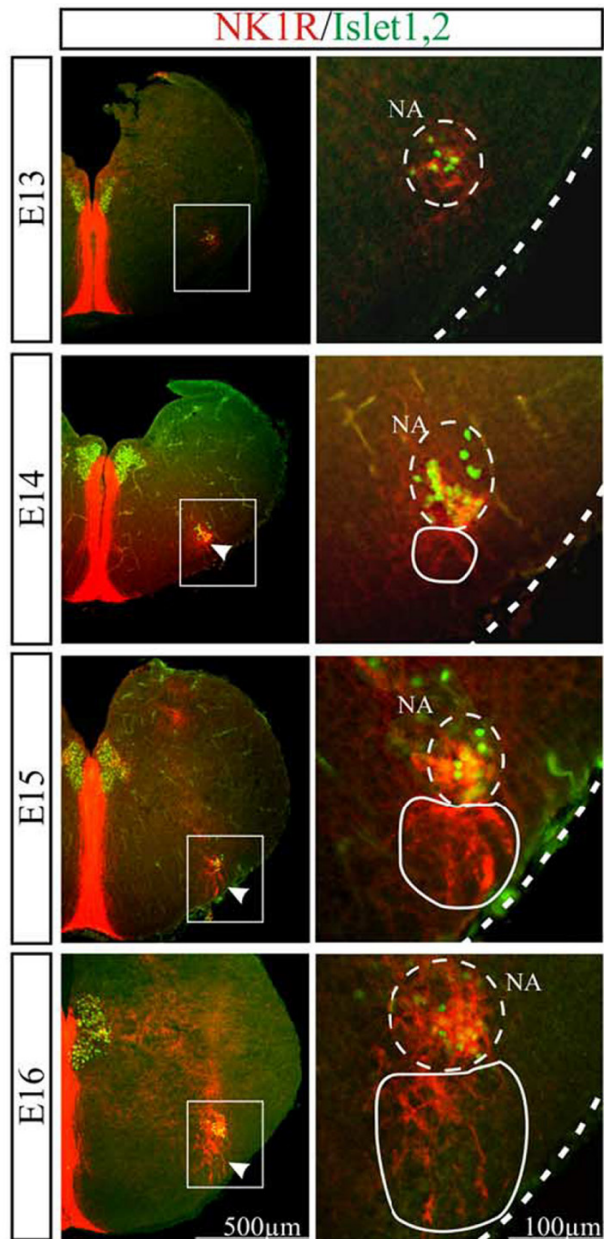
2.1.1.2 - Propriétés cellulaires

Chez l'adulte, nous avons vu que la complexité des types neuronaux semble être à la base de l'établissement d'une commande respiratoire normale, présentant notamment plusieurs phases caractéristiques. Même si cette complexité est réduite au sein des tranches in vitro, de nombreuses études ont rapporté la présence de neurones présentant des profils de décharge variés au sein du preBötC isolé. Le preBötC embryonnaire présente-t-il déjà l'essentiel des sous-types neuronaux décrits chez l'adulte ? Par la méthode du patch-clamp, des types cellulaires variés ont pu en effet être identifiés chez l'embryon sur la base de leur profil de décharge. D'une part, on y observe des neurones qui reçoivent, pendant la décharge inspiratoire, des bouffées synaptiques excitatrices. Leur profil de décharge est donc synchronisé avec l'activité globale et ils représentent vraisemblablement les formes embryonnaires des neurones inspiratoires. Une faible fraction d'entre eux maintient une activité rythmique autonome, dépendante du voltage, après blocage de la neurotransmission excitatrice. Le preBötC embryonnaire contient donc, comme chez l'adulte, des neurones à propriétés pacemakers, ou bursters. Il reste cependant à déterminer si les neurones bursters embryonnaires sont déjà diversifiés comme ils le sont à la naissance, s'ils reposent sur les mêmes propriétés intrinsèques et s'ils jouent un rôle dans la genèse ou l'initiation précoce du rythme. Enfin, chez l'embryon, une population de neurones reçoit, pendant la décharge inspiratoire, des entrées synaptiques « de type inhibitrices » sous-tendus par des flux de l'ion chlorure. Ils sont vraisemblablement destinés à décharger pendant la phase expiratoire une fois l'établissement d'un gradient du chlore mature après la naissance (voir paragraphe 3). Cependant, pendant les stades embryonnaires, le profil de décharge de ces neurones sera semblable à celui des « vrais » neurones inspiratoires. Chez les rongeurs nouveaux-nés, la rythmogenèse respiratoire semble être une propriété émergente du réseau qui résulte de la synchronisation, principalement médiée par le glutamate, de neurones constitutifs dotés de propriétés intrinsèques particulières. Différentes observations suggèrent que ce mode opératoire est déjà acquis par l'oscillateur aux stades de son émergence. D'une part, une grande fraction des neurones de l'oscillateur (neurones inspiratoires) reçoit un bombardement synaptique excitateur pendant les décharges inspiratoires. L'analyse pharmacologique de la

Figure 13 : distribution spatio-temporelle de l'expression des récepteurs NK1R au sein du preBötC au cours du développement embryonnaire chez la souris.

Les images illustrent des immunomarquages dirigés contre le récepteur NK1R (rouge) et le marqueur de motoneurones Islet1,2 (vert) réalisés sur des sections de tronc cérébral au niveau du preBötC entre les stades embryonnaires E13 et E16. Les images de la colonne de gauche représentent des demi-tranches (moitié droite). La ligne médiane est repérable par sa forte immunoréactivité pour NK1R. Les images de droite sont des vues agrandies de la région du preBötC délimitée par le carré blanc sur les images de gauche. Un marquage positif pour NK1R (têtes de flèches blanches) est détecté à partir du stade E14. Au cours des stades suivants, davantage de neurones expriment NK1R comme l'illustre l'élargissement de la région immuno-positif délimitée en blanc sur les images de droite. NA : noyau ambigu.

D'après Thoby-Brisson et al., 2005.



nature de ces courants révèle qu'ils sont initiés par le glutamate et médiés par les récepteurs AMPA. Le blocage pharmacologique de ces derniers supprime de manière réversible les décharges inspiratoires. D'autre part, chez les animaux génétiquement privés du transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2), l'activité rythmique n'apparaît jamais au sein de l'oscillateur, malgré la persistance

anatomique des neurones constitutifs (NK1R-positifs notamment). Ces animaux, incapables de respirer, meurent à la naissance et témoignent par ailleurs de défauts développementaux, notamment des alvéoles pulmonaires (Wallen-Mackenzie et al., 2006). Enfin, l'analyse des courbes courant-voltage obtenues sur des neurones du preBötC embryonnaire révèle une rectification entrante à des potentiels hyperpolarisants. Cette propriété suggère l'activation de conductances voltage-dépendantes, comme le courant I_h , effectivement détecté dans 70 % des neurones du preBötC embryonnaire. Rappelons que chez l'adulte, I_h est impliqué dans la modulation de la rythmogenèse.

La genèse du rythme respiratoire au sein du preBötC aux stades embryonnaires semble ainsi reposer sur une organisation neuronale comparable avec celle connue à la naissance.

2.1.2 - Emergence anatomique

2.1.2.1 - Marqueurs anatomiques

En raison de l'importance fonctionnelle des récepteurs NK1R pour l'activité de l'oscillateur et la respiration à la naissance, le profil spatiotemporel de l'expression de cette protéine a fait l'objet des travaux pionniers chez l'embryon. Dès le stade E13.5/E14 chez la souris (E16.5 chez le rat), un marquage positif est détecté, quoique très faiblement, au sein d'interneurones (ChAT-négatifs) en position ventrale au noyau ambigu (Figure 13). Au cours des jours embryonnaires suivants, l'expression de NK1R s'intensifie pour définir rapidement une région très comparable au preBötC décrit chez l'adulte (Pagliardini et al., 2003; Thoby-Brisson et al., 2005). L'expression du neuropeptide Sst, définissant un sous-groupe vital des neurones NK1R⁺, semble suivre approximativement le même profil (Pagliardini et al., 2003). En revanche, la présence des récepteurs μ aux opiacés ou à la sérotonine reste à déterminer, même si les expériences fonctionnelles *in vitro* suggèrent qu'ils seraient déjà exprimés.

2.1.2.2 - Date de naissance des neurones du preBötC

La date de naissance et d'initiation de la migration des neurones du preBötC (neurones NK1R-positifs) a été analysée chez le rat à l'aide d'injections de 5-bromo-déoxyuridine (BrdU). Cet analogue de la thymidine s'incorpore à l'ADN des cellules en division, et est révélé par un anticorps dédié. Après injection de la BrdU à des rates gestantes à des stades embryonnaires précis, Pagliardini et al (2003) ont recherché la présence de cellules immunoréactives à la fois pour la BrdU et NK1R. Ils montrent que la majorité (71 %) des neurones NK1R-positifs naît aux stades E12-E13 (chez le rat, soit *à priori* E10-E11 chez la souris). Les neurones moteurs du noyau ambigu adjacent sont quant à eux nés deux jours plus tôt. Ces travaux rapportent également que les neurones NK1R-positifs du preBötC atteignent leur position finale entre E17 et E18 (chez le rat, soit *à priori* E14/E15 chez la souris).

2.1.3 - Connectivité

2.1.3.1 - Connectivité commissurale

L'établissement de connexions commissurales fonctionnelles entre les oscillateurs de part et d'autre de la ligne médiane semble concomitant à l'émergence de la rythmogenèse. D'une part, les activités respiratoires sont bilatéralement synchronisées dès leur émergence. D'autre part, l'activation pharmacologique d'un preBötC, par application locale d'AMPA, n'induit pas de réponse de l'oscillateur contralatéral avant E14.5 (Thoby-Brisson et al., 2005).

2.1.3.2 - Connectivité vers les sorties motrices

Les préparations de tronc cérébral isolé présentent une activité motrice synchronisée bilatéralement sur les racines ventrales des nerfs respiratoires (VII, XII et phrénique notamment), dont l'émergence au cours de l'embryogenèse suit celle observée pour l'oscillateur isolé en tranche. En outre, les mêmes mécanismes de neuromodulation s'appliquent aux activités enregistrées sur les deux types de préparation. Ces observations indiquent qu'aux stades embryonnaires de son émergence, le preBötC est déjà fonctionnellement raccordé aux groupes de neurones pré-moteurs, eux-mêmes déjà raccordés aux neurones moteurs respiratoires.

2.1.4 - Le rôle des neurotrophines

De nombreuses études suggèrent que les neurotrophines, et en particulier le BDNF, jouent un rôle essentiel dans la mise en place d'une commande respiratoire normale à la naissance. Par exemple, les souris invalidées pour le gène codant pour le BDNF lui-même présentent *in vivo* des déficits développementaux aboutissant à une activité respiratoire anormale : l'amplitude respiratoire est faible, la fréquence déprimée et irrégulière et leur réponse ventilatoire à l'hypoxie est diminuée. Ces troubles sont en partie dus à une réduction importante du nombre de neurones impliqués dans la chémosensibilité périphérique (Erickson et al., 1996). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que ces mêmes animaux présentent un déficit au niveau du nombre des neurones adrénérgiques localisés dans le groupe respiratoire pontique (Guo et al., 2005), ainsi qu'un dysfonctionnement dans la commande centrale respiratoire. En effet l'activité rythmique enregistrée sur des préparations de tronc cérébral isolé obtenues à partir d'animaux *BDNF*^{-/-} est anormalement lente et irrégulière, suggérant une atteinte des oscillateurs respiratoires (Balkowiec and Katz, 1998). L'ensemble de ces données indique que le BDNF est nécessaire au cours du développement embryonnaire pour la mise en place d'un réseau neuronal générateur de rythme fonctionnel. Les déficits cellulaires observés chez les animaux *BDNF*^{-/-} reflètent vraisemblablement le rôle neurotrophe du BDNF. Or, nous avons évoqué dans le chapitre précédent que cette neurotrophine peut aussi exercer une action neuromodulatrice aigüe, y compris sur l'oscillateur du preBötC aux stades postnataux (Thoby-Brisson et al., 2003). Il est ainsi possible que le déficit respiratoire observé chez les animaux invalidés pour le gène du BDNF soit dû en partie à l'absence de cette action neuromodulatrice au cours du développement embryonnaire. Afin d'étayer cette hypothèse il était primordial dans un premier temps de déterminer si le BDNF exerce cette action

modulatrice aussi sur l'activité du preBötC dès son émergence chez l'embryon. Cette question fut l'objet de mes travaux de Master 2. Les résultats ont abouti à une publication dans *European Journal of Neuroscience* que j'ai insérée à ce manuscrit en Annexe II. Cette étude montre l'existence d'une neuromodulation par le BDNF de l'activité rythmique du preBötC dès les stades embryonnaires. Une application exogène de la neurotrophine sur des préparations de tranches transversales aux stades E15.5/E16.5 induit une augmentation de la fréquence des décharges de l'oscillateur, un effet qui requiert l'activation des récepteurs TrkB. A l'échelle cellulaire, la neurotrophine induit une potentiation de la neurotransmission glutamatergique entre neurones constitutifs du réseau et sur une augmentation de l'activité des neurones bursters. Ces travaux montrent que des récepteurs fonctionnels TrkB au BDNF sont exprimés par les neurones constitutifs du preBötC dès son émergence fonctionnelle. Nous montrons en outre que le preBötC pourrait être lui-même une source de BDNF. Compte-tenu des évidences d'une libération de BDNF dépendante de l'activité (Balkowiec and Katz, 2000, 2002), ces travaux suggèrent que maturation et modulation de l'activité du preBötC sont réciproquement liées par une action autocrine/paracrine du BDNF au sein de l'oscillateur. Cette étude aborde ainsi l'influence de l'activité cellulaire et de la neurotransmission excitatrice sur le développement neuronal. Ces mécanismes, particulièrement importants dans la mise en place de systèmes neuronaux fonctionnels, se situent largement plus en aval des processus de régionalisation précoces qui instruisent le destin neuronal, objets de cette thèse. Pour cette raison, j'ai choisi d'exclure ces travaux de mes résultats et de la discussion.

Les études combinant approches fonctionnelles et anatomiques s'accordent pour une émergence, à la fois de l'activité de l'oscillateur, et des neurones NK1R-positifs au stades E15 chez la souris (E17-E18 chez le rat). Cependant, cette population neuronale ne constituent vraisemblablement pas la totalité – ni la majorité ? – de l'effectif cellulaire du preBötC. Il est ainsi possible que d'autres populations cellulaires se différencient – et soient nées – à des stades différents. Toutefois, l'apparition concomitante à E15 (souris) d'une activité spontanée et de récepteurs NK1R, associée à la présence au même stade de réponses à différents neuromodulateurs respiratoires et de neurones présentant des profils de décharge variés, suggère que l'essentiel des populations cellulaires connues chez l'adulte sont présentes et fonctionnelles dès ce stade embryonnaire

2.2 - Le groupe respiratoire para-facial embryonnaire

Comme nous l'avons au second chapitre, le modèle actuel accorde au groupe

para-facial pFRG/RTN une place de plus en plus importante dans la rythmogenèse respiratoire post-natale, par un rôle potentiel dans la genèse des activités expiratoires et/ou dans l'intégration des informations chémosensibles. Nous allons voir que la découverte très récente d'une potentielle forme embryonnaire de cet oscillateur a considérablement enrichi la compréhension des étapes aboutissant à une commande respiratoire normale à la naissance. Sauf mention spéciale, les données présentées dans l'ensemble de ce paragraphe sont issues de Thoby-Brisson et al., (2009).

2.2.1 - Emergence fonctionnelle

Dès le stade E14.5, soit un jour avant l'émergence fonctionnelle du preBötC, une activité rythmique à haute fréquence (12 bursts/min) est détectée au sein d'un petit groupe cellulaire de la surface ventrale du tronc cérébral, jouxtant les motoneurones faciaux (Figure 14). Sur une tranche transversale, les auteurs retrouvent une activité rythmique spontanée et synchronisée au sein de quelques neurones localisés entre les motoneurones faciaux et la limite ventrale. La position particulière de ces neurones et leurs propriétés intrinsèques que je vais résumer ci-dessous, suggèrent qu'ils pourraient représenter une forme embryonnaire du pFRG. Le terme d'oscillateur para-facial embryonnaire, ou e-pF, est alors proposé.

2.2.2 - Une forme embryonnaire du pFRG/RTN ?

Le premier argument envers cette hypothèse découle de la localisation des cellules rythmiques constitutives de l'e-pF. La quasi-totalité d'entre elles se situe autour des motoneurones faciaux, immédiatement ventral et essentiellement latéralement. L'étendue de ces cellules selon l'axe antéro-postérieur suit approximativement l'étendue du noyau facial, avec une concentration significativement plus importante dans les positions les plus caudales. Dès leur émergence fonctionnelle à E14.5, les neurones de l'e-pF expriment des récepteurs fonctionnels NK1R, le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2) et le facteur de transcription Phox2b. L'absence d'expression du marqueur motoneuronal Islet1,2 indique qu'il s'agit d'interneurones. Ces observations rappellent la description du RTN chez l'adulte (Nattie and Li, 2002; Stornetta et al., 2006) et du pFRG chez le nouveau-né (Onimaru et al., 2008). D'autre part, on retrouve au sein de l'oscillateur de l'e-pF à la fois des neurones présentant des entrées synaptiques excitatrices glutamatergiques, et des neurones exclusivement entraînés par des entrées médiées par le chlore. Bien que cet ion ait encore un effet dépolarisant chez l'embryon, il est vraisemblable qu'après maturation du gradient du chlore à la naissance, ces neurones subissent une inhibition pendant l'inspiration suivie d'un

rebond post-inspiratoire. Ces deux propriétés ont été précédemment associées aux neurones du pFRG (Onimaru and Homma, 2003, 2005). Par ailleurs, contrairement à celle du preBötC, la rythmogenèse au sein de l'e-pF résiste à l'activation des récepteurs μ aux opioïdes, un comportement réminiscent du réseau neuronal pre-I du pFRG décrit par Onimaru et ses collègues chez l'animal nouveau-né. Enfin, l'activité rythmique générée par le e-pF est

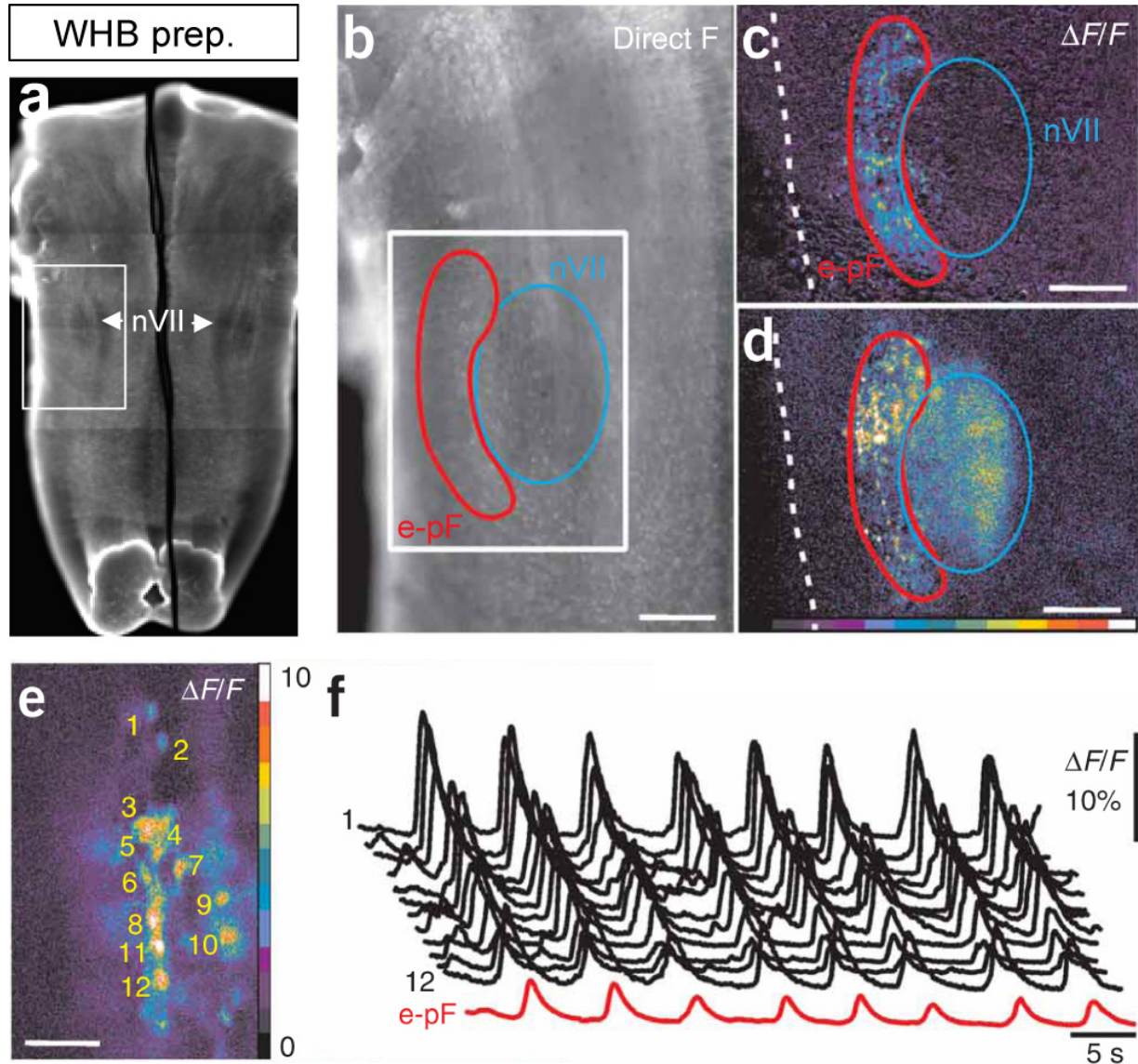


Figure 14 : émergence fonctionnelle de l'oscillateur parafacial au stade E14.5 chez la souris.

(a) Préparation de tronc cérébral isolé (Whole Hindbrain preparation, WHB Prep.) au stade E14.5 incubée avec l'indicateur fluorescent sensible au calcium, Calcium Green-1 AM, et observée en fluorescence depuis la face ventrale. Les noyaux moteurs faciaux (nVII) sont indiqués par les flèches. (b) Agrandissement de la région délimitée en (a). Le groupe respiratoire para-facial embryonnaire (e-pF, en rouge) est localisé latéralement au noyau facial (en bleu). (c,d) Agrandissement de la région délimitée en (b), illustrant (pourcentage de variation de fluorescence, $\Delta F/F$, codage en pseudo-couleurs) une décharge de l'e-pF (c) et une décharge synchronisée de l'e-pF et des motoneurones faciaux (d). (e) Observation à fort grossissement des cellules constitutives de l'oscillateur de l'e-pF contenues dans la région rouge en (b,c,d). L'image est prise pendant une décharge synchronisée de 12 cellules. (f) Tracés correspondant aux variations de fluorescence au cours du temps des 12 cellules illustrées en (e), et de l'ensemble de la région (en rouge, e-pF).

Adapté de Thoby-Brisson et al., 2009.

fortement accélérée par une acidification du pH, un effet exclusivement attribuable aux cellules Phox2b-positives qui le constituent (Dubreuil et al., 2009). Cette dernière propriété renforce également l'analogie avec le pFRG décrit chez le nouveau-né, dont les cellules individuelles sont douées de chémosensibilité intrinsèque (Onimaru et al., 2008).

2.2.3 - Des mécanismes de rythmogenèse différents de ceux du preBötC

Les études au stade E14 permettent des investigations ciblées des mécanismes opératoires à l'origine de la rythmogenèse de l'e-pF. On s'affranchit en particulier d'entrées potentielles en provenance du preBötC, encore inactif. La genèse du rythme et la synchronisation intercellulaire au sein du e-pF persistent en l'absence de transmission synaptique glutamatergique médiée par les des récepteurs AMPA/Kainate, ainsi que chez les animaux génétiquement invalidés pour le transporteur du glutamate type 2 (Vglut2). Contrairement à l'oscillateur du preBötC, la rythmicité de l'oscillateur e-pF ne serait donc pas fondée sur des connexions synaptiques excitatrices récurrentes, bien que les neurones le constituant soient majoritairement glutamatergiques (Dubreuil et al., 2008). Des sorties excitatrices sont vraisemblablement nécessaires à l'entraînement des autres composants du réseau respiratoire. L'activité de l'e-pF résiste par ailleurs à l'application de l'agoniste opiacé DAMGO. Un mélange destiné à éliminer la transmission dépendante des récepteurs au GABA_A (bicuculline) et à la glycine (strychnine) n'est pas plus efficace pour abolir l'activité du e-pF qu'il ne l'est pour celle du preBötC. En revanche, en présence de l'inhibiteur des synapses électrique carbenoxolone (CBX), l'activité globale du e-pF est perdue. Dans ces conditions, les cellules individuelles maintiennent toutefois un profil de décharge rythmique mais sont incapables de se synchroniser. Rappelons que ce mode de communication intercellulaire n'est pas requis pour la rythmogenèse au sein du preBötC. Ce n'est qu'après blocage de la conductance sodique persistante I_{Nap} par le riluzole que les neurones du e-pF perdent leur rythmicité intrinsèque. Des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp indiquent en effet que le e-pF est constitué d'une population, relativement homogène, de neurones bursters reposant sur cette conductance sodique. La comparaison des propriétés cellulaires du e-pF, ici résumées, et celles du preBötC décrites plus haut, révèle que les deux oscillateurs opéreraient selon des mécanismes radicalement différents : l'activité rythmique du e-pF reposerait sur la synchronisation par des jonctions gap de neurones bursters dépendant du courant I_{Nap} ; l'activité rythmique du preBötC serait une propriété émergente d'un réseau hétérogène de neurones, essentiellement non bursters, synchronisés par des connexions glutamatergiques récurrentes.

2.3 - La synchronisation des deux oscillateurs

Les activités rythmiques motrices émergent de manière concomitante avec les premières activités spontanées du preBötC et paraissent dépendre de celui-ci (sensibilité au CNQX et au DAMGO notamment). Quel est donc le rôle fonctionnel de ce nouvel oscillateur que constitue le e-pF, pourtant actif un jour avant le preBötC ? L'ensemble de ce paragraphe se réfère aux travaux de Thoby-Brisson et al. (2009), l'unique étude réalisée à ce jour.

Comme nous l'avons décrit plus haut, le stade E14.5 est caractérisé par l'absence d'activité spontanée survenant à haute fréquence à la fois au niveau du preBötC isolé dans une tranche et des sorties motrices (C4 notamment). A ce stade, l'activité de l'e-pF, bien que présente à l'échelle de l'oscillateur, ne se manifeste pas encore au niveau moteur. Au cours des stades suivants, les activités motrices apparaissent et se synchronisent progressivement avec les décharges de l'e-pF (Figure 15). A l'issue de cette étape de maturation, soit au stade E15.5/E16 et jusqu'à la naissance, tous les acteurs respiratoires dont l'activité est détectable sur la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolé (e-pF, noyaux faciaux, racine C4), déchargent de manière synchrone. Il semble donc qu'il s'établisse pendant la période E14/E16,

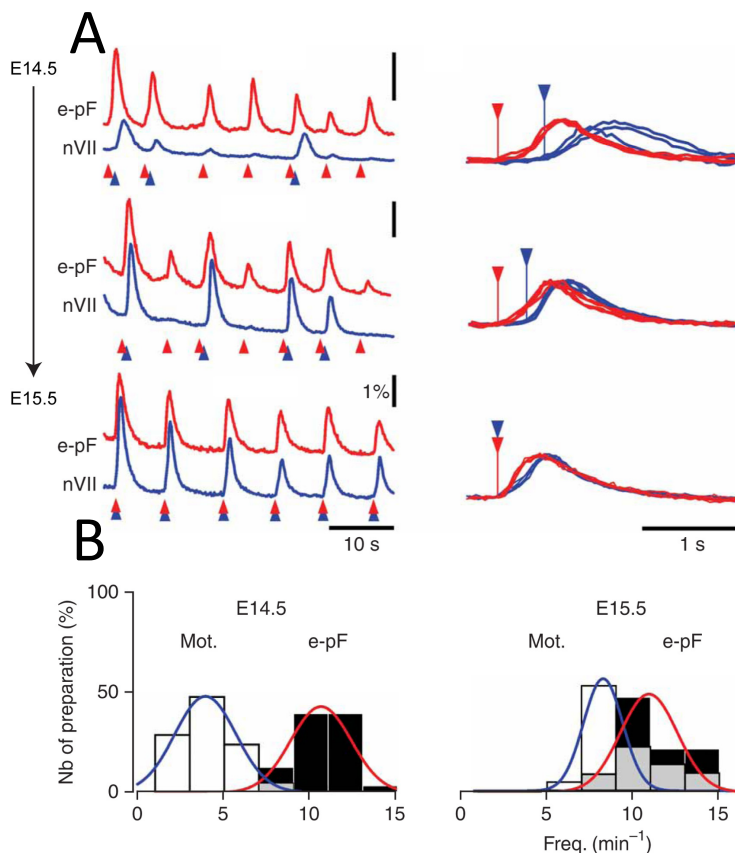


Figure 15 : couplage progressif entre l'oscillateur parafacial embryonnaire (e-pF) et l'activité motrice au cours du développement embryonnaire chez la souris.

Les enregistrements sont effectués sur des préparations de tronc cérébral/moelle épinière incubées dans l'indicateur fluorescent sensible au calcium, Calcium Green-1 AM.

(A). Tracés représentant les activités spontanées, enregistrées par imagerie calcique, de l'e-pF (rouge) et du noyau moteur facial (nVII, bleu) entre les stades E14.5 (traces du haut) et E15.5 (traces du bas). Les tracés à droite illustrent une superposition des activités survenues au cours de plusieurs décharges successives.

(B). Distribution des fréquences des activités motrices (Mot., barres vides, courbe bleue) et de l'e-pF (barres noires, courbe rouge) obtenues sur des préparations à E14.5 (gauche) et E15.5 (droite).

Le stade E14.5 se caractérise par une activité soutenue de l'e-pF mais par la présence occasionnelle de décharges motrices (A, en haut ; B, à gauche). Au cours des stades suivants, davantage de décharges de l'e-pF sont incorporées à l'activité motrice (A, au milieu), résultant en une augmentation de la fréquence de celle-ci. A partir du stade E15.5, les deux types d'activités sont synchronisées (A, en bas ; B, à droite). D'après Thoby-Brisson et al., 2009.

un couplage fonctionnel puissant entre les deux oscillateurs. Les modifications des fréquences de décharge de l'e-pF et des sorties motrices après réalisation d'une section transversale sous les noyaux faciaux illustrent la nature de ce couplage (Figure 16). De ces expériences, il apparaît que le e-pF exerce une modulation positive sur la fréquence des décharges au niveau des sorties motrices. Cet effet reflète vraisemblablement un entraînement direct de l'activité du preBötC. A l'inverse, les oscillations de l'e-pF voient leur fréquence augmenter en l'absence de connectivité avec le bulbe caudal. Ces observations peuvent être reproduites par une approche pharmacologique. Par exemple, l'application de riluzole, sans effet direct sur la rythmogenèse du preBötC isolé dans une tranche, entraîne la disparition des décharges de l'e-pF et un ralentissement de la fréquence au niveau des sorties motrices. Renforçant le schéma de connectivité entre les deux oscillateurs, des neurones recevant des entrées synaptiques, excitatrices ou inhibitrices, synchronisées avec l'activité du preBötC ont pu être détectés au sein de l'e-pF. Enfin, l'accélération de la fréquence des décharges motrices sous l'effet d'une acidification du milieu (hypercapnie) semble exclusivement imputable à l'e-pF.

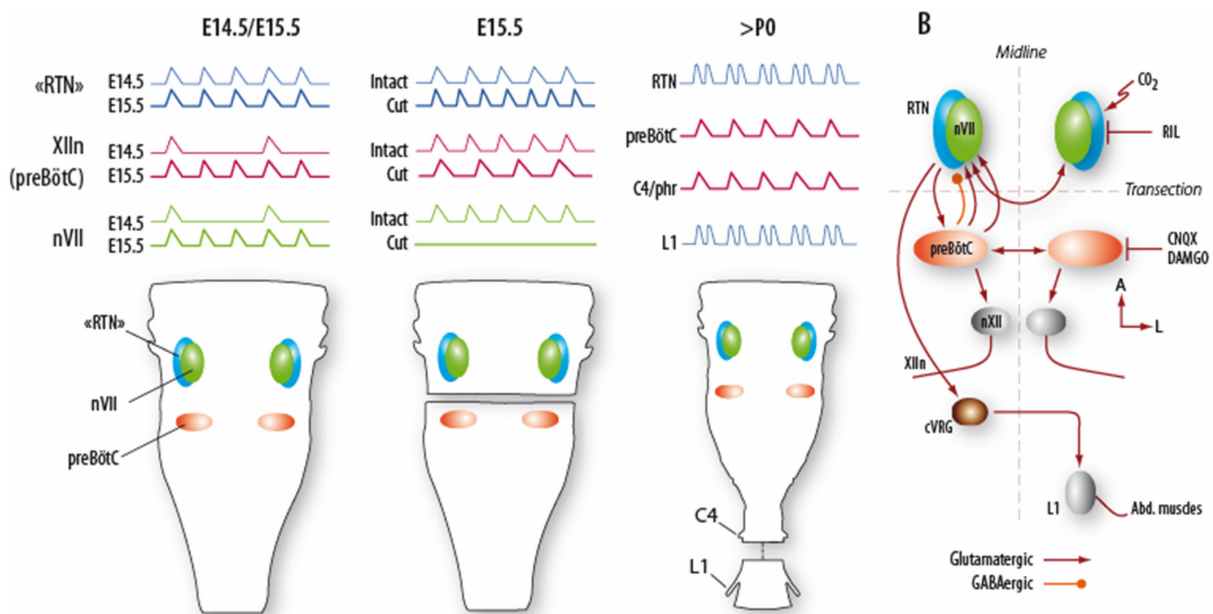


Figure 16 : développement embryonnaire et propriétés du générateur central du rythme respiratoire.

(A). L'activité rythmique apparaît tout d'abord au sein du groupe respiratoire para-facial embryonnaire (e-pF) au stade E14.5 (à gauche) mais ne se reflète que rarement sur les sorties motrices des nerfs faciaux (nVII), hypoglossaux (XIIIn) et phréniques (non représenté). Au stade E15.5, l'émergence du preBötC permet la genèse d'une activité motrice robuste. Celle-ci est vraisemblablement à l'origine des mouvements respiratoires fœtaux. La transection n'élimine pas l'activité indépendante des oscillateurs. Leurs fréquences respectives sont cependant altérées, reflétant un couplage fonctionnel. A la naissance (>P0, à droite), le preBötC génère l'activité inspiratoire, détectable sur le nerf phrénique (C4/phr) alors que le pFRG/RTN participe à la chémosensibilité et pourrait générer l'activité expiratoire détectable sur la racine abdominale L1.

(B). Représentation schématique de la connectivité au sein du réseau neuronal respiratoire embryonnaire. Les flèches peuvent représenter des connexions mono- ou poly-synaptiques. L'activité rythmique du pFRG peut être abolie par application de Riluzole (RIL), celle du preBötC par application de CNQX ou de DAMGO.

D'après «news and views» de Feldman et al., (2009) commentant Thoby-Brisson et al., (2009).

L'activité des deux oscillateurs se synchronise progressivement à partir du stade embryonnaire E14.5 où les premières activités sont détectées au sein de l'e-pF. Au niveau des sorties motrices respiratoires, l'activité rythmique est produite à une fréquence intermédiaire des fréquences intrinsèques de chaque oscillateur, reflétant l'existence d'un couplage fonctionnel. Bien qu'apparemment non suffisante à la production d'une activité rythmique motrice (voir stade E14 et résultats de cette thèse), l'activité précoce de l'oscillateur de l'e-pF jouerait un rôle essentiel dans l'entraînement du preBötC aux stades précédents la naissance, une contribution particulière exacerbée au cours des réponses aux stimuli chémosensibles.

3 - La neurotransmission inhibitrice aux stades embryonnaires

Dans la compréhension du rôle respectif joué par les deux oscillateurs aux stades embryonnaires et les différences avec les stades adultes, il est important de rappeler ici les grandes lignes du développement de la signalisation inhibitrice. L'action des neurotransmetteurs GABA et Glycine implique les récepteurs ionotropiques perméables à l'ion Chlorure (Cl^-) GABA_AR et GlyR respectivement. La conséquence de l'activation de ces récepteurs sur le potentiel de membrane est donc directement liée au potentiel d'équilibre du Cl^- , et donc au rapport des concentrations intracellulaires et extracellulaires. Aux stades matures, la concentration intracellulaire de Cl^- est largement inférieure à sa concentration extracellulaire. En conséquence l'activation des récepteurs GABA_AR et GlyR entraîne un flux d'ions vers le milieu intracellulaire et un courant sortant hyperpolarisant. En revanche, les stades embryonnaires sont caractérisés par un rapport inverse : la concentration intracellulaire est largement supérieure à la concentration extracellulaire. Les neurotransmetteurs GABA et Glycine exercent donc typiquement un effet dépolarisant sur le potentiel membranaire aux stades embryonnaires immatures (Ben-Ari et al., 1989; Owens et al., 1996; voir pour revue Owens and Kriegstein, 2002).

Le développement de la signalisation inhibitrice est donc marqué par une inversion de l'effet des neurotransmetteurs GABA et Glycine sous-tendue par une inversion concomitante du gradient de l'ion Cl^- . Il est maintenant admis que celle-ci reflète des modifications dans l'homéostasie du chlore. Plus précisément, la concentration intracellulaire est contrôlée par l'expression relative de deux protéines : le co-transporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC1) qui assure le remplissage en ions Cl^- (Rohrbough and Spitzer, 1996) et le co-transporteur $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ de type 2 (KCC2) qui l'expulse vers le milieu extracellulaire (Rivera et al., 1999). Le passage vers un

gradient mature reflète une sous-régulation du premier et l'émergence de l'expression du second (Owens and Kriegstein, 2002).

Cette maturation intervient à des stades distincts selon les structures cérébrales considérées. Il apparaît typiquement que la neurotransmission inhibitrice s'établit largement après la naissance (P9-P10) au sein de nombreuses structures du cerveau antérieur (par exemple dans l'hippocampe voir Ben-Ari et al., 1989; Cherubini et al., 1991). Elle serait acquise plus précocement à mesure que l'on considère des structures postérieures. Par exemple, dans le réseau locomoteur de la moelle épinière, la présence d'activités alternées de part et d'autre de la ligne médiane dès les stades embryonnaires suggère une maturation plus précoce (Branchereau et al., 2000; Branchereau et al., 2002). L'analyse de l'expression des co-transporteurs indique que cette maturation serait initiée à partir du stade E14.5 et se poursuivrait après la naissance (Delpy et al., 2008; Stil et al., 2009).

Au sein du réseau respiratoire, peu d'études ont adressé l'émergence de la neurotransmission inhibitrice à proprement parler. Les résultats sont encore divergents en raison notamment des différentes approches expérimentales mises en œuvre. Par exemple, sur des préparations réduites de tranche transversale de preBötC, Ritter et al. (2000) rapportent que le GABA exerce une action dépolarisante jusqu'au stade postnatal P4 chez la souris. En revanche, sur des préparations de tronc cérébral isolé, Ren and Greer (2006) suggèrent une transition plus précoce, à la fin de l'embryogenèse (E19 chez le rat). Ces résultats s'accordent néanmoins pour affirmer qu'au stade de son émergence, et vraisemblablement jusqu'aux stades précédant immédiatement la naissance, les neurotransmissions GABAergique et Glycinergique exercent encore une action dépolarisante. L'absence d'inhibition à proprement parler se manifeste par des activités parfaitement synchronisées entre les deux oscillateurs. Il est vraisemblable que la genèse d'activités plus élaborées, comprenant notamment les phases inspiratoires, post-inspiratoires et expiratoires, repose sur une connectivité inhibitrice entre les oscillateurs et ne peut apparaître qu'après maturation du gradient chlore.

4 - Pathologies respiratoires congénitales

De nombreuses pathologies respiratoires congénitales, donc acquises à la naissance, semblent liées à un défaut de développement des centres nerveux assurant la modulation ou la genèse de l'activité rythmique respiratoire (voir la revue de Bianchi and Sieweke, 2005). Il semble dès lors évident que l'identification des étapes de la mise en place du générateur

respiratoire pendant l'embryogenèse pourrait ouvrir la voie à la compréhension de l'origine de ces pathologies et conduire à des avancées thérapeutiques ciblées.

Aux Etats-Unis, le syndrome de mort subite du nourrisson (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS) est la première cause de mortalité entre 1 et 12 mois. Typiquement, le nourrisson est retrouvé subitement mort pendant la nuit, malgré l'absence de signes avant-coureurs. Dès 1987, l'implication d'un défaut de régulation du système cardiorespiratoire par le tronc cérébral était suggérée (Hunt and Brouillette, 1987). En particulier, des défauts des systèmes sérotoninergiques ont été décrits dans différentes régions impliquées dans le contrôle respiratoire (Kinney et al., 2009). Ils pourraient refléter une atteinte des systèmes chémosensibles et une incapacité fatale d'adaptation en réponse à l'asphyxie, l'hypoxie ou l'hypercapnie. Par ailleurs, l'identification du rôle crucial joué par le preBötC chez l'animal de laboratoire a suscité la recherche de cette structure chez l'homme. Lavezzi et Maturri (2008) ont montré qu'une région du tronc cérébral ventral, caractérisée par une abondance de neurones exprimant NK1R et Sst, était absente ou largement réduite chez les bébés vraisemblablement décédés du SIDS par rapport à ceux dont la mort n'était pas liée à des défauts respiratoires. Un défaut de développement serait à l'origine de ce déficit cellulaire. Cette étude est à ma connaissance la seule qui rapporte chez l'homme la présence d'une structure assimilable au preBötC, liée à une pathologie dramatique. En résumé, bien que clairement multifactoriel, le syndrome de mort subite du nourrisson pourrait résulter de défauts de développement du réseau neuronal respiratoire, incluant une structure réminiscente du preBötC, pendant l'embryogenèse. A l'heure actuelle, seuls quelques rares cas ont été associés à une origine génétique (Blanchi and Sieweke, 2005).

Evoquons par ailleurs le cas du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (ou Congenital Central Hypoventilation Syndrome, CCHS) aussi connu sous le nom de syndrome d'Ondine. Cette maladie rare (1 cas sur 100 000) et incurable se manifeste par l'incapacité à respirer de façon autonome durant les périodes de sommeil, les périodes infectieuses et parfois les périodes de stress ou de grande fatigue. Ces troubles sont liés à un défaut d'adaptation de la commande centrale ventilatoire à la baisse de pression partielle d'O₂ (hypoxie) et à la rétention de CO₂ (hypercapnie). A ces moments, une ventilation mécanique est obligatoire. Récemment, une origine génétique a été identifiée : plus de 80% des patients portent une mutation au sein du gène Phox2b. Dès lors, une lignée portant la mutation humaine la plus courante, une extension de 7 résidus Alanine sur la du gène Phox2b, a été générée et étudiée (Phox2b^{27Ala} ; Dubreuil et al., 2008). De manière intéressante, ces animaux présentent

des troubles respiratoires semblables à ceux des patients Ondine. En particulier, des enregistrements *in vivo* à la naissance révèlent que leur respiration est anormalement irrégulière et ne s'adapte pas à une augmentation de CO₂ (milieu hypercapnique). L'origine central du déficit a été ensuite démontrée par des enregistrements *in vitro* (Dubreuil et al., 2009). L'activité motrice respiratoire enregistrée sur les racines C4 est totalement insensible à des variations du pH du milieu de perfusion, destinées à mimer une situation hypercapnique. A l'échelle neuroanatomique, la mutation résulte en l'absence des cellules NK1R⁺/Phox2b⁺ de l'oscillateur e-pF aux stades embryonnaires. Ainsi ces souris modèles nous informent que les défauts respiratoires associés au syndrome d'Ondine seraient sous-tendus par un défaut de développement de l'oscillateur respiratoire para-facial, normalement impliqué dans les processus de chémosensibilité.

Enfin, des maladies génétiques, telles que le syndrome de Rett, l'hypoventilation alvéolaire congénitale et la maladie de Hirschsprung, souvent associées à des problèmes respiratoires, seraient liées à des mutations des gènes codant pour des neurotrophines ou leurs récepteurs (Gaultier et al., 2004).

L'identification des relations entre altérations centrales et défauts de développement d'origine génétique est un enjeu majeur. Les études chez l'embryon permettent de caractériser des phénotypes fonctionnels autrement délétères à la naissance, ou partiellement compensés par des mécanismes d'adaptation. Elles aboutissent à de nouveaux modèles animaux de pathologies humaines, à l'identification de sous-groupes neuronaux d'importance vitale, ainsi qu'à la dissection fonctionnelle des relations existantes entre les différentes structures essentielles à l'élaboration du rythme respiratoire.

IV. LA NEUROBIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT POUR L'ÉTUDE DES RÉSEAUX NEURONAUX

Au cours des dix dernières années, de plus en plus d'équipes se sont tournées vers la neurobiologie du développement pour disséquer le fonctionnement et l'architecture du réseau retenant leur intérêt. La description des mécanismes moléculaires qui assurent la production de sous-types neuronaux distincts pendant l'embryogenèse a ainsi beaucoup apporté à la neurophysiologie. Il est notamment apparu que chaque type neuronal différencié i) est produit à un stade bien précis et à partir de cellules progénitrices situées en une position particulière du système nerveux en développement, et ii) acquiert ses propriétés fonctionnelles en réponse à l'activation de cascades géniques qui lui sont caractéristiques et initiées au sein des progéniteurs.

Dans de ce chapitre, je détaillerai tout d'abord les grands principes de signalisation selon l'axe dorso-ventral du tube neural qui aboutissent à la production de types neuronaux variés. Dans la mesure du possible, j'illustrerai les propos en prenant exemple sur le CPG locomoteur, dont la dissection génétique des constituants cellulaires est bien avancée. Nous évoquerons ensuite les mécanismes qui contrôlent la connectivité des neurones post-mitotiques, en prenant l'exemple de la connectivité commissurale. Enfin, nous présenterons les connaissances actuelles et les interrogations sur les mécanismes développementaux aboutissant à la formation des neurones constitutifs du réseau neuronal générateur du rythme respiratoire.

1 - Développement précoce et acquisition du destin neural

Bien avant l'émergence des types cellulaires qui vont former le cerveau et la moelle épinière se met en place une polarité au sein de l'embryon. Elle dérive de l'étape de gastrulation, cette invagination de l'embryon en développement, qui produit les trois feuillets cellulaires dont va dériver l'ensemble des structures de l'organisme : la couche externe ou ectoderme, la couche intermédiaire ou mésoderme, et la couche interne ou endoderme. La position du mésoderme et de l'endoderme en cours d'invagination définit deux des principaux axes des vertébrés : l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral. La gastrulation induit aussi

la formation de la notochorde, un cylindre de cellules mésodermes qui s'étend le long de l'axe antéro-postérieur et définit la ligne médiane embryonnaire ; c'est alors l'axe médio-latéral, principal axe de symétrie de l'ensemble de l'organisme, qui s'établit.

Le système nerveux central va se former à partir de l'ectoderme situé juste au-dessus de la notochorde, lors de l'étape dite de neurulation (Figure 17). Des signaux en provenance de la notochorde induisent la différenciation des cellules de l'ectoderme médian, dès lors nommé neurectoderme, en des cellules souches neurales, les précurseurs neuraux. Parallèlement, le neurectoderme contenant ces cellules s'épaissit et forme la plaque neurale. Les bords latéraux de la plaque neurale, ou bourrelets neuraux, vont se soulever en progressant de la partie moyenne de l'embryon vers les deux extrémités (Figure 17B). Ainsi se forme la gouttière neurale dont l'approfondissement entraîne le rapprochement des bords. La gouttière neurale commence alors à se fermer pour donner naissance au tube neural, forme embryonnaire de l'ensemble du système nerveux central (Figure 17C). Le tube neural est effilé dans sa partie moyenne qui donnera naissance à la moelle épinière. En revanche, il est plus volumineux dans sa partie céphalique où il se boursoufle dès sa formation en trois vésicules : le prosencéphale d'où dériveront les hémisphères cérébraux, ganglions de la base, thalamus, hypothalamus et rétine ; le mésencéphale qui donnera les pédoncules cérébraux avec les relais des voies optiques et le noyau oculomoteur ; le rhombencéphale qui est à l'origine du tronc cérébral. Ce dernier renflement donnera d'une part le métencéphale, qui se différenciera en pont et, avec la partie postérieure du mésencéphale, en cervelet, et d'autre part le myélencéphale, qui donnera le bulbe rachidien. La plupart des nerfs crâniens (4n à 12n) se situent dans le rhombencéphale.

Parallèlement à la formation de ces 3 vésicules, le tube neural subit des étapes de régionalisation anatomiques et géniques qui vont contrôler la production des classes variées de neurones en des positions bien spécifiques. L'ensemble des cellules neurales (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) sont dérivées des précurseurs neuraux, induits au sein du neurectoderme par les signaux de la notochorde. Rapidement, les précurseurs neuraux vont être soumis à un environnement de signaux inducteurs particulier en fonction de leur position vis-à-vis des sources de ces signaux. Cette information positionnelle va progressivement diminuer le potentiel développemental des précurseurs vers des destins neuraux particuliers. Le tube neural se régionalise donc le long de l'axe antéro-postérieur et de l'axe dorso-ventral, en territoires de cellules prolifératrices ayant acquis une identité positionnelle : on parle dès lors de progéniteurs neuraux. Ces derniers vont rapidement donner naissance à des neurones

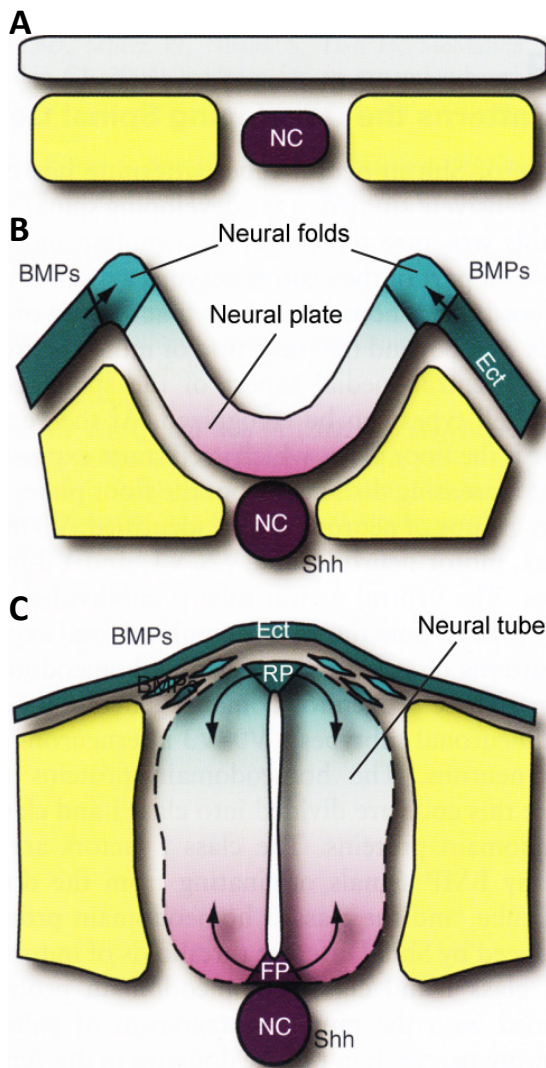


Figure 17 : représentation schématique de l'étape de neurulation.

(A). Le système nerveux central se forme à partir de l'ectoderme (en gris) situé juste au dessus de la notochorde.

(B). La plaque neurale (neural plate) se forme en réponse aux signaux ventralisants (notamment Sonic Hedgehog, Shh) en provenance de la notochorde (NC) et aux signaux dorsalisants (notamment les Bones Morphogenic Proteins, BMPs) de l'ectoderme de surface (Ect), puis s'invagine. Les bourrelets neuraux (neural folds) se soulèvent formant la gouttière neurale.

(C). Le tube neural (neural tube) est formé par le rapprochement des bourrelets neuraux. Dès lors, les morphogènes Shh et BMPs sont essentiellement sécrétés par la plaque du plancher (floor plate, FP) et la plaque du toit (roof plate, RP) respectivement.

Les dégradés colorés représentent le gradient de la concentration de Shh (violet) et BMPs (vert).

Adapté de H. Roelink, dans *Developmental Neurobiology* de Greg Lemke (editeur).

post-mitotiques, les neuroblastes, qui vont quitter la zone ventriculaire, migrer vers leur position finale et se différencier en neurones dotés des propriétés et de la morphologie adaptées à la fonction qu'ils ont été instruits, précocement, d'exercer. Nous allons maintenant décrire les

mécanismes qui s'opèrent le long du rhombencéphale pour aboutir à cette régionalisation en progéniteurs et à la production des types neuronaux variés.

2 - Les morphogènes

Le modèle actuel considère que les progéniteurs neuraux acquièrent une « identité régionale » ou « positionnelle » en fonction de leur position selon les deux grands axes du tube neural : l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral. Cette identité leur est conférée par l'exposition à des facteurs de signalisation émis localement le long de ces deux axes, et se manifeste par l'expression de facteurs de transcription caractéristiques d'une position donnée. Il en résulte l'activation de cascades d'expression génique qui restreignent, au cours des divisions cellulaires suivantes, le potentiel développemental des progéniteurs et qui aboutissent *in fine* à l'acquisition de caractéristiques phénotypiques nécessaires à la réalisation d'une fonction physiologique précise. Des signaux capables d'induire une telle

« transformation » des progéniteurs en neurones différenciés et fonctionnellement distincts les uns des autres sont appelés morphogènes.

Il semble qu'un faible nombre de facteurs participent à la régionalisation du tube neural selon les deux axes. Il a ainsi été proposé qu'ils agissent selon un gradient de concentration qui s'établirait par diffusion, selon le modèle dit du « drapeau français » (Figure 18). Cette hypothèse a été récemment remise en cause en raison de la faible capacité de diffusion des morphogènes, et des mécanismes alternatifs de diffusion facilitée et/ou de transport sont invoqués. Il n'en demeure pas moins que le concept d'induction d'une identité neurale au sein des progéniteurs en fonction de leur position au sein du tube neural, et donc vis-à-vis d'une ou plusieurs sources de morphogènes, reste un mécanisme fondamental pour expliquer la diversité neuronale. Quels que soient les mécanismes sous-tendant la diffusion ou le transport des morphogènes, nous emploierons le terme de gradient dans l'ensemble de ce document.

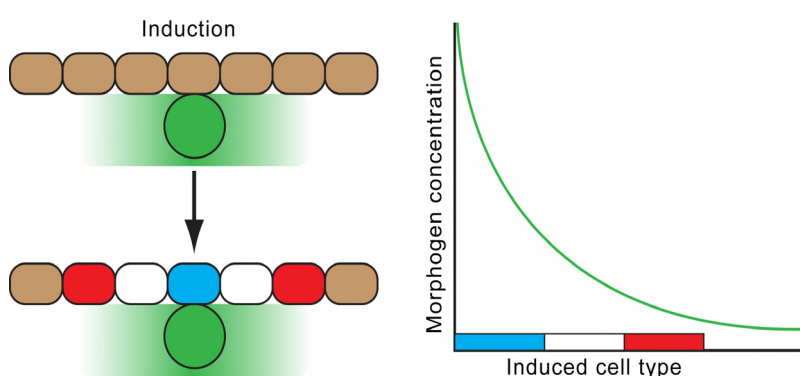


Figure 18 : diagramme illustrant l'action des morphogènes.

Un gradient de morphogène (vert) s'établit depuis sa source le long de la plaque neurale, dont les cellules sont schématisées sur l'image de gauche par les rectangles. La différenciation vers des types cellulaires distincts (bleu, blanc et rouge) dépend de la concentration locale de morphogène.

3 - La signalisation dorso-ventrale

La signalisation selon l'axe dorso-ventrale est particulièrement étudiée dans la moelle épinière en raison de l'organisation topologique et stéréotypique des différents types neuronaux qui s'y trouvent : les neurones impliqués dans l'intégration des processus sensoriels sont localisés dorsalement, alors que les circuits moteurs sont principalement concentrés ventralement. Ainsi, à chaque position le long de l'axe dorso-ventral semble apparaître un type neuronal physiologiquement et anatomiquement caractéristique de cette position. Il est maintenant admis que cette régionalisation des neurones post-mitotiques est consécutive à la régionalisation, pendant l'embryogenèse, des progéniteurs neuronaux de la zone ventriculaire.

Les progéniteurs situés en une position donnée selon l'axe dorso-ventral interprètent la

concentration de morphogène à laquelle ils sont soumis par l'expression, souvent transitoire, d'une combinaison unique de facteurs de transcription. Le tube neural est ainsi régionalisé selon l'axe dorso-ventral en différents territoires, ou domaines, de progéniteurs, ayant chacun une signature moléculaire distincte (Figure 19A). Celle-ci est à l'origine des cascades d'expression géniques aboutissant à la différenciation vers un type cellulaire déterminé. Il s'établit ainsi le long de l'axe dorso-ventral 11 domaines de progéniteurs donnant naissance à au moins autant de types de neurones post-mitotiques. Ces derniers seront aussi caractérisés par l'expression de facteurs de transcription caractéristiques. On parlera alors d'identité et d'origine des neurones produits, en référence à leur signature moléculaire et au domaine de progéniteurs leur ayant donné naissance, respectivement. Ces deux notions définissent le type neuronal, au sens développemental du terme, et sont récapitulées dans la nomenclature actuellement en vigueur. On regroupe les progéniteurs en domaines dorsaux (du plus dorsal au plus ventral : dp1 à dp6 ou, selon les nomenclatures, dA1 à dA4 puis dB1 à dB4) et ventraux (p0, p1, p2, pMN et p3 du plus dorsal au plus ventral), spécifiés indépendamment (Yamada et al., 1991; Ericson et al., 1992; Liem et al., 1995; Liem et al., 1997). Les domaines dorsaux sont induits par des morphogènes dits dorsalisants appartenant à la famille des Bone Morphogenic Proteins (BMPs), des Facteurs de Croissance Fibroblastiques (FGFs) et des protéines Wnts (notamment *Wnt1* et *Wnt3a*). Ces signaux proviennent de l'ectoderme épidermal avant la fermeture du tube neural, puis de la plaque du toit, un lignage glial particulier de la ligne médiane dorsale formé pendant la fermeture du tube neural. Les domaines ventraux (Figure 19A) sont induits par la protéine sécrétée Sonic hedgehog (Shh) (Patten and Placzek, 2000), en provenance successivement de la notochorde, groupe cellulaire du mésoderme axial, puis des cellules de la plaque du plancher.

Compte-tenu de notre hypothèse d'une origine ventrale des neurones du preBötC (voir résultats), nous limiterons ici la description à la production des types neuronaux dans les domaines ventraux.

3.1 - L'interprétation des morphogènes : exemple dans les domaines ventraux

3.1.1 - La régionalisation en domaines de progéniteurs ventraux

L'interprétation du gradient de Shh par les progéniteurs passe par l'expression d'une combinaison de protéines à homéodomaine spécifique à chaque domaine (Figure 19B). Ces protéines peuvent être classées en deux grands groupes en fonction de leur patron d'expression et leur régulation par Shh (Briscoe et al., 2000). Pour chaque protéine de la classe I, il existe un

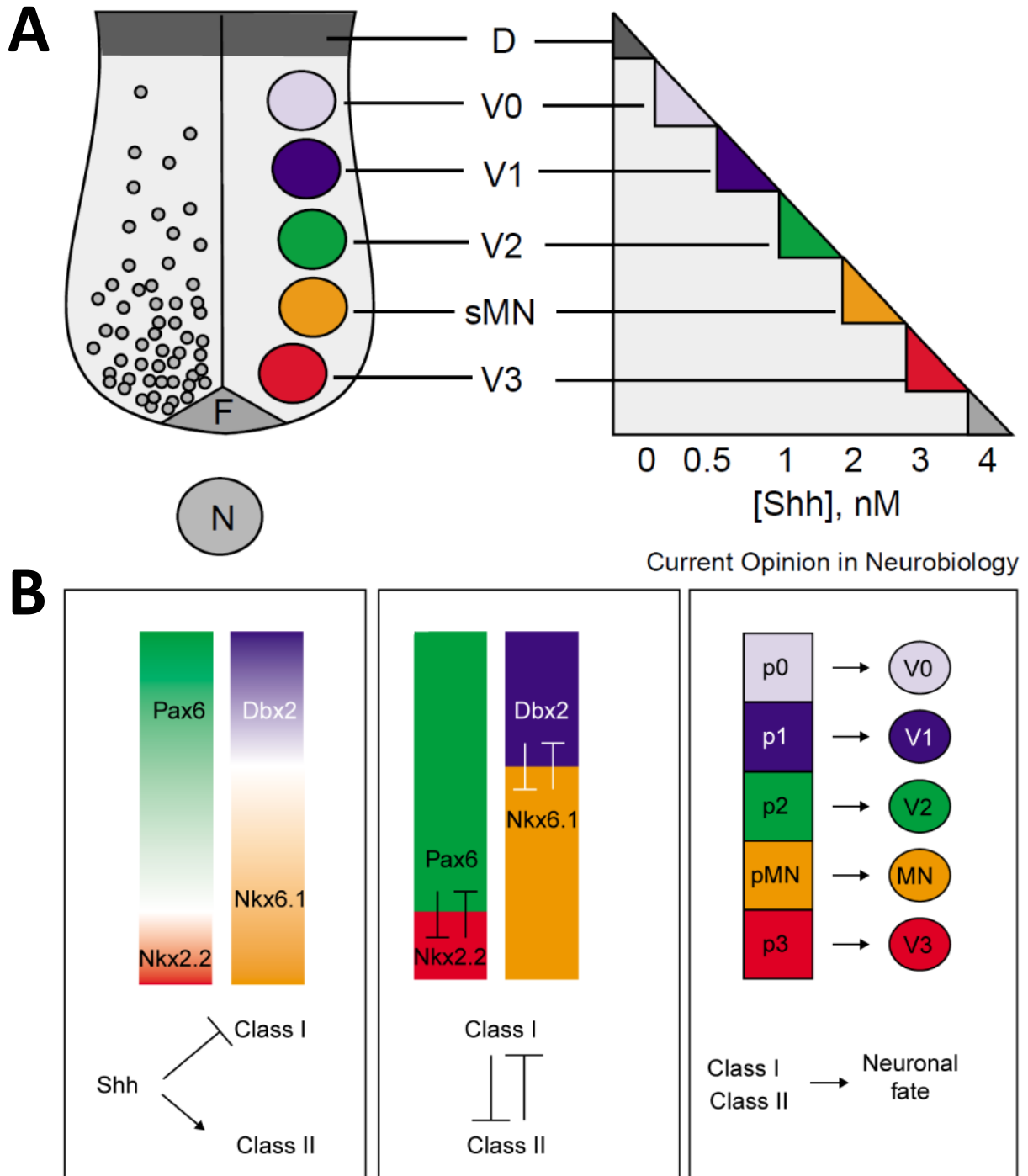


Figure 19 : génération des sous-types neuronaux ventraux en réponse à l'action graduelle de Shh.

(A). Vue transversale schématique de la moitié ventrale du tube neural. Le morphogène Shh est exprimé par la notochorde (N) et la plaque du plancher (F). Les sous-types neuronaux ventraux (V0, V1, V2, MNs et V3) sont générés à des positions distinctes de l'axe dorso-ventral, chacune associée à une concentration spécifique de Shh. D : dorsal.

(B). Modèle à trois phases expliquant l'interprétation du gradient de Shh dans les domaines ventraux.

A gauche : l'action graduelle de Shh est à l'origine de l'expression restreinte de gènes de Classe I (réprimés par Shh) et de Classe II (induits par Shh). Au milieu : des interactions réciproques entre gènes de la Classe I et de la Classe II adjacents raffine les frontières entre domaines adjacents de progéniteurs. A droite : le profil d'expression des gènes de Classe I et de Classe II au sein des progéniteurs (p0, p1, p2, pMN, p3) contrôle la production des différents neurones en différenciation (V0, V1, V2, MN, V3).

D'après Briscoe and Ericson, 2001.

seuil de concentration de Shh au-dessus duquel l'expression est réprimée. Par conséquent, la limite ventrale de leur expression participe à la délimitation des domaines de progéniteurs. A l'inverse, l'expression de chaque protéine de la classe II est induite à partir d'une concentration seuil de Shh. Par conséquent, la limite dorsale de leur expression participe à la délimitation des domaines de progéniteurs. En outre, des mécanismes de répression croisée participent au renfort des frontières entre domaines adjacents. Plus précisément, les paires de protéines complémentaires de la classe I et de la classe II, c'est-à-dire qui bordent un domaine de progéniteurs commun, se répriment mutuellement. Par exemple, la frontière dorsale du domaine p3 est définie par la limite de l'expression de Pax6 et le début de l'expression de Nkx2.2 (Figure 19B). La perte de fonction de Pax6 résulte en une expansion dorsale du territoire d'expression de Nkx2.2 (Ericson et al., 1997). Ces deux protéines interagissent négativement entre elles pour assurer l'affinement de la frontière avec le territoire adjacent, pMN. On suppose que les mécanismes de répression mutuelle entre protéines de classe I et II participent à l'établissement de tous les domaines de progéniteurs ventraux.

3.1.2 - L'exemple du domaine p0 et des interneurones V0

La spécification de l'identité des sous-types de neurones post-mitotiques semble directement résulter de l'activité des protéines de classe I et II au sein de chaque domaine de progéniteurs. Dans la moelle épinière, les domaines p3, p2, p1 et p0 donnent naissance à différentes classes d'interneurones, respectivement V3, V2, V1 et V0. Le domaine pMN produit les motoneurones.

Le domaine de progéniteurs p0, le plus dorsal des domaines ventraux, définit la région dite intermédiaire du tube neural (Figure 20). Il est caractérisé par l'expression de Dbx1 et de Dbx2, bien que seul le premier lui soit spécifique (Pierani et al., 1999; Pierani et al., 2001). La signalisation de Shh est suffisante pour induire des progéniteurs p0, mais elle n'est pas pour autant requise (Pierani et al., 1999). Chez les animaux privés de la protéine Shh (*Shh*^{-/-}) des progéniteurs p0 et des interneurones V0 sont produits en quantité normale, mais ces derniers sont positionnés dans la partie la plus ventrale du tube.

Les progéniteurs Dbx1⁺ produisent les interneurones de la classe V0, initialement définis par l'expression de Evx1 (Pierani et al., 1999). Il est ensuite apparu que le domaine p0 est segmenté en deux sous-domaines, distingués par l'expression du gène Pax7 (Figure 20D). Celui-ci est exprimé uniquement par les progéniteurs situés dans la partie la plus dorsale du domaine Dbx1⁺ (Pierani et al., 2001). En conséquence, la classe V0 comporte au moins deux sous-groupes neuronaux : ceux (V0_V) nés dans le sous-domaine ventral et ceux (V0_D) produits

par le sous-domaine dorsal. L'expression de *Evx1* serait sélective de la classe $V0_V$ (Moran-Rivard et al., 2001; Pierani et al., 2001). Par la suite, des animaux génétiquement modifiés (animaux hétérozygotes de la lignée *Dbx1^{LacZ}*, Figure 20, voir matériels et méthodes) pour exprimer la protéine rapporteur β -Galactosidase (β -Gal) sous le contrôle du promoteur de *Dbx1* ont été produits (Pierani et al., 2001). La β -Gal, adressée au noyau, persiste après l'extinction de *Dbx1* à la sortie du cycle cellulaire. Cette lignée permet de suivre les interneurons $V0$ bien après leur spécification. Il est ainsi apparu qu'ils migrent selon deux grands axes (Lanuza et al., 2004). La majeure partie d'entre eux est retrouvée dans la région ventrale de la moelle épinière, alors qu'une fraction plus faible, majoritairement gliale, peuple la région intermédiaire (Lanuza et al., 2004). Enfin, des interneurons $V0$ exprimant le facteur de transcription *Pitx2* ont été identifiés très récemment (Zagoraïou et al., 2009). Produits en très faible nombre et positionnés dans la région intermédiaire à proximité du canal central, ils représentent la seule source de terminaisons cholinergiques de type « bouton C » faisant synapse sur les motoneurons. Les auteurs proposent le terme de $V0_C$ pour y faire référence.

Toujours dans la moelle épinière, l'essentiel des interneurons $V0$ envoie des projections axonales commissurales qui traversent la ligne médiane ventrale (Moran-Rivard et al., 2001; Lanuza et al., 2004). Majoritairement inhibiteurs, ils joueraient un rôle clé dans les mécanismes d'inhibition réciproque à l'origine de l'alternance bilatérale des décharges qui gouvernent l'activité locomotrice.

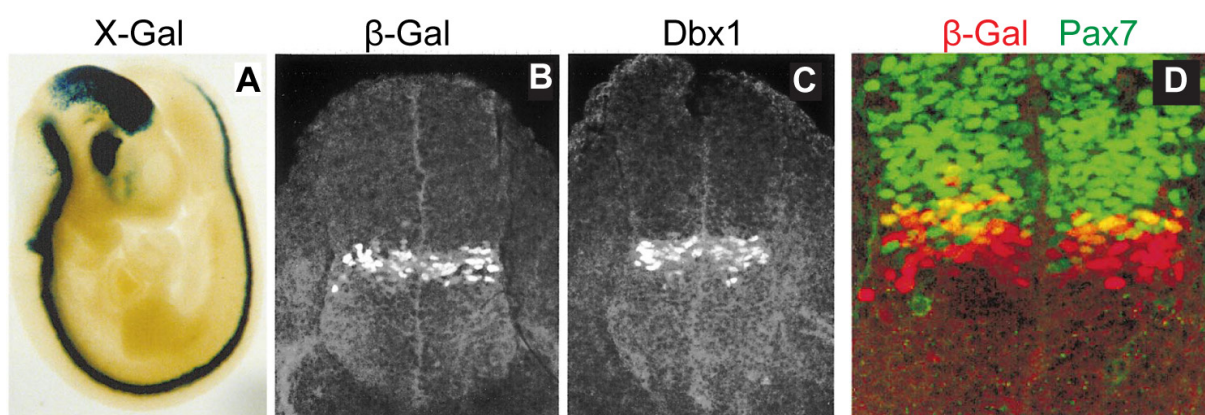


Figure 20 : les progéniteurs exprimant *Dbx1* définissent le domaine $p0$.

(A). Territoires d'expression de *Dbx1* rapportés par l'activité du gène *LacZ* sur un embryon hétérozygote de la lignée *Dbx1^{LacZ}*.

(B,C,D). Sections transversales de moelle épinière d'un embryon hétérozygote de la lignée *Dbx1^{LacZ}* au stade E10.5. L'expression de la protéine β -Galactosidase (β -Gal, B,D) codée par *LacZ* rapporte fidèlement celle de la protéine *Dbx1* (C) qui définit le domaine de progéniteurs $p0$. Celui-ci est sous-divisé (D) en une partie dorsale ($Pax7^+$) et une partie ventrale ($Pax7^-$).

D'après Pierani et al., 2001.

Les animaux homozygotes de la lignée *Dbx1^{LacZ}* constituent des mutants nuls pour *Dbx1*, chez lesquels la protéine n'est pas produite (Pierani et al., 2001). Il en résulte la disparition du domaine p0 et des interneurons V0 comme en témoigne notamment l'absence de cellules *Evx1⁺*. Pour autant l'expression de la β -Gal persiste au sein de progéniteurs et de neurones post-mitotiques, mais qui présentent une signature moléculaire caractéristique d'interneurones issus de domaines adjacents (Figure 21). Ainsi, les progéniteurs privés d'un gène nécessaire à leur identité ne sont pas éliminés, mais acquièrent celle d'un domaine adjacent. Ce phénomène, qualifié de respécification, illustre les mécanismes de répression croisée entre domaines déjà évoqués plus haut et s'applique *à priori* à l'intégralité des progéniteurs et des types neuronaux. Des mécanismes similaires agissent à l'échelle des neurones post-mitotiques pour maintenir l'identité neuronale. En effet, les interneurons V0 privés d'une protéine *Evx1* fonctionnelle adoptent une identité V1 (Moran-Rivard et al., 2001). L'ensemble de ces observations témoigne du rôle essentiel joué par les facteurs de transcription au sein des progéniteurs et des neurones post-mitotiques pour l'acquisition et le maintien, respectivement, de l'identité neuronale.

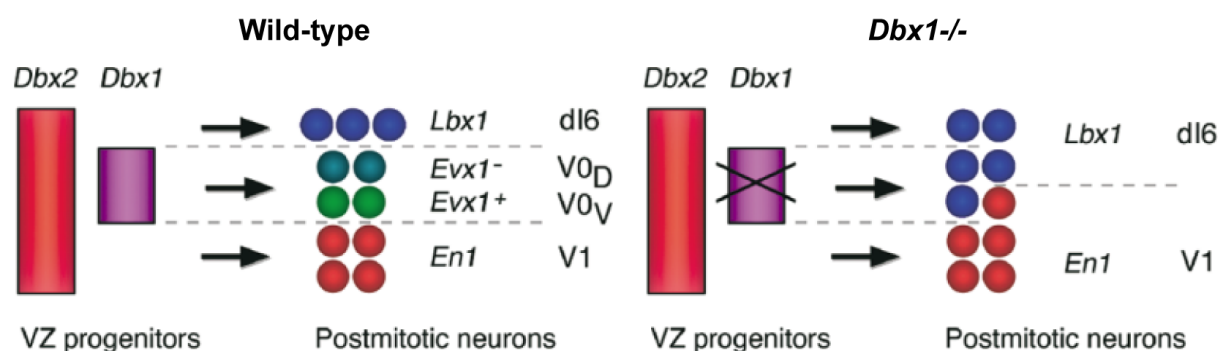


Figure 21 : respécification des interneurons V0 en l'absence de *Dbx1*.

Chez les animaux contrôles (Wild-type, à gauche) les progéniteurs *Dbx1*-positifs de la zone ventriculaire (VZ progenitors) donnent naissance aux interneurons post-mitotiques V0 ventraux ($V0_V$) et dorsaux ($V0_D$). En l'absence de *Dbx1* (*Dbx1*^{-/-}, à droite), ces deux populations d'interneurones sont respécifiées et adoptent respectivement une signature moléculaire caractéristique de neurones issus du domaine immédiatement ventral (identité V1, *En1*⁺) et du domaine immédiatement ventral (identité dI6 ou dB4, *Lbx1*⁺).

D'après Lanuza et al., 2004.

3.2 - Des mécanismes retrouvés dans le rhombencéphale

La spécification des types neuronaux dans le rhombencéphale repose sur des mécanismes essentiellement comparables à ceux décrits dans le tube neural caudal. Les exceptions évidentes concernent les domaines donnant naissance aux motoneurons. Le domaine p3 est ainsi topologiquement remplacé par le domaine pMNV qui donne naissance

aux motoneurones branchiaux (innervant le muscle strié issu des arcs branchiaux) et viscéraux (innervant le muscle lisse viscéral) (Pattyn et al., 2004), tous deux caractérisés par l'expression des facteurs de transcription *Islet1* et *Phox2b* (Takahashi et Osumi, 2002). D'autre part, le correspondant topologique du domaine pMN de la moelle est noté pMNs dans le rhombencéphale ; il donnera naissance aux motoneurones somatiques (innervant le muscle strié issu des somites), caractérisés par l'expression de *Islet2*, *Hb9* et *MNR2*. De plus, les sous-types neuronaux induits varient selon les niveaux axiaux du rhombencéphale également en raison de variations d'expression des gènes de différenciation neuronale selon l'axe antéro-postérieur. Par exemple, les rhombomères r2-r4 donnent naissance à des motoneurones branchiaux et viscéraux et les rhombomères plus postérieurs donnent naissance à des motoneurones branchiaux, viscéraux et somatiques.

4 - Signalisation dorso-ventrale et neurophysiologie

4.1 - Les CPGs : un modèle de choix

On connaît maintenant bon nombre des gènes codant pour des acteurs moléculaires à l'origine de la différenciation des neurones en sous-types fonctionnels dotés de propriétés et d'une connectivité particulière. Les outils de la génétique chez l'animal de laboratoire permettent de les manipuler sélectivement. Une quantité de lignées murines portant des mutations variées sur des gènes de développement sont maintenant disponibles. Ces mutations vont de l'invalidation, résultant typiquement en la non-différenciation d'un sous-type neuronal particulier, en passant par l'insertion de séquences codantes pour des protéines fluorescentes qui permettent le suivi de descendants cellulaires issus de progéniteurs particuliers, jusqu'à, plus récemment, celles interférant avec la connectivité ou l'activité. Tous ces outils sont mis à la disposition du neurophysiologiste pour étudier le fonctionnement des réseaux neuronaux par une approche non invasive et hautement sélective.

L'étude du fonctionnement des réseaux neuronaux rythmogènes, les CPGs, a particulièrement bénéficié des connaissances en neurobiologie du développement. Ils présentent en effet une structure relativement simple comparée aux réseaux du cerveau antérieur contrôlant des fonctions plus élaborées. Ceci facilite l'identification des neurones à l'origine de leur activité et la dissection du schéma de connectivité. D'autre part, il s'agit d'un ensemble de neurones confiné spatialement, et qui produit une activité spontanée même isolé *in vitro*. Les études en dehors de l'animal sont donc possibles permettant de s'affranchir, dans

un premier temps, de la contribution des entrées sensorielles ou des boucles de régulation. Dans ces conditions, l'activité produite est robuste et d'éventuelles altérations fonctionnelles sont facilement mesurables. Les neurones constitutifs sont en outre facilement accessibles à l'expérimentateur. Par ailleurs, l'activité des CPGs au sein de l'animal intact commande la réalisation d'un comportement stéréotypé souvent vital (locomotion, nage, respiration). Il n'est donc pas surprenant que la plupart des CPGs deviennent actifs précocement au cours du développement embryonnaire. Il est ainsi possible de caractériser l'origine mécanistique des dysfonctionnements associés à une létalité post-natale. Parallèlement, des mutations affectant les programmes génétiques développementaux sont souvent associées à des pathologies congénitales d'origine centrale. Nous avons mentionné le cas du syndrome d'hypoventilation alvéolaire congénitale ou syndrome d'Ondine (CCHS). L'identification du rôle qu'ils jouent sur la mise en place des réseaux neuronaux promet ainsi des retombées importantes dans le domaine de la neurophysiopathologie. Enfin, l'assemblage des CPGs pendant l'embryogenèse semblant reposer sur les mêmes principes que celui de réseaux plus complexes, ils constituent un modèle de choix pour l'étude de l'organisation des réseaux neuronaux en général.

4.2 - Exemples concrets au sein du CPG locomoteur

L'activité qui gouverne les mouvements de marche chez les mammifères est générée par un ensemble neuronal qualifié de CPG locomoteur. Des études fonctionnelles indiquent que le cœur du générateur est localisé dans la moelle épinière ventrale au niveau des couches (« lamina ») VII et VIII (Figure 22, Barajon et al., 1992; Lanuza et al., 2004; Dai et al., 2005). En outre d'être capable de générer un rythme, ce réseau doit assurer que l'activité est alternée i) bilatéralement entre les deux côtés de la moelle, et ii) ipsilatéralement, entre les niveaux axiaux chargés d'innervier les muscles flexeurs et extenseurs. Ce CPG fait l'objet des très nombreuses études développementales qui ont largement contribué à disséquer le rôle fonctionnel de chacun de ses constituants cellulaires. Il en ressort notamment que les couches VII et VIII renferment l'essentiel des sous-types neuronaux d'origine ventrale, et que chacun d'eux contribue à un trait spécifique du comportement (Figure 22). Loin d'avoir l'ambition d'une revue sur l'architecture de ce CPG (voir pour cela Goulding and Pfaff, 2005; Goulding, 2009; Garcia-Campmany et al., 2010) ce chapitre va présenter les travaux les plus significatifs, et notamment ceux qui ont fait appel à des approches comparables à celles développées dans cette thèse. Les similarités des mécanismes développementaux et des types cellulaires produits au sein du tube neural caudal et du rhombencéphale font de ces travaux des bases précieuses pour entreprendre la dissection génétique du réseau respiratoire.

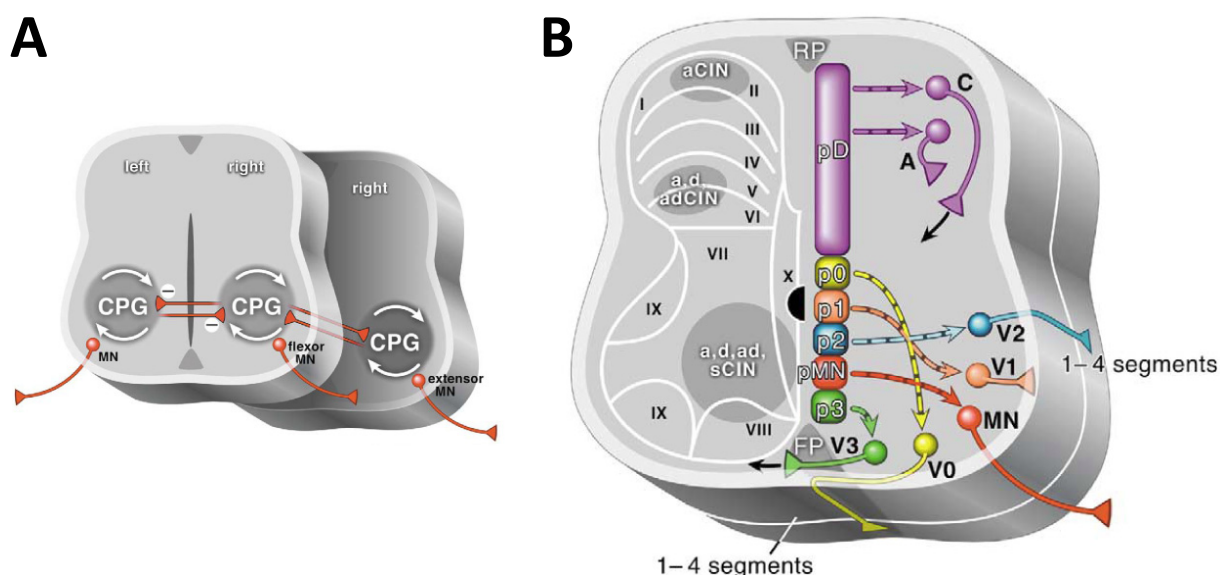


Figure 22 : représentations schématiques de l'organisation cellulaire du CPG locomoteur et des sous-types neuronaux ventraux dans la moelle épinière.

(A). L'activité rythmique à l'origine du comportement locomoteur est générée par un réseau neuronal de la moelle épinière ventrale qualifié de CPG. Des inhibitions réciproques entre les CPGs droits et gauches assurent l'alternance des activités. Des connexions inter-segmentaires coordonnent l'activité des flexeurs et extenseurs générées à différents niveaux axiaux.

(B). Vue schématique d'une coupe transversale de moelle épinière. La partie droite résume la position et la connectivité des différents types neuronaux (V0 à V3, MNs) dérivés des progéniteurs ventraux (p0 à p3, pMN). La moitié gauche illustre la position générale des différents types interneurons commissuraux (CINs) : ascendants (a), descendants (d), ascendants-descendants (ad) et segmentaires (s).

D'après Goulding and Pfaff, 2005.

Lanuza et al. (2004) ont démontré que l'absence de *Dbx1* (et donc des interneurons V0) conduit à un déficit dramatique d'alternance des activités générées des côtés droit et gauche. Ce phénotype est associé à un défaut de neurotransmission inhibitrice. Sur une lignée exprimant une protéine rapporteur dans les descendants cellulaires des progéniteurs *Dbx1*-positifs (*Dbx1^{LacZ}*, voir matériels et méthodes), les auteurs montrent que cette population neuronale est en effet essentiellement inhibitrice et qu'elle synapse exclusivement sur des motoneurons du côté contralatéral. Ainsi, la connectivité inhibitrice réciproque à l'origine d'un comportement locomoteur normal est largement dépendante des interneurons V0 spécifiés par des progéniteurs exprimant *Dbx1*. Une étude ultérieure a révélé que des populations neuronales d'origines embryonnaires distinctes participent aussi au contrôle bilatéral des activités. D'une part, les animaux privés de certains neurones V2, pourtant glutamatergiques et ipsilatéraux (les V2a, mutation nulle de *Chox10*), présentent un phénotype pour partie similaire aux mutants privés d'interneurons commissuraux V0 (Crone et al., 2008). Les auteurs montrent que les neurones V2a font synapse et jouent un rôle excitateur sur

les interneurons V0. En leur absence, la neurotransmission commissurale inhibitrice assurée par ces derniers est affaiblie, expliquant le déficit fonctionnel. D'autre part, les interneurons de type V3 sont également majoritairement commissuraux et participeraient au maintien d'une alternance robuste entre les moitiés droite et gauche par une connectivité excitatrice directe sur les motoneurons (Zhang et al., 2008).

De manière intéressante, le contrôle de la nage repose largement sur une activité exacerbée du CPG locomoteur, comme le montre une étude récente qui raffine par ailleurs la contribution du domaine p0 (Zagoraïou et al., 2009). Les auteurs identifient que certains neurones V0, situés dans la région intermédiaire à proximité du canal central et de type cholinergique (V0_C), projettent localement sur les motoneurons (interneurons pré-moteurs). Ils participent à - et sont requis pour - la potentiation des décharges motrices, nécessaire à la transition vers le comportement de nage.

Les interneurons V1, dérivés des progéniteurs p1 Pax6⁺/Dbx2⁺/Nkx6.2⁺ jouent un rôle tout aussi essentiel dans l'établissement d'une commande locomotrice normale. Exclusivement inhibiteurs, ils établissent des contacts locaux et monosynaptiques sur les motoneurons, et participent à la modulation de la durée du cycle, et par conséquent de la vitesse, du comportement locomoteur (Gosgnach et al., 2006). Certaines observations, notamment la présence sur certains neurones V1 de collatérales des motoneurons, suggèrent même qu'une partie du lignage renferme les cellules de Renshaw (Sapir et al., 2004).

En revanche, chez tous ces mutants, la persistance des décharges rythmiques, bien qu'ipsilatérales chez certains, suggère que les lignages considérés individuellement ne sont ni la source de l'activité rythmique, ni les médiateurs de l'alternance des activités flexeur/extenseur. Cette dernière caractéristique serait assurée de manière concertée par plusieurs types interneuronaux (Butt and Kiehn, 2003). Il est en outre possible que les méthodes utilisées jusqu'alors, notamment des mutants nuls pour des facteurs de transcription ou des lignées rapporteur, n'identifient pas l'intégralité des sous-types dérivant des 4 domaines de progéniteurs d'interneurons ventraux. On sait par exemple que la spécification positionnelle présentée ici est raffinée temporellement, notamment par la durée d'exposition au morphogène par les progéniteurs, et même les cellules post-mitotiques (Kutejova et al., 2009; Dessaud et al., 2010; Ribes et al., 2010). Il est ainsi vraisemblable que davantage de sous-types neuronaux soient produits à partir des domaines de progéniteurs présentés classiquement. Une diversité au sein de la descendance d'un unique domaine a été d'ailleurs évoquée ici pour les neurones V0 (V0_D, V0_V, V0_C) ou V2 (V2a, V2b). Enfin, les progéniteurs

des domaines dorsaux jouent inévitablement un rôle crucial dans l'élaboration d'un comportement moteur complexe, en particulier à l'échelle de l'organisme. Ils produisent en effet bon nombre d'interneurones et tous les neurones sensoriels, dont l'activité pourrait significativement moduler celle du générateur.

5 - Régionalisation selon l'axe antéro-postérieur

Nous venons de voir que la génération de sous-types neuronaux variés pendant l'embryogenèse repose pour beaucoup sur des mécanismes de signalisation et de régionalisation opérant selon l'axe dorso-ventral. Il paraît évident que ceux-ci ne peuvent suffire à expliquer toute la diversité neuronale au sein du système nerveux dans son ensemble. La signalisation dorso-ventrale s'opère en effet parallèlement à une régionalisation selon l'axe antéro-postérieur qui va affiner les lignages produits. Celle-ci est particulièrement exacerbée dans le rhombencéphale, comme en témoigne la formation transitoire de compartiments génétiquement et anatomiquement distincts, les rhombomères (r); on emploie d'ailleurs aussi le terme de segmentation (Figure 23). Elle débute vers le jour embryonnaire 8 (E8) chez la souris et conduit à la formation transitoire de 7 ou 8 rhombomères distinguables morphologiquement, numérotés de 1 (r1), le plus antérieur et contigu avec le mésencéphale au niveau de l'isthme, à 8 (r8) le plus postérieur et continu avec la moelle épinière. Le processus de segmentation est achevé à E8.5 et les rhombomères ne sont plus visibles dès E11.5. C'est juste avant la disparition des limites rhombomériques que les activités rythmiques primordiales émergent, à E10.5 chez la souris (Abadie et al., 2000, voir aussi Fortin et al., 1994a,b).

5.1 - Les gènes *Hox*

D'un point de vue génique, la segmentation se manifeste par l'expression d'une combinaison de gènes de développement codant des facteurs de transcription à homéodomaine, les gènes *Hox*, caractéristique à chaque rhombomère (code homéotique, Figure 23). Chez les mammifères, les gènes *Hox* présentent des patrons d'expression qui leur sont propres le long de l'axe antéro-postérieur du tronc cérébral. Leurs limites d'expression sont en relation avec les limites des rhombomères (voir la revue de Lumsden et Krumlauf, 1996). Ils sont organisés en 4 complexes (*HoxA*, *B*, *C* et *D*; Scott, 1992) qui sont probablement issus de la duplication d'un complexe ancestral du type de celui de la drosophile, espèce chez qui ils ont été initialement identifiés (Lundin et al., 1993). Bien que particulièrement évidente dans le rhombencéphale par la formation des rhombomères, la

régionalisation dépendante des gènes *Hox* s'opère au sein de l'ensemble du tube neural, et participe également à la morphogénèse des membres. La perturbation du code homéotique dans le rhombencéphale segmenté produit des perturbations de l'identité segmentaire et de l'organisation des différents segments les uns par rapport aux autres.

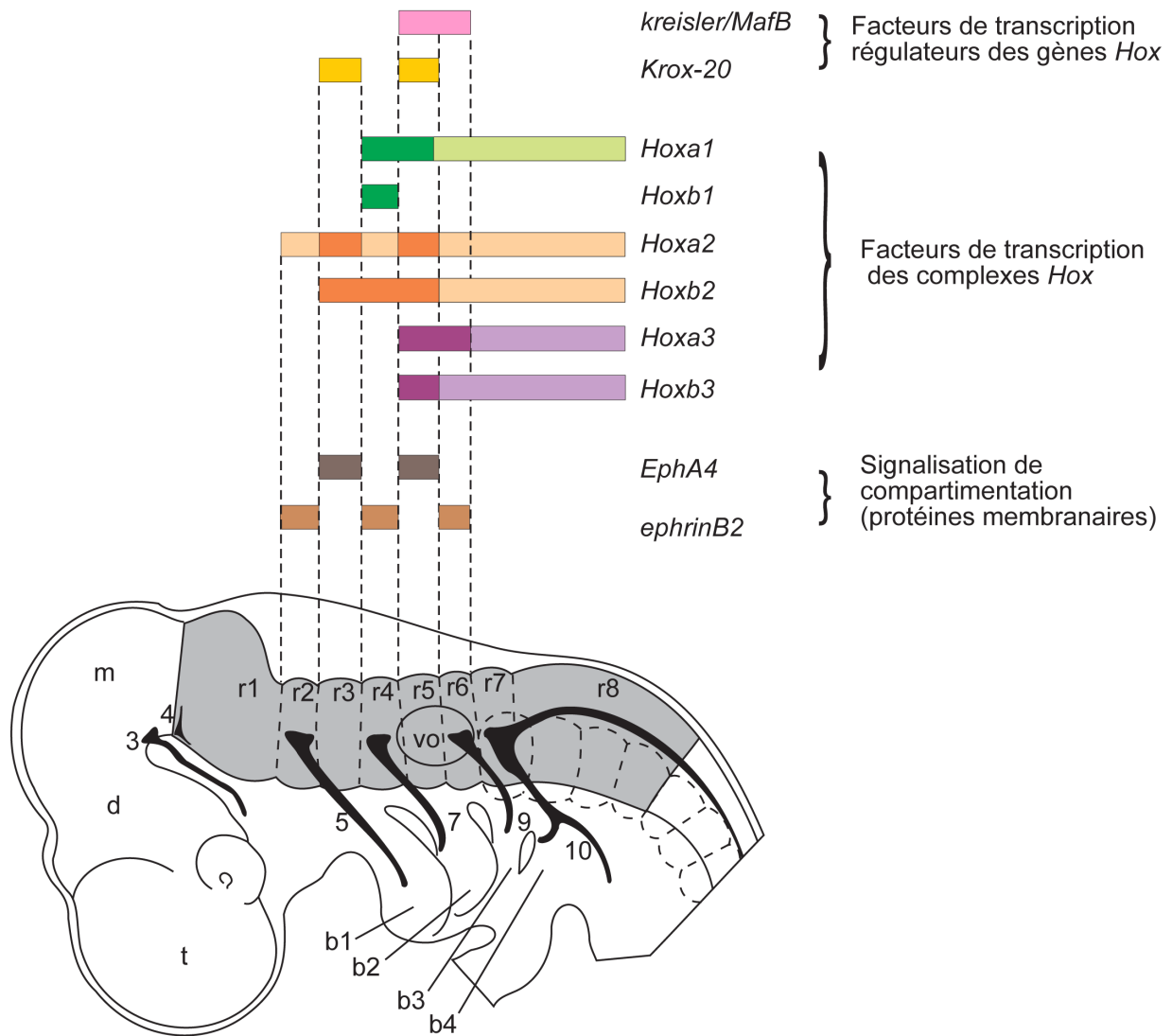


Figure 23 : la segmentation du rhombencéphale : une régionalisation génétique.

Vue latérale de la partie antérieure d'un embryon de souris à E9 montrant le rhombencéphale segmenté en 8 rhombomères (r1 à r8, partie grisée) et la correspondance des frontières rhombomériques avec les limites des domaines d'expression de certains gènes impliqués dans l'induction, le maintien de la segmentation et la spécification des identités rhombomériques. Ces signalisations moléculaires concernent soit des facteurs de transcription (Krox20, MafB/kreisler, Hox) ou des protéines membranaires (Eph/ephrin). Noter que les nerfs branchiomoteurs innervent un arc branchial défini.

D : diencéphale, m : mésencéphale, t : télencéphale, vo : vésicule otique.

Les nerfs crâniens : 3 : oculaire moteur commun, 4 : trochléaire, 5 : trijumeau, 7 : facial, 9 : glossopharyngien, 10 : vague.

5.2 - En amont des gènes *Hox*

Bien qu'il soit admis que l'identité positionnelle des rhombomères soit largement déterminée par l'expression des gènes *Hox*, nous ignorons beaucoup sur les signaux responsables de leur activation à des niveaux appropriés. On soupçonne toutefois les facteurs de croissance fibroblastiques (ou FGF pour Fibroblast Growth Factor) d'être parmi les acteurs principaux qui participent à l'établissement du code homéotique. Il semble par exemple que les facteurs FGF3 et FGF8 en provenance du rhombomère 4 présomptif soient déterminants pour induire et maintenir l'expression des gènes de segmentation dans les rhombomères adjacents à r4, en particulier *Krox20* en r5 et *MafB/kreisler* en r5/r6.

Par ailleurs, l'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A (ou rétinol), est impliqué dans le développement général, en particulier au niveau des membres et du système nerveux central (Maden, 2002). Il peut agir indirectement comme un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes *Hox* contenant des éléments de réponse à l'acide rétinoïque ou RARES (Retinoic Acid Response Elements) (Mangelsdorf and Evans, 1995). Libéré par le mésoderme le long du rhombencéphale caudal (futur r7/r8) et la moelle épinière, l'acide rétinoïque est exprimé selon un gradient de concentration décroissant dans le sens caudo-rostral. L'acide rétinoïque est un facteur postériorisant en relation avec son gradient de concentration et la sensibilité des gènes *Hox* : les gènes *Hox* qui s'expriment le plus rostralement sont les plus sensibles à l'acide rétinoïque ; ils sont donc induits aux concentrations les plus faibles, contrairement à ceux exprimés caudalement (Conlon et Rossant, 1992 ; Swindell et al., 1999).

5.3 - Des conséquences anatomiques évidentes

L'organisation rostro-caudale conservée des noyaux moteurs des nerfs crâniens découle directement de ce processus de segmentation. Deux motifs d'organisation cellulaire segmentaire ont été mis en évidence au niveau du rhombencéphale, l'un impliquant les neurones réticulaires et l'autre les motoneurones.

Les neurones réticulaires sont les premiers neurones à apparaître et à étendre leur axone au sein du rhombencéphale. Ces neurones se dessinent d'abord dans les rhombomères pairs et d'abord dans r4 (Lumsden et Keynes, 1989), puis dans les rhombomères impairs. Ce déséquilibre dans les populations neuronales des rhombomères pairs et impairs est accentué par l'apparition de neurones moteurs au sein des rhombomères pairs. Cette différence entre les rhombomères s'amenuise lorsque les motoneurones apparaissent dans les rhombomères impairs.

Les motoneurones se développent également dans chaque rhombomère mais ont une identité spécifique selon leur emplacement. Ainsi, les motoneurones branchiaux suivent un schéma répétitif basé sur une séquence de deux rhombomères (Figure 23). Pour chaque noyau branchiomoteur, le point de sortie du nerf moteur est situé dans un rhombomère pair antérieur, les corps cellulaires des neurones correspondants étant localisés dans le rhombomère pair et dans le rhombomère impair immédiatement postérieur. Ainsi, les corps cellulaires des motoneurones du nerf trigéminal (5n) occupent les rhombomères 2 et 3 et le point de sortie du nerf se situe au niveau du rhombomère 2. Les corps cellulaires des motoneurones du nerf glossopharyngien (9n) occupent les rhombomères 6 et 7 et son point de sortie se situe au niveau du rhombomère 6 (Lumsden et Keynes, 1989). Pour certains types cellulaires, l'origine rhombomérique peut être différente de la position anatomique finale en raison du potentiel migratoire de certains types cellulaires. On retiendra notamment ici que, chez le rat et la souris, les corps cellulaires des motoneurones faciaux naissent au sein des rhombomères 4 et 5 mais migrent caudalement en r6 (Auclair et al., 1996 ; Garel et al. ; 2000), alors que le point de sortie reste en r4.

6 - Développement et croissance axonale

Nous avons vu que la phase de neurogenèse assure l'acquisition par les neurones post-mitotiques des caractéristiques nécessaires à la réalisation d'une fonction physiologique donnée. Parmi ces caractéristiques figure le potentiel de connectivité, qui conditionne le déploiement des axones vers des cibles particulières. La modification de l'identité moléculaire des progéniteurs neuronaux, ou des neurones eux-mêmes, se manifeste notamment par un changement dramatique dans l'établissement de ces connexions. Les mécanismes qui assurent le guidage de l'axone en croissance seraient ainsi définis pendant la spécification neuronale et agiraient en aval de celle-ci, pour aboutir à la mise en place d'une fonction physiologique. Ils représentent alors une cible potentielle des gènes d'identité neurale.

Les travaux ayant identifié les acteurs moléculaires qui régulent et orientent la croissance des axones au cours du développement se sont essentiellement focalisés sur les populations de neurones commissuraux. Ils présentent une signature morphologique particulière (leur axone projeté de l'autre côté de la ligne médiane) et leur absence conduit à un phénotype dramatique s'ils sont impliqués dans le contrôle d'un comportement moteur (perte de la coordination bilatérale des mouvements). Le comportement respiratoire est un

exemple frappant de comportement moteur parfaitement synchronisé bilatéralement. Au cours de cette thèse, nous avons d'ailleurs entrepris l'identification de certains gènes clés dans l'établissement de cette synchronisation. Par conséquent, il est essentiel de présenter ici les principes généraux qui gouvernent la croissance axonale commissurale pendant le développement, en insistant sur ceux qui seront évoqués dans les résultats : la signalisation faisant intervenir les protéines Slits et Robos (voir pour revue Dickson and Gilestro, 2006).

6.1 - Le déploiement des axones commissuraux

Le déploiement d'un axone vers une cible particulière repose sur le franchissement par l'axone en croissance de différentes étapes intermédiaires, chacune pouvant être, ou non, permissive. Le cône de croissance, structure spécialisée de l'extrémité distale de l'axone, assure la navigation et l'interprétation des signaux présents dans le milieu extracellulaire. Classiquement, le cône de croissance est confronté à deux types de signaux : les signaux attractants, qui vont favoriser sa croissance, et les signaux répulsifs, qui vont l'instruire de bifurquer. Dans le cas des neurones commissuraux, une étape intermédiaire évidente de leur développement est le franchissement de la ligne médiane par l'axone en croissance. On sait maintenant que les cellules de la ligne médiane ventral (plaque du plancher) sont une source de signaux chimiques attractants. Ces derniers sont essentiellement représentés par des protéines de la famille des netrines ainsi que la protéine ventralisante Shh elle-même (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994; Charron et al., 2003). Typiquement, les axones commissuraux sont attirés par la ligne médiane, la traversent puis bifurquent longitudinalement pour rejoindre leur cible du côté contralatéral. Dès lors, la situation soulève deux questions centrales : i) pourquoi les axones commissuraux sont-ils les seuls à être attirés par les signaux de la ligne médiane ? ii) pourquoi, si la ligne médiane est effectivement source de signaux attractants, les axones commissuraux s'en éloignent-ils après l'avoir traversée une première fois ? De manière intéressante, la réponse à ces deux questions implique d'autres molécules de guidage : les Slits, sécrétées par la ligne médiane, et les Robos, leurs récepteurs sur les cônes de croissance.

6.2 - La signalisation Slits/Robos

6.2.1 - Les Slits : des molécules de guidage sécrétées par la ligne médiane

Le mutant Slit, initialement obtenu chez la drosophile, est caractérisé par un excès de fibres commissurales, illustré par accumulation de terminaisons axonales au niveau de la ligne médiane (Rothberg et al., 1990; Seeger et al., 1993; Kidd et al., 1999). Les mammifères possèdent au moins 3 gènes Slit (Slit-1, Slit-2 et Slit3) exprimés par les cellules de la ligne

médiane (Brose et al., 1999). L'invalidation des trois gènes Slit chez la souris conduit à un phénotype de déploiement commissural aberrant semblable à celui du mutant Slit chez la drosophile (Long et al., 2004). L'ensemble de ces observations indique que, chez tous les vertébrés, les Slits exercent une action répulsive pour les axones commissuraux (Zou et al., 2000; Sabatier et al., 2004). Toutes les protéines Slits partagent une structure commune, dont un domaine de répétition de sites riches en Leucine (Leucine Rich Repeats ou LRR) qui constitue le site liaison à leur récepteurs Robos (Howitt et al., 2004).

6.2.2 - Les Robos : récepteurs des Slits

Comme pour les Slits, c'est chez la drosophile que le mutant Robo nul a initialement été décrit. Il présente des projections commissurales aberrantes d'axones normalement ipsilatéraux mais aussi des axones qui croisent et recroisent la ligne médiane (Seeger et al., 1993; Kidd et al., 1998). Cette dernière caractéristique est à l'origine du nom donné à la mutation, en référence au mot anglais Roundabout (rond-point). Par la suite, plusieurs gènes de la famille Robo ont été caractérisés, trois chez la drosophile et quatre chez les mammifères (Kidd et al., 1998; Yuan et al., 1999). Les protéines Robo (à l'exception de Robo4) sont constituées d'un domaine extracellulaire comprenant cinq groupes de types Immunoglobuline et trois de type fibronectine III (FN3), un unique domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique ne présentant pas d'activité catalytique évidente (Kidd et al., 1998). Le site de liaison de leur ligand, les protéines Slits, est représenté par les deux premiers domaines de type immunoglobuline, la région la plus conservée de la protéine (Liu et al., 2004). On les trouve exprimées au sein du système nerveux central, y compris par les neurones commissuraux.

6.2.3 - Expression dynamique des Robos et franchissement de la ligne médiane

A l'heure actuelle, on considère que les axones commissuraux ne sont pas davantage attirés par la ligne médiane que les axones ipsilatéraux. En revanche, ces derniers seraient repoussés sous l'action des protéines Slits. Des différences de régulation post-transcriptionnelle des récepteurs Robos dans les axones commissuraux par rapport aux axones ipsilatéraux semblent être à l'origine de cet effet différentiel des Slits.

Commençons par la situation de la drosophile, qui en illustre les grandes lignes (Figure 24). Bien que le mRNA de Robo1 soit exprimé par tous les neurones du tube neural, la protéine est enrichie sur les fibres ipsilatérales mais est non-détectable sur les axones commissuraux qui s'appêtent à franchir la ligne médiane. En revanche, ces dernières accumulent la protéine une fois qu'elles ont franchi la ligne médiane. Bien que plus complexe,

une régulation post-transcriptionnelle des gènes *Robo2* et *Robo3* a également lieu et conduit à leur exclusion des axones commissuraux et à leur enrichissement dans les fibres ipsilatérales. Ainsi, l'effet répulsif des Slits reposerait sur l'expression des protéines Robo et serait mis en jeu pour assurer que i) les fibres ipsilatérales ne franchissent pas la ligne médiane et ii) les fibres commissurales ayant franchi la ligne médiane se maintiennent du côté contralatéral. Chez la drosophile toujours, l'origine de la régulation du niveau d'expression des Robos fut attribuée au gène *commissureless* (*Comm*). Les mutants *Comm* présentent le phénotype strictement opposé aux mutants *Robo* : aucun axone ne croise la ligne médiane. Il est maintenant admis que *Comm* participe à la séquestration de la protéine Robo3 dans les endosomes, et empêche donc son adressage à la membrane (Figure 24). Chez le mutant *Comm*, l'adressage des Robos à la membrane est alors ubiquitaire et permanent, d'où un effet répulsif des Slits sur tous les neurones et une absence de commissures. Enfin, mais de manière encore largement spéculative, *Comm* pourrait représenter un interrupteur temporel permettant aux axones commissuraux de, successivement, franchir la ligne médiane (*Comm* actif : séquestration de Robo) puis de se maintenir du côté contralatéral (*Comm* inactif : Robo adressé à la

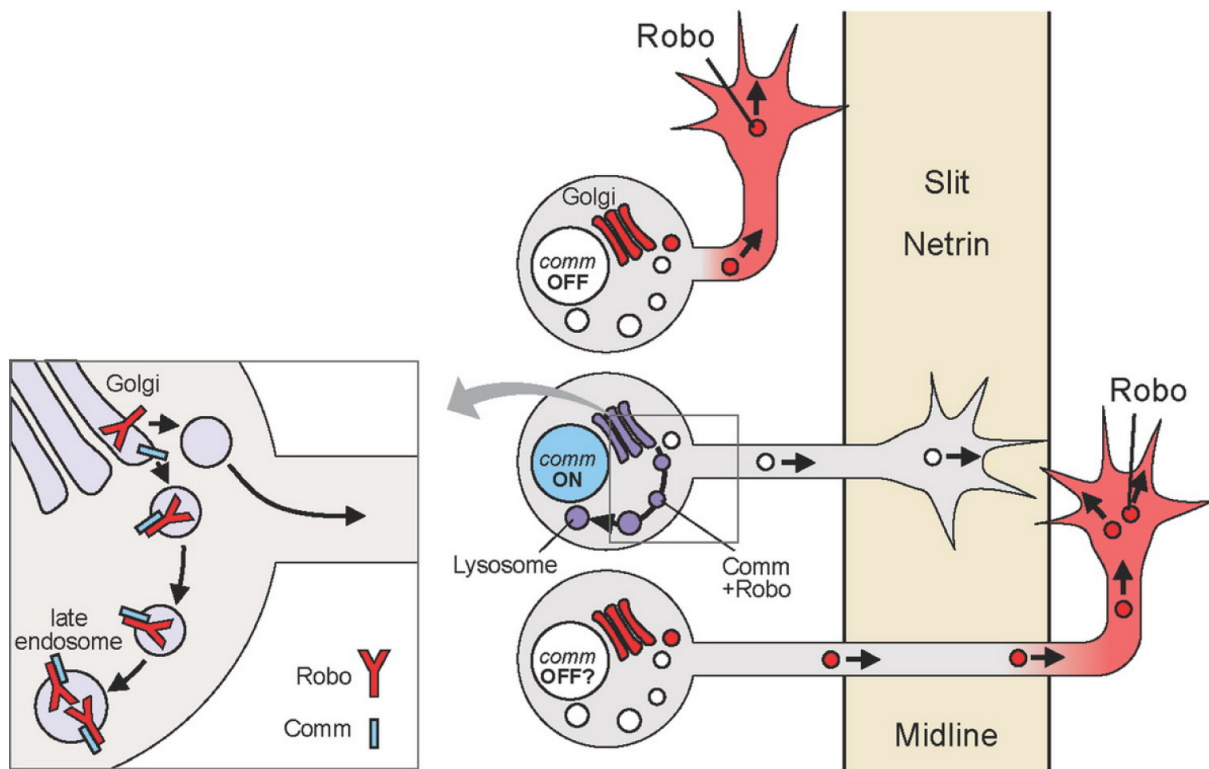


Figure 24 : modèle de régulation de Robo par Comm chez la Drosophile.

Lorsque *Comm* n'est pas exprimé (en haut, *comm OFF*) Robo est normalement adressé à la membrane et les Slits exprimés par la ligne médiane (en beige, à droite) exercent leur effet répulsif. L'activation de *Comm* (au milieu, *comm ON*) entraîne la séquestration de la protéine Robo (insert à gauche). L'axone peut alors franchir la ligne médiane. Après le franchissement, le maintien de l'axone du côté contralatéral pourrait impliquer une dérégulation de l'expression de *Comm* (*comm OFF?*, en bas).

D'après Dickson and Gilestro, 2006.

membrane).

Chez les mammifères, la dynamique d'expression des gènes *Robo1* et *Robo2* semble refléter celle connue chez la drosophile. En revanche, le gène *Comm* ne semble pas avoir d'homologue. Ce n'est que très récemment qu'un régulateur négatif des Robos chez les mammifères a été identifié. De manière surprenante, il s'agit de la protéine *Robo3*, aussi connue sous le nom de *Rig-1*.

6.2.4 - Le cas particulier de *Robo3* chez les mammifères

6.2.4.1 - Mécanismes opératoires

Une action divergente de *Robo3* par rapport aux autres gènes Robos a été suggérée dès l'étude initiale du mutant *Robo3* nul (Sabatier et al., 2004). Contrairement à ce que les auteurs auraient pu attendre, l'inactivation génétique de *Robo3* chez la souris entraîne l'absence totale de commissures, un phénotype qui rappelle celui des mutants *Comm* chez la drosophile. Comme pour *Robo1* et *Robo2*, l'expression de *Robo3* est spatialement restreinte sur les axones, mais de manière opposée à celle des premiers. Alors que les niveaux d'expression de *Robo1* et *Robo2* sont faibles avant le franchissement de la ligne médiane et forts après, *Robo3* est au contraire enrichi avant le franchissement. D'autre part, la perte de commissures chez le mutant *Robo3* nul est partiellement restaurée après inactivation de *Robo1* ou de *Slit1* et *Slit2*. *Robo3* apparaît donc comme un acteur nécessaire au déploiement des axones commissuraux en exerçant une action inhibitrice sur la signalisation Slits/*Robo1*.

Notons ici que *Robo3* ne semble pas agir selon des mécanismes similaires à *Comm*, régulateur des Robos chez la drosophile. Chen et al. (2008.) rapportent en effet l'existence de deux isoformes de *Robo3*, *Robo3.1* et *Robo3.2*, générées par un procédé peu commun d'épissage alternatif, la rétention différentielle d'introns. Les isoformes *Robo3.1* et *Robo3.2* ne sont pas exprimées simultanément, et interviendraient séquentiellement pour respectivement initier le franchissement, puis pour assurer le maintien du côté contralatéral (Figure 25).

6.2.4.2 - Un outil pour la dissection génétique des réseaux neuronaux

Même si de nombreuses interrogations persistent, notamment sur l'origine de la régulation des deux isoformes, il n'en demeure pas moins que le gène *Robo3* est essentiel au déploiement des axones commissuraux. Il apparaît même comme le gène « maître » de la connectivité commissurale au sein de la moelle épinière (Sabatier et al., 2004) et du tronc cérébral (Marillat et al., 2004). Les animaux mutants ne survivent d'ailleurs que quelques heures après la naissance. Même si une absence généralisée de commissures paraît, à première

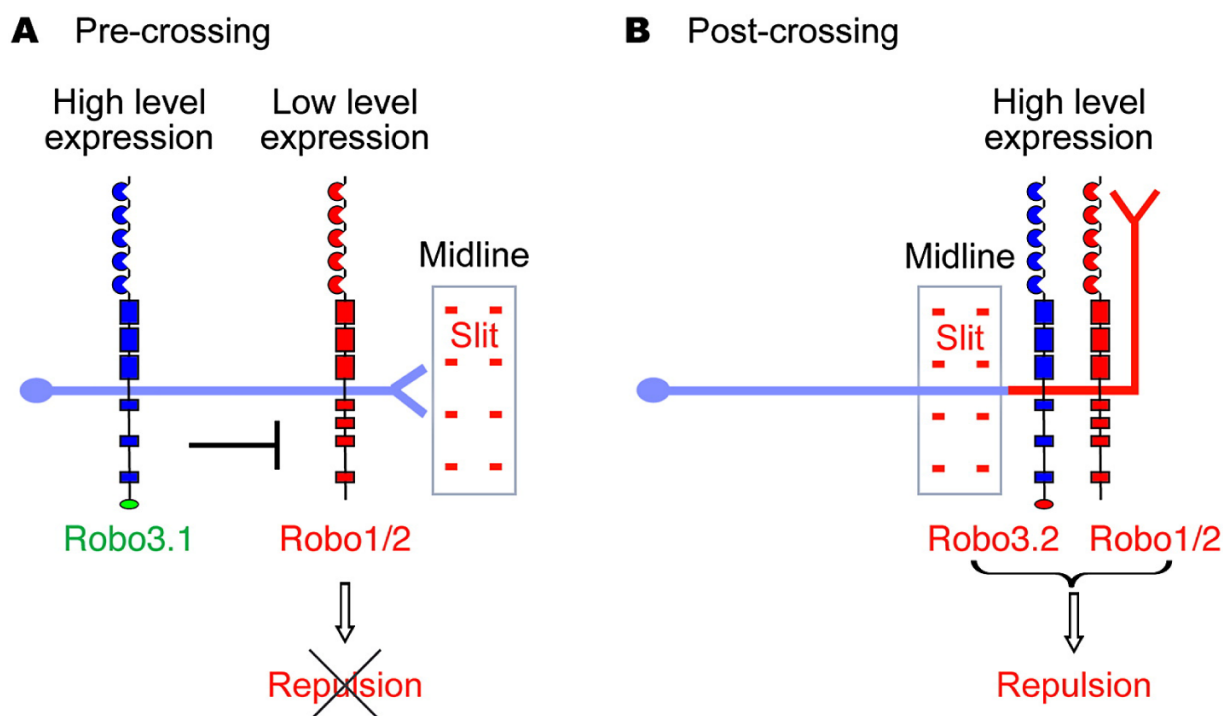


Figure 25 : modèle de régulation du franchissement de la ligne médiane par Robo3 chez les mammifères.

(A). Avant que les axones ne rejoignent la ligne médiane (Pre-crossing), Robo3.1 est fortement exprimé sur l'axone et y réprime l'activité des récepteurs Robo1 et Robo2. En conséquence, les axones ne sont pas sensibles à la répulsion dépendante des Slits et peuvent traverser la ligne médiane.

(B). Dès le franchissement achevé (Post-crossing), le segment distal exprime Robo3.2, mais pas Robo3.1. L'action inhibitrice de Robo3.1 sur l'activité de Robo1 et Robo2 est levée, rendant l'axone de nouveau sensible aux Slits et l'empêchant ainsi de croiser à nouveau. Des mécanismes de répression mutuelle entre les deux isoformes de Robo3 pourraient être à l'origine de cette expression exclusive.

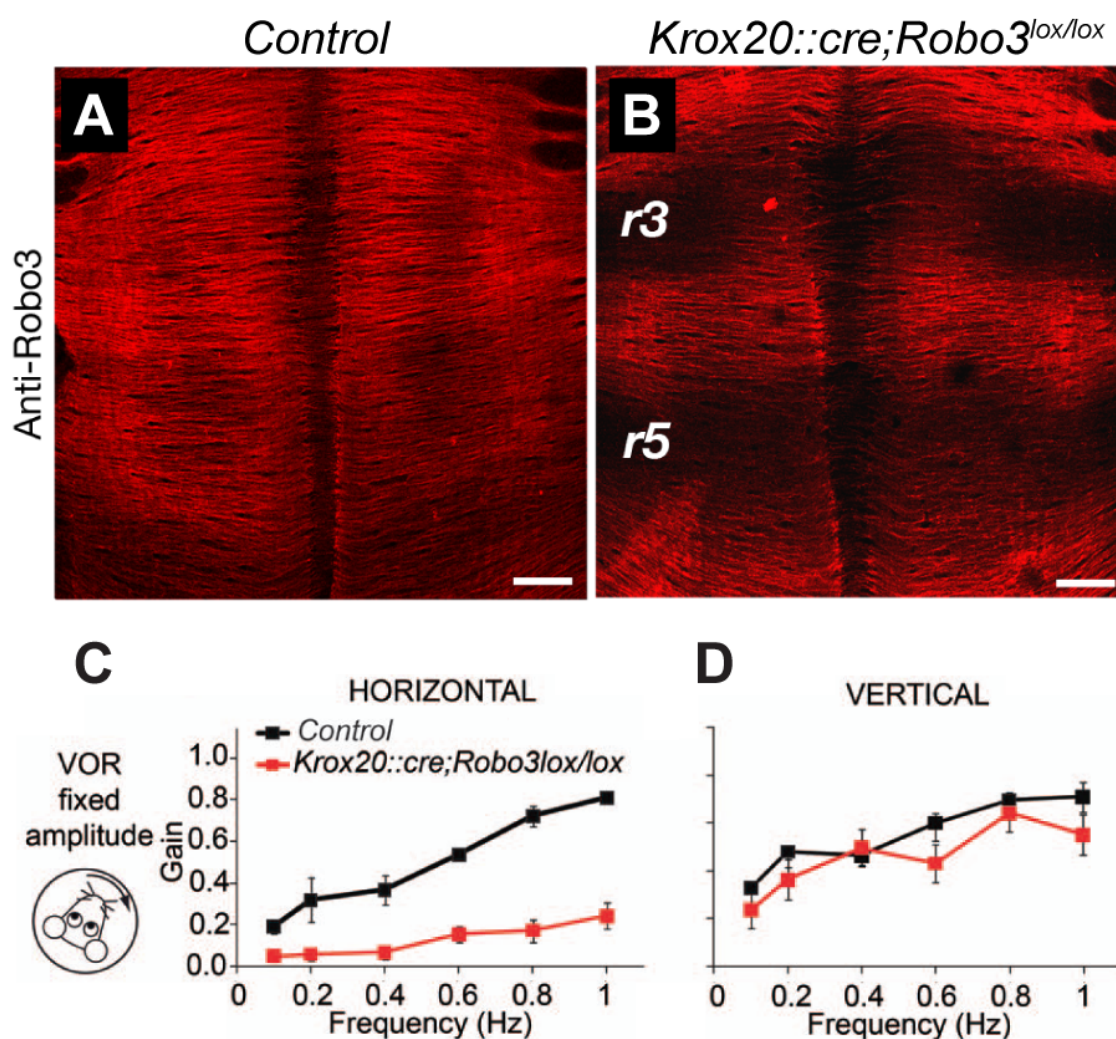
Les acteurs autorisant le franchissement sont inscrits en vert (Robo3.1) alors que ceux assurant la répulsion (Slit, Robo1/2, Robo3.2) sont inscrits en rouge.

D'après de Chen et al., 2008.

vue, de mauvais pronostic, la nature exacte du déficit responsable de cette mort précoce reste inconnue. Nous aborderons d'ailleurs au cours de cette thèse la possibilité qu'un défaut de synchronisation bilatérale de l'activité respiratoire puisse être invoqué.

Chez l'homme, une mutation du gène Robo3 est responsable du syndrome rare de paralysie du regard latéral et scoliose progressive (ou HGPPS pour horizontal gaze palsy and progressive scoliosis) (Jen et al., 2004; Bosley et al., 2005). Les patients sont incapables de déplacer les yeux latéralement et doivent systématiquement tourner la tête pour suivre les déplacements d'objets en mouvements (Haller et al., 2008). Le contrôle des mouvements oculaires verticaux n'est en revanche pas affecté. En outre, des défauts de posture se développent dès l'enfance, entraînant progressivement une forte scoliose qui nécessite typiquement une intervention chirurgicale. A l'échelle neuro-anatomique, seuls des défauts de décussation bulbaire de certains trajets axonaux descendants (notamment faisceau

cortico-spinal pyramidal et lemnisque médian) ont été décrits chez les patients HGPPS. Ces fibres établissent des projections ipsilatérales aberrantes qui sont vraisemblablement à l'origine des défauts de posture. L'origine de la paralysie latérale du regard reste, elle, largement spéculative (Bosley et al., 2005). Il n'en demeure pas moins que la survie des patients n'est pas en jeu et que ces défauts sont largement plus modérés que ceux des modèles animaux. Dès lors, il paraissait nécessaire de disséquer plus précisément la fonction des commissures dans des structures cérébrales plus restreintes.



Une lignée génétiquement modifiée permettant l'inactivation sélective de Robo3 dans des types cellulaires particuliers, et donc dans des régions spécifiques (*Robo3^{lox/lox}*, voir matériels et méthodes), a été générée très récemment (Renier et al., 2010). Son utilisation semble prometteuse pour disséquer précisément le rôle des commissures dans différentes régions du cerveau et en particulier au sein du tronc cérébral. Les auteurs ont par exemple montré que l'inactivation sélective de Robo3 au sein des rhombomères 3 et 5 (croisement avec une lignée *Krox20::cre*) entraîne un phénotype oculomoteur qui rappelle celui des patients HGPPS (Renier et al., 2010, Figure 26). L'étude révèle en outre que les axones commissuraux privés de Robo3 sont re-routés du côté ipsilatéral mais parviennent à y contacter leur cibles cellulaires normales. Robo3 ne serait donc pas nécessaire à la reconnaissance entre l'axone en croissance et sa cible. Ainsi, contrairement à une ablation chirurgicale, l'ablation génétique des commissures n'empêche pas l'activation du circuit cible. Cette propriété est vraisemblablement à l'origine de la persistance de fonctions cognitives essentiellement normales chez les patients HGPPS.

7 - L'origine embryonnaire du générateur respiratoire

Par « dissection développementale », « origine développementale » ou encore « origine embryonnaire » de neurones d'intérêt, nous entendons ici l'identification d'un ensemble de mécanismes, notamment de signalisation selon les deux axes, assurant leur spécification pendant l'embryogenèse. La caractérisation des mécanismes impliqués dans la spécification des neurones du générateur respiratoire lui-même est un enjeu majeur pour la compréhension de la mise en place d'une commande respiratoire fonctionnelle avant la naissance. Comme nous l'avons évoqué plus haut, de nombreuses pathologies respiratoires centrales congénitales seraient en effet associées à des mutations sur des facteurs de transcription.

L'étude, chez la souris, des conséquences fonctionnelles de mutations sur des gènes impliqués dans le développement a déjà fourni de précieuses informations quant à l'origine des neurones impliqués dans le contrôle central de la respiration. Un lien entre gènes de segmentation antéro-postérieure et mise en place des activités respiratoires pendant l'embryogenèse a pu être démontré, notamment en ce qui concerne les gènes *Hoxa1* (del Toro et al., 2001) et *Hoxa2* (Chatonnet et al., 2003; Chatonnet et al., 2007). Ces mutations affectent principalement les groupes modulateurs de l'activité respiratoire. Étonnamment, en ce qui concerne le générateur respiratoire lui-même, seule l'origine de l'oscillateur parafacial, bien

que découvert plus récemment, semble maintenant établie (Jacquin et al., 1996; Thoby-Brisson et al., 2009).

7.1 - Le groupe respiratoire para-facial embryonnaire

Les travaux de Jacquin et al. (1996) furent les premiers à démontrer qu'une modification de la segmentation rhombomérique durant l'embryogenèse influence la commande respiratoire à la naissance. L'étude repose sur l'identification préalable du gène *Krox-20*, exprimé juste avant la segmentation morphologique en deux bandes transverses qui deviendront les rhombomères 3 et 5 (Wilkinson et al., 1989; Schneider-Maunoury et al., 1993, 1997). La protéine KROX20 est un facteur de transcription comprenant trois « doigts de zinc », sites de fixation à l'ADN, qui agirait en aval de l'activation de gènes *Hox*, notamment des paralogues *Hoxb2* et *Hoxa2* (Sham et al., 1993 ; Nonchev et al., 1996). Son invalidation génétique (souris *Krox20*^{-/-}) conduit à la perte des marqueurs spécifiques à r3 et r5 (Schneider-Maunoury et al., 1993; Swiatek and Gridley, 1993; Schneider-Maunoury et al., 1997). Les animaux *Krox20*^{-/-} présentent dès la naissance une fréquence respiratoire anormalement lente et des apnées fréquentes, et meurent au cours du premier jour postnatal (Jacquin et al., 1996). Ce phénotype est retrouvé *in vitro* par l'enregistrement des activités motrices respiratoires sur une préparation réduite de tronc cérébral, suggérant une altération centrale. Les structures anatomiques recevant des contributions cellulaires des rhombomères 3 et 5 sont éliminées ou dramatiquement réduites. Cependant, la plupart des groupes neuronaux alors impliqués dans la genèse et la transmission de l'activité rythmique respiratoire, notamment le preBötC et les motoneurons sont épargnés par la perte de fonction de *Krox20*. Les auteurs concluent donc à l'existence d'un nouveau réseau neuronal, dérivant des rhombomères 3 et/ou 5, et impliqué dans l'élaboration de l'activité respiratoire à la naissance.

Ce n'est qu'après la mise en évidence de l'implication du groupe respiratoire parafacial dans la genèse du rythme respiratoire (Onimaru and Homma, 2003) que l'origine du déficit fonctionnel des animaux *Krox20*^{-/-} a pu être précisée. Utilisant des lignées transgéniques rapporteur, Thoby-Brisson et al. (2009) ont montré que des neurones dérivant de territoires rhombomériques exprimant *Krox20* pourraient former la forme embryonnaire de l'oscillateur parafacial, l'e-pF. Associés à l'étude de Dubreuil et al., (2009), ces travaux identifient l'origine dorso-ventrale et antéro-postérieure de l'oscillateur. D'une part, la majorité des neurones constitutifs de l'e-pF exprime les facteurs de transcription *Phox2b*, signature moléculaire des motoneurons ventraux et des interneurons dorsaux dB2, et *Lbx1*, spécifique des neurones post-mitotiques dorsaux dB1 à dB4. Par conséquent, l'e-pF serait constitué d'une population

homogène d'interneurones issus en r5 de progéniteurs dB2 (Thoby-Brisson et al., 2009 ; Dubreuil et al., 2009). Etayant l'hypothèse que l'e-pF constitue la forme embryonnaire du pFRG décrit chez le nouveau-né, Onimaru et al. (2008) ont rapporté que les neurones du pFRG présentant une chémosensibilité intrinsèque expriment aussi Phox2b. D'autre part, l'inactivation génétique de Krox20 conduit à l'absence fonctionnelle et anatomique de l'oscillateur de l'e-pF, y compris des cellules Phox2b⁺ (Thoby-Brisson et al., 2009). L'inactivation sélective de Phox2b au sein du lignage dérivant de Krox20 conduit aussi à l'absence fonctionnelle de l'oscillateur. Cette conclusion se retrouve également si Phox2b est spécifiquement invalidé au sein des sous-types neuronaux exprimant Lbx1 (Dubreuil et al., 2009). Phox2b est donc requis pour assurer l'identité des neurones de l'e-pF. De manière intéressante, une mutation au sein de ce facteur de transcription est communément retrouvée chez les patients humains atteints du Syndrome d'Ondine (Syndrome d'Hypoventilation Alvéolaire Congénitale, CCHS). Les auteurs ont étudié la conséquence de l'introduction, chez la souris, de la mutation la plus couramment décelée, une extension de 7 résidus alanine dans la queue polyAla (mutants Phox2b^{27Ala} ; Dubreuil et al., 2008). De manière intéressante, le phénotype des embryons *Phox2b*^{27Ala} rappelle celui des lignées conditionnelles décrites ci-dessus (Dubreuil et al., 2008; Dubreuil et al., 2009). Cette mutation particulière du facteur de transcription Phox2b affecterait ainsi sélectivement la différenciation des neurones de l'oscillateur parafacial. Cette stratégie développementale présente donc un grand potentiel dans la compréhension des bases cellulaires à l'origine d'un syndrome respiratoire dramatique chez l'homme.

D'autres études s'insèrent dans l'identification du programme développemental aboutissant aux neurones de l'oscillateur para-facial. Ces derniers requièrent par exemple le facteur de transcription proneural Math1 ou Atoh1 (Rose et al., 2009), dont l'expression était jusqu'alors décrite uniquement au sein du neuroépithélium le plus dorsal (la lèvre rhombique) ainsi que dans la couche granulaire externe du cervelet. L'étude révèle que Math1 est requis pour la spécification des neurones NK1R⁺/Phox2b⁺/Lbx1⁺ de l'oscillateur de l'e-pF. L'absence de Math1 conduit en effet à une fréquence respiratoire ralentie et à la mort prématurée des nouveau-nés, un phénotype associé à un déficit fonctionnel de l'oscillateur parafacial. Encore plus récemment une étude des déficits causés par la perte de fonction du gène de développement Tshz3 a permis de montrer l'importance de ce facteur de transcription dans la mise en place d'un réseau neuronal respiratoire fonctionnel (Caubit et al., 2010). Deux altérations majeures expliquent la mort des mutants à la naissance. D'une part, la mutation

conduit, *via* la perte des motoneurons du noyau ambigu, à un dysfonctionnement du contrôle nerveux des muscles augmentant la résistance des voies aériennes supérieures. D'autre part, le mutant *Tshz3*^{-/-} présente une perte de fonctionnalité sélective de l'oscillateur parafacial qui normalement régule à la hausse la fréquence du générateur central du rythme par entraînement de l'oscillateur preBötC, non affecté par la mutation.

L'ensemble de ces travaux aboutit à une caractérisation de programmes développementaux impliqués dans la spécification des neurones constitutifs de l'oscillateur du pFRG ou de sa forme embryonnaire, l'e-pF. Il est d'ailleurs intéressant de noter ici qu'en dépit de sa position finale à la surface ventrale du tronc cérébral, cet oscillateur est spécifié au sein du rhombencéphale dorsal. Il n'en demeure pas moins qu'un rythme respiratoire, bien que lent ou anormal, est présent chez les mutants privés de cet oscillateur. Il est vraisemblable qu'il émane du preBötC, systématiquement épargné. Ce dernier serait donc spécifié par des programmes distincts.

7.2 - L'oscillateur respiratoire du preBötC

A ce jour, l'origine embryonnaire de l'oscillateur du preBötC, pourtant le principal générateur de l'activité inspiratoire, reste largement inconnue. Quelques études se sont pourtant penchées sur la question, sans pour autant clairement identifier un programme développemental caractéristique.

Localisé dans le tronc cérébral caudal, il est vraisemblable que sa spécification dépende des rhombomères les plus caudaux. Cette hypothèse a par ailleurs été testée indirectement, par des expériences de greffes de segments rhombomériques de souris chez le poulet (Borday et al., 2006). L'étude conclut qu'un programme favorisant l'émergence d'activités de type respiratoire à haute fréquence est contenu par les rhombomères post-otiques r6r7r8. En revanche, elle ne fournit pas d'identification précise du code homéotique impliqué ni de la nature exacte de la structure induite.

A ma connaissance, le seul gène de développement dont l'inactivation altère la mise en place du preBötC pendant l'embryogenèse est le facteur de transcription MafB, de la famille bZIP. Crucial dans des mécanismes de différenciation en dehors du système nerveux central, MafB est également un acteur clé de la spécification des rhombomères (Cordes and Barsh, 1994). La mutation nulle (*MafB*^{-/-}) aboutit à des défauts respiratoires et à la mort des animaux quelques heures après la naissance (Blanchi et al., 2003). L'analyse pléthysmographique au stade embryonnaire E18.5 montre que les animaux mutants ne ventilent pas, et des enregistrements *in vitro* révèlent des altérations centrales. Les préparations réduites issues

d'animaux *MafB*^{-/-} ne génèrent que très rarement et irrégulièrement des décharges motrices inspiratoires. En outre, l'échec d'un entraînement moteur par des stimulations électriques du preBötC suggère une atteinte de l'oscillateur lui-même. L'expression de MafB est d'ailleurs détectée dans la région du preBötC, y compris au sein de certains neurones NK1R⁺. L'effectif de ces derniers est diminué d'environ un tiers chez les mutants *MafB*^{-/-}. Ainsi, MafB participerait à la mise en place d'une sous-population des neurones NK1R⁺. Cependant, en raison de l'expression précoce de MafB au sein de vastes territoires embryonnaires, il n'est pas impossible que l'altération d'autres structures participe au phénotype des animaux *MafB*^{-/-}. En outre, bien que cette étude montre une atteinte anatomique partielle de l'oscillateur, elle n'a pas recherché son comportement rythmogène intrinsèque, notamment lorsqu'il est isolé dans une tranche. Ainsi, même si MafB représente un déterminant essentiel à la mise en place de la commande centrale respiratoire et de l'oscillateur du preBötC, il ne désigne pas le(s) territoire(s) rhombomérique(s) et le(s) domaine(s) de progéniteurs lui donnant naissance.

Enfin nous allons clore ce chapitre en évoquant quelques études initialement dédiées à l'e-pF/pFRG/RTN pour illustrer la vraisemblance d'une origine distincte des deux oscillateurs respiratoires. D'une part, malgré la présence de quelques neurones Phox2b⁺ dans la région du preBötC, ces derniers ne sont pas essentiels à la rythmogenèse au sein de cet oscillateur (Dubreuil et al., 2009). Il en va de même pour les neurones exprimant Lbx1 (Pagliardini et al., 2008). Ces types neuronaux d'origine dorsale ne contribuent pas aux populations cellulaires caractéristiques de l'oscillateur, notamment aux neurones glutamatergiques NK1R⁺ et/ou Stt⁺. Par ailleurs, la perte de fonction *Math1* décrite plus haut est associée à une fréquence anormalement lente des décharges spontanées de l'oscillateur isolé *in vitro*. Pourtant, ici encore le déficit n'est pas lié à un défaut de différenciation des constituants cellulaires du preBötC exprimant NK1R et/ou Sst. En outre, l'application *in vitro* de neuromodulateurs tels que la substance P et des stimulants de la neurotransmission glutamatergique induit une augmentation du rythme qui redevient alors comparable à celui des animaux sauvages. Ainsi, la capacité rythmogène basale du preBötC est préservée chez ces mutants. *Math1* serait nécessaire à l'émergence d'une rythmogenèse optimale au sein du preBötC, notamment en produisant des interneurons qui envoient des projections descendantes vers l'oscillateur. Il ne constitue pas pour autant un acteur développemental requis pour l'émergence des constituants cellulaires directement impliqués dans la rythmogenèse.

Les études associant neurobiologie du développement et physiologie respiratoire ont abouti à l'identification de programmes développementaux impliqués dans la spécification des neurones constitutifs de l'oscillateur para-facial ou de sa forme embryonnaire l'e-pF. Il n'existe toutefois aucune caractérisation précise de l'origine développementale des différents constituants cellulaires participant à la rythmogenèse et à la connectivité de l'oscillateur du preBötC, pourtant prépondérant dans la rythmogenèse respiratoire.

Matériels et Méthodes

Notre stratégie d'étude de l'origine embryonnaire du générateur du rythme respiratoire repose sur une approche associant neurophysiologie et neurobiologie du développement. Nous avons largement bénéficié de lignées murines portant des invalidations sélectives de gènes impliqués dans la spécification des sous-types neuronaux pendant l'embryogenèse. L'observation et la caractérisation des phénotypes respiratoires associés est le point de départ de cette étude. Ce diagnostic a été effectué *in vivo* par l'enregistrement en pléthysmographie de l'activité ventilatoire à la naissance, puis chez le fœtus aux stades tardifs du développement. L'origine centrale du déficit moteur a été alors vérifiée et caractérisée *in vitro* sur des préparations réduites de tronc cérébral/moelle épinière isolés et de tranches transversales contenant le preBötC. Les activités de types respiratoires ont été enregistrées par des méthodes d'électrophysiologie et visualisées à l'aide d'indicateurs fluorescents sensibles à la concentration intracellulaire de calcium. En parallèle, les altérations cellulaires au sein des oscillateurs respiratoires ont été examinées par des protocoles d'immunomarquages fluorescents multiples réalisés sur des coupes fines de troncs cérébraux fixés à différents stades embryonnaires. L'expression des gènes de régionalisation au sein des progéniteurs étant souvent précoce et transitoire, nous avons en outre fait appel à des lignées de souris dites « rapporteur ». Chez ces animaux, une protéine particulière (fluorescente notamment) s'exprime sous le contrôle des séquences régulatrices d'un gène de développement d'intérêt et persiste bien après l'extinction de ce dernier. Le devenir des descendants cellulaires d'un unique domaine de progéniteurs a ainsi pu être décrit d'un point de vue à la fois anatomique et fonctionnel. Enfin, nous avons fait appel au système Cre/lox afin d'interagir de manière conditionnelle avec l'activité et la connectivité des lignages cellulaires.

Bien que les travaux présentés ici n'impliquent pas la réalisation à proprement parler des souris, il est important de comprendre leurs caractéristiques spécifiques. La première section de ce chapitre y est dédiée. Nous détaillerons ensuite tous les protocoles expérimentaux mis en œuvre.

1 - Lignées murines

Toutes les expériences sur les animaux ont été réalisées selon les directives françaises du ministère de l'agriculture et les recommandations européennes qui visent au respect de l'animal de laboratoire. L'étude a largement porté sur des comparaisons fonctionnelles et anatomiques entre animaux sauvages et génétiquement modifiés, à des stades précis du

développement embryonnaire. Pour minimiser l'impact d'une éventuelle variabilité entre souches murines ou entre portées, les expériences contrôles ont été réalisées sur les animaux sauvages (ou hétérozygotes selon les cas) issus des mêmes portées que ceux portant les modifications génétiques. L'essentiel des lignées ont été entretenues et croisées au sein de l'animalerie centrale du campus CNRS de Gif-sur-Yvette par du personnel qualifié. Les animaux sont élevés dans des cages disposant de capots filtrants et sont changés sous hotte pour garantir un bon état sanitaire, contrôlé régulièrement. La zone d'élevage assure en outre un confinement de type P2 conformément aux recommandations visant à lutter contre la dissémination des organismes génétiquement modifiés. Afin d'effectuer les expériences à des stades développementaux précis, les croisements sont effectués la nuit et la présence d'un bouchon vaginal le lendemain matin définit le stade développemental E0. Les lignées utilisées ont été décrites précédemment (à l'exception de la lignée $\text{Dbx1}^{\text{iresGFP}}$, voir plus bas), et obtenues en collaboration avec les équipes inventrices ou propriétaires.

1.1 - Généralités et terminologie

Il est important de trancher rapidement ici l'ambiguïté intuitive des dénominations d'animaux « génétiquement modifiés », « mutants » et « transgéniques ». Un animal est génétiquement modifié s'il possède une modification de son génome. Le terme de mutation sera ici uniquement employé pour faire référence à une modification qui affecte l'intégrité d'une séquence codante et qui entraîne des conséquences fonctionnelles. Un allèle muté d'un gène produira une protéine altérée ou non-fonctionnelle, ou aucune protéine. Dans nos lignées, la présence d'une seule copie de l'allèle sauvage suffit à l'expression d'une protéine fonctionnelle et à la réalisation de la fonction du gène à l'échelle de l'organisme (haplo-suffisance). Le terme de mutant ne s'appliquera donc pas aux animaux hétérozygotes pour un allèle muté, mais sera réservé aux homozygotes, chez qui la fonction finale du gène est altérée. Ne sont pas non plus mutants les allèles (et les animaux) portant des modifications n'affectant pas directement la fonction des gènes. C'est notamment le cas, avant excision, des constructions permettant une invalidation conditionnelle (lignées lox), mais aussi des insertions dans les régions non codantes de cassettes qui gouvernent l'expression de protéines exogènes (Cre, rapporteur). Un terme approprié (lignée rapporteur, lignée Cre, etc.) sera employé pour définir ces animaux.

Pour être utilisables en élevage, les modifications génétiques doivent être transmissibles à la descendance. Il existe deux techniques principales pour y aboutir. La transgénése est l'une d'entre elles. Elle repose sur l'injection d'une séquence nucléotidique, ou

transgène, directement dans le noyau d'une cellule unique de l'embryon à un stade précoce. Le transgène va s'intégrer de manière aléatoire au génome. Les animaux produits par cette méthode, dits transgéniques, peuvent exprimer de nouveaux gènes ou surexprimer des séquences endogènes. En revanche, le matériel génétique endogène n'étant pas modifié, l'invalidation de séquences codantes, et donc l'obtention de mutants au sens défini ci-dessus, est impossible par cette approche. La production de lignées mutantes requiert la manipulation *in vitro* de cellules souches embryonnaires (ou Embryonic Stem Cells, ES cells), une méthode largement répandue aujourd'hui. Son principal avantage est de permettre des modifications ciblées du génome, dont des excisions de séquences codantes. Le transgène est contenu dans un vecteur et entouré de séquences homologues à celles du locus ciblé. Après injection du transgène à des cellules ES, il s'effectue par recombinaison homologue un échange de fragments d'ADN entre la séquence nucléotidique endogène et celle du transgène. Celui-ci est donc inséré en place de la séquence endogène. Il est ainsi possible d'exciser complètement une séquence endogène et d'invalider sélectivement la fonction d'un gène cible : c'est le Knock-Out ou KO. Les cellules ES recombinées sont sélectionnées et réimplantées dans un blastocyste de souris qui produira un animal chimérique constitué à la fois de cellules sauvages et de cellules issues de la recombinaison. Si ces dernières constituent aussi la lignée germinale, la chimère pourra donner des descendants hétérozygotes. Ces derniers sont qualifiés de fondateurs. Pour beaucoup de lignées, et notamment celles qui font l'objet de notre étude, la perte de fonction ne se manifesterait que chez les individus portant la mutation à l'état homozygote (haplo-suffisance), obtenus par croisement entre fondateurs.

1.2 - Les lignées de souris Knock-Out / Knock-In

1.2.1 - Lignée *Dbx1^{LacZ}*

Cette lignée permet i) de suivre la descendance cellulaire V0 des progéniteurs p0 définis par l'expression de *Dbx1* (animaux hétérozygotes, lignée rapporteur) et ii) de caractériser les altérations fonctionnelles et anatomiques conséquentes à leur absence (homozygotes, mutants nuls). Elle est décrite dans de nombreuses publications qui portent sur le développement embryonnaire de la moelle épinière (Pierani et al., 2000 ; Moran-Rivard et al., 2001 ; Lanuza et al., 2004) ou du cortex (Bielle et al., 2005).

La stratégie employée pour produire cette lignée est le remplacement, par recombinaison homologue, d'une séquence codante par un autre gène : on parle de Knock-Out / Knock-In (ou KO/KI). En effet, la conséquence d'une telle manipulation est double. D'une

part, la séquence codante du gène d'intérêt est délétée (KO). D'autre part, une séquence exogène va s'exprimer sous le contrôle des séquences promotrices du gène endogène délété qu'elle remplace (KI). Dans le cas de cette lignée, une séquence d'environ 4 kpb contenant les exons 1 à 4 du gène *Dbx1* a été remplacée par une cassette comportant notamment le gène *LacZ* qui code pour la protéine Beta-Galactosidase (β -Gal) précédé du signal de localisation nucléaire (*nsLacZ*). La séquence codante de *Dbx1* est donc intégralement excisée. Ses séquences régulatrices, préservées, gouvernent à la place l'expression et l'adressage nucléaire de la β -Gal. Les animaux hétérozygotes (*Dbx1^{LacZ/+}*) ne portent qu'une seule copie de la construction génétique et sont viables, fertiles et sans phénotype fonctionnel. Ils expriment en outre la β -Gal de manière parfaitement chevauchante avec le gène *Dbx1* aux stades précoces de régionalisation dorso-ventrale du tube neural (E9-E10). Aux stades embryonnaires plus tardifs (et vraisemblablement jusqu'à la naissance au moins) l'expression de la β -Gal persiste dans les cellules post-mitotiques issues des progéniteurs *Dbx1⁺*, alors que le gène *Dbx1* lui-même est éteint. Ces animaux constituent donc une lignée rapporteur à court terme du lignage cellulaire dérivant des progéniteurs p0. Les animaux homozygotes (*Dbx1^{LacZ/LacZ}*) ne portent pas de version sauvage du gène *Dbx1* et n'expriment donc pas la protéine *Dbx1* ; il s'agit de mutants *Dbx1* nuls. Le domaine de progéniteurs p0, défini par l'expression de *Dbx1*, ainsi que les interneurons V0 qui en descendent, sont absents. La β -Gal est toujours détectable au sein de certains progéniteurs mais ces derniers possèdent une identité moléculaire caractéristique de domaines adjacents. En l'absence de *Dbx1*, les progéniteurs p0 potentiels ne sont donc pas éliminés mais adoptent une identité différente. Dans la moelle épinière, la mutation nulle de *Dbx1* résulte en la production surnuméraire de neurones post-mitotiques de type dB4 et V1, reflétant les mécanismes d'inhibition entre domaines et types neuronaux adjacents décrits au quatrième chapitre de l'introduction. Ces mutants *Dbx1* nuls se développent normalement mais meurent dès la naissance.

Cette lignée nous a initialement été fournie par le groupe du Dr Alessandra Pierani, Institut Jacques Monod, Paris, puis élevée à Gif-sur-Yvette. Les animaux sont maintenus à l'état hétérozygote sur un fond génétique C57BL6/j par croisements permanents entre mâles hétérozygotes et femelles sauvages obtenues chez un éleveur (Janvier, France). Les expériences sont effectuées à différents stades embryonnaires sur la descendance d'un croisement entre animaux hétérozygotes.

1.2.2 - Lignée *Dbx1^{ires-GFP}*

Cette nouvelle lignée exprime la protéine fluorescente verte Green Fluorescent Protein

(GFP) au sein des cellules exprimant le facteur de transcription Dbx1. Elle permet donc de visualiser directement ces progéniteurs et leur descendance sur du tissu vivant sans passer par des étapes de fixation et d'immunomarquage. Nous y avons fait appel pour caractériser *in vitro* le phénotype fonctionnel des interneurons V0 du générateur respiratoire.

Ces animaux sont produits par l'insertion d'une cassette IRES-GFPpGK-Hygro^r, codant pour la GFP, au niveau de la région non codante 3' UTR du gène Dbx1 (A. Pierani, données non publiées ; cette thèse). Contrairement à la lignée Dbx1^{LacZ} décrite ci-dessus, la GFP n'est pas adressée spécifiquement au noyau. En outre, il s'agit ici d'un KI sans KO : l'insertion ayant lieu au niveau d'une région non codante elle n'affecte pas l'expression du gène associé. Ainsi, même chez les individus homozygotes, la fonction de Dbx1 est préservée et les progéniteurs p0 sont présents normalement. Ils expriment en revanche la GFP, qui comme nous le verrons dans les résultats, persiste au sein de leur descendance cellulaire, au moins jusqu'au stade embryonnaire E15.5.

Les animaux sont élevés et fournis gracieusement par le groupe du Dr Alessandra Pierani, Institut Jacques Monod, Paris. Les croisements sont effectués entre animaux homozygotes, que ce soit pour l'élevage ou pour les expériences.

1.2.3 - Lignée Robo3^{GFP}

Comme pour la lignée Dbx1^{LacZ}, il s'agit d'une lignée KI/KO permettant i) de visualiser les cellules exprimant ou ayant exprimé le gène Robo3/Rig-1 (animaux hétérozygotes Robo3^{GFP/+}, lignée rapporteur) et ii) d'étudier les conséquences de la perte de fonction du gène Robo3 (animaux homozygotes Robo3^{GFP/GFP}, mutants nuls).

La construction génétique est décrite dans Sabatier et al. (2004). Une portion d'environ 12 Kpb du premier exon du gène Robo3 est remplacée par une cassette IRES-TauGFP. Il en résulte une délétion complète de la séquence codante de Robo3 et l'expression et l'adressage aux microtubules (promoteur Tau) de la GFP sous le contrôle des séquences régulatrices de Robo3. Les animaux hétérozygotes sont viables et fertiles et représentent une lignée rapporteur du gène Robo3. Il est à noter cependant que l'expression de la GFP aux stades développementaux nous concernant est trop faible pour une visualisation directe en fluorescence. Cette lignée n'a donc pas permis la caractérisation fonctionnelle des neurones exprimant ou ayant exprimé Robo3. Les animaux homozygotes ne portent aucune version fonctionnelle du gène Robo3 ce qui résulte en l'absence de la protéine Robo3. Bien qu'à première vue normaux à la naissance, les mutants Robo3 nuls ne survivent que quelques heures. La raison de cette mort était jusqu'alors inconnue. Nous verrons dans les résultats que

leur respiration est anormale en raison notamment d'une perte de la synchronisation bilatérale des mouvements diaphragmatiques.

Les animaux sont élevés sur un fond génétique CD-1/129sv à l'état hétérozygote et fournis gracieusement par le groupe du Dr Alain Chedotal, Institut de la Vision, Paris.

1.3 - Lignées « double rapporteur »

Nous avons été amenés à réaliser une lignée qui exprime au sein des cellules $Dbx1^+$ et $Robo3^+$, des protéines rapporteur distinctes, respectivement la β -Gal et la GFP. Cette lignée dite « double rapporteur » a été obtenue par croisement entre des animaux hétérozygotes des lignées $Dbx1^{LacZ}$ et $Robo3^{GFP}$. Enfin, afin d'étudier l'influence de $Dbx1$ sur l'expression de $Robo3$, nous avons croisé cette lignée double rapporteur avec des animaux hétérozygotes de la lignée $Dbx1^{LacZ}$. Parmi les descendants, 1/8 porteront à la fois la mutation nulle pour $Dbx1$ et la construction $Robo3$ rapporteur (animaux $Dbx1^{LacZ/LacZ}$; $Robo3^{GFP/+}$).

1.4 - Les lignées murines conditionnelles

Les progrès des techniques du génie génétique offrent la possibilité d'interagir avec la fonction d'un gène de manière conditionnelle. La modification d'un gène donné ne s'exprimera que si une autre condition est vérifiée. Schématiquement, et pour ce qui nous concerne ici, la mutation d'un gène Y (invalidation ou expression d'une protéine rapporteur) est dite conditionnelle si elle est soumise à l'expression d'un gène X par la même cellule.

Une telle modification conditionnelle des génomes chez la souris est rendue possible par un procédé communément nommé système Cre/lox. Il implique la réalisation de deux lignées murines distinctes qui, une fois croisées, produiront des descendants portant la mutation conditionnelle (Figure 27).

1.4.1 - Généralités sur le système Cre/lox

La Cre est une recombinase de la famille des intégrases du bactériophage P1. C'est une protéine de 38 KDa qui catalyse la recombinaison entre deux sites nucléotidiques de reconnaissance, les sites LoxP (Figure 27). Ces derniers sont des séquences d'ADN de 34 pb comprenant aux extrémités 13 nucléotides palindromiques absentes du génome endogène des eucaryotes. La recombinase Cre fonctionne donc dans les cellules eucaryotes dans lesquelles deux sites LoxP ont été introduits artificiellement. Leur orientation conditionne la conséquence de la recombinaison par la Cre : inversion ou délétion de la séquence contenue entre deux sites LoxP. Nous ne considérerons ici que les cas aboutissant à une délétion.

En pratique, on produit par recombinaison homologue une lignée portant un gène ou

Lignée Cre, portant le gène de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique X.

Lignée floxée, portant un allèle Y conditionnel (entouré de deux sites loxP, ou floxé)

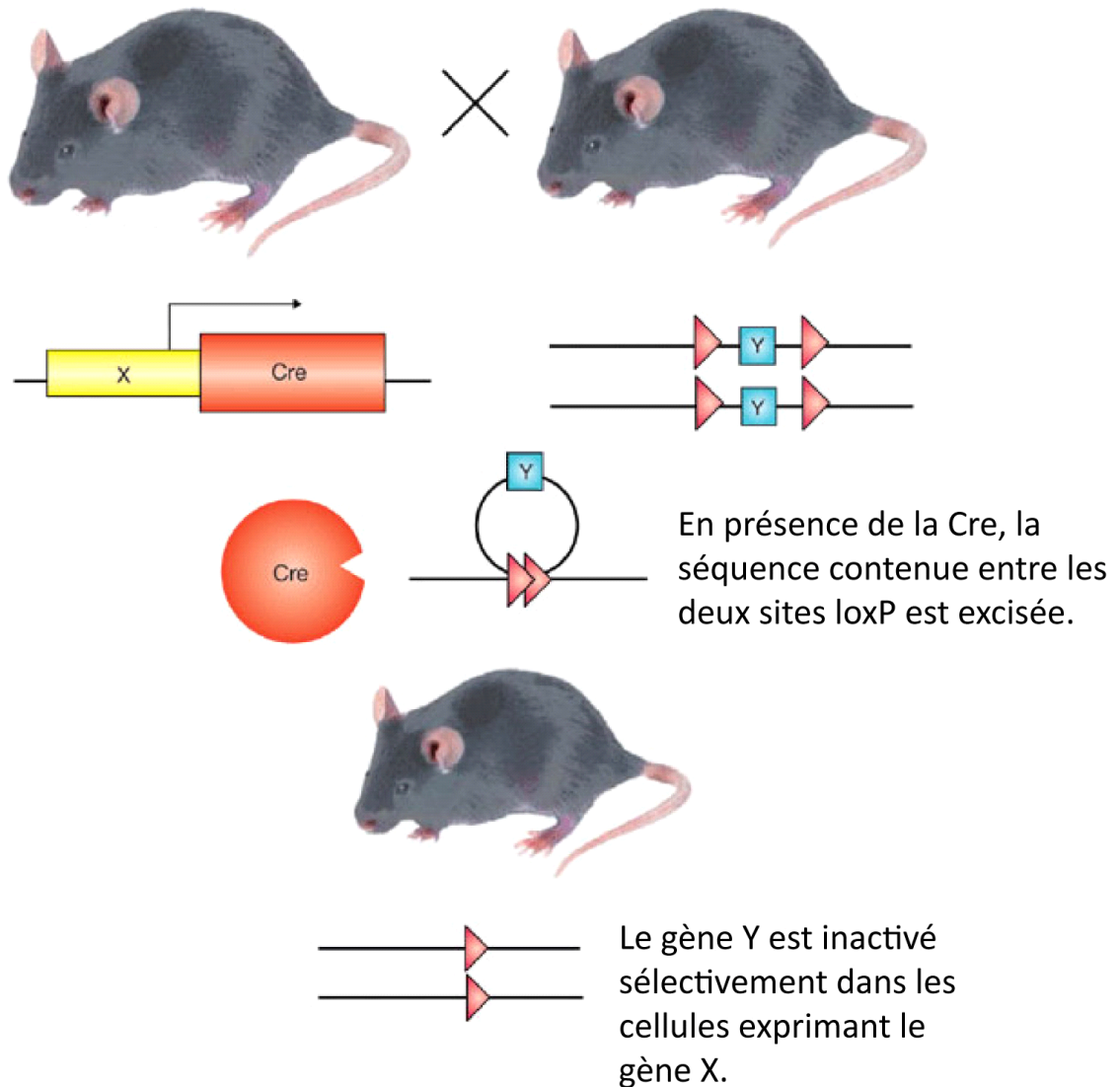


Figure 27 : principes d'obtention d'un mutant conditionnel.

Une lignée Cre, exprimant la recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique X, est croisée avec une lignée floxée, portant un allèle Y entouré de deux sites loxP (flèches rouges). En présence de la recombinase Cre (cercle orange), la portion d'ADN floxé est excisée, entraînant l'inactivation du gène.

une séquence nucléotidique d'intérêt entourée de deux sites LoxP ; on parle de lignée floxée ou encore de lignée lox (Figure 27). En parallèle, une lignée Cre est générée pour exprimer la recombinase sous le contrôle de séquences régulatrices particulières. Chez les animaux héritant des deux constructions après croisement, et uniquement au sein des cellules exprimant les deux gènes qui gouvernent chacune des deux constructions, la séquence entourée des deux

sites loxP sera excisée sous l'action de la recombinase. Comme illustré dans les exemples plus bas, la nature de la séquence floxée conditionne la conséquence phénotypique de l'excision. Si la construction floxée concerne un allèle (allèle conditionnel), la recombinaison conduira à son excision et donc à son invalidation (mutant conditionnel). Cette situation est illustrée à la Figure 27. Alternativement, on peut introduire en un locus précis une séquence codante pour une protéine exogène précédée d'un codon stop floxé. Dans ce dernier cas, la recombinaison conduira à l'expression de la protéine exogène. Cette dernière peut par exemple être une protéine rapporteur ou une toxine interférant avec l'activité, la survie, etc.

1.4.2 - Les lignées Cre

Les lignées Cre utilisées dans cette étude et listées ci-dessous sont des KI produits par recombinaison homologue. Elles ont toutes été validées et détaillées dans les études citées.

1.4.2.1 - La lignée Dbx1::Cre

Ces animaux expriment la Cre recombinase au sein des progéniteurs p0, caractérisés par l'expression de Dbx1. Par recombinaison homologue, une cassette IRES-CRE-pGK-Hygro^r a été insérée dans la région non transcrite 3'UTR du gène Dbx1 (Bielle et al., 2005). Sa spécificité a été vérifiée par croisement avec une lignée rapporteur floxée (Bielle et al., 2005; Dessaud et al., 2010).

Cette lignée nous a été fournie par le groupe du Dr Alessandra Pierani, Institut Jacques Monod, Paris, puis élevée à Gif-sur-Yvette. Les animaux sont maintenus à l'état hétérozygote sur un fond génétique C57BL6/j par croisements permanents entre mâles hétérozygotes et femelles sauvages. Ils sont en parallèle croisés avec la lignée Robo3 floxée (voir plus loin).

1.4.2.2 - La lignée Pax7::Cre

Cette lignée porte une construction qui gouverne l'expression de la recombinase Cre au sein des cellules exprimant le facteur de transcription Pax7. Pour ce faire, une cassette ires-Cre-FRT-Neo-FRT a été insérée au sein de la région non transcrite 3'UTR du gène Pax7. L'expression spécifique de la recombinase a été vérifiée par croisement avec une lignée rapporteur (Keller et al., 2004b; Keller et al., 2004a). Les animaux ont initialement été obtenus en collaboration avec le groupe du Dr Johan Ericson (Karolinska Institute, Stockholm, Suède), puis élevés dans notre animalerie à l'état hétérozygote sur un fond génétique C57BL6.

1.4.3 - Les lignées floxées

1.4.3.1 - La lignée Robo3^{lox}

Cette lignée floxée permet l'invalidation conditionnelle de la fonction du gène *Robo3*. Par recombinaison homologue, deux sites *LoxP* ont été insérés de part et d'autre des exons 12 à 14 du gène *Robo3* (voir Renier et al., 2010). L'excision par la *Cre* génère une protéine *Robo3* interrompue au début du second domaine fibronectine de type III. Privée des domaines transmembranaire et cytoplasmique, cette protéine ne peut exercer son rôle de récepteur.

Les animaux ont été obtenus en collaboration avec le groupe du Dr Alain Chédotal (Institut de la Vision, Paris) puis élevés à Gif-sur-Yvette. Nous les avons maintenus à l'état homozygote (*Robo3^{lox/lox}*) sur un fond génétique C57BL6/j et croisés avec la lignée *Dbx1::Cre* pour générer des doubles hétérozygotes (*Robo3^{lox/+};Dbx1::Cre*). A l'issue du croisement entre les doubles hétérozygotes et des homozygotes *Robo3^{lox/lox}*, nous obtenons (proportion 1/4) des animaux (*Robo3^{lox/lox};Dbx1::Cre*) portant l'invalidation fonctionnelle de *Robo3* sélectivement dans les neurones dérivés des progéniteurs *Dbx1⁺*.

1.4.3.2 - La lignée *Dbx1^{loxP-Stop-LoxP-DTA}*, abrégée *Dbx1^{DTA}*

Cette lignée porte un autre type de construction floxée, permettant l'élimination des cellules exprimant *Dbx1* (Bielle et al., 2005). Une séquence nucléotidique codant pour la toxine diphtérique A (DTA) précédée d'un codon stop floxé, est insérée au sein du locus *Dbx1* (IRES-loxP-stop-pGKneo-loxPDTA). En présence de la recombinase *Cre*, le codon stop est excisé et la DTA s'exprime, conduisant à la mort des cellules qui expriment *Dbx1*.

Les animaux ont été obtenus en collaboration avec le groupe du Dr Alessandra Pierani (Institut Jacques Monod, Paris) puis élevés à Gif-sur-Yvette. Nous les avons maintenus à l'état homozygote sur un fond génétique C57BL6/j. Ils ont été croisés avec des hétérozygotes de la lignée *Pax7::Cre* afin d'éliminer sélectivement les progéniteurs *Dbx1⁺* dorsaux, caractérisés par la co-expression de *Pax7*. Dans ce cas précis, la réalisation préalable de doubles hétérozygotes n'est pas nécessaire. La présence des constructions floxée et *Cre* à l'état hétérozygote chez la moitié des descendants (*Pax7::Cre;Dbx1^{DTA/+}*) suffit à induire chez ces derniers l'expression de la toxine et la mort des cellules.

1.4.4 - Contraintes et limites du système *Cre/lox*

1.4.4.1 - La nécessité de gènes indépendants

Comme nous l'avons vu, l'obtention de mutants conditionnels implique le croisement entre une lignée floxée et une lignée *Cre*. Si les mutations sont introduites par recombinaison homologue, elles affectent des loci ciblés du génome. Dans les situations aboutissant à l'invalidation fonctionnelle d'un gène, il est nécessaire (dans nos lignées) que ses deux allèles

soient excisés (haplo-suffisance). Les animaux mutants attendus sont donc *gèneA::Cre; gèneB^{lox/lox}*. Pour les obtenir, on produit d'abord des animaux doubles hétérozygotes *gèneA::Cre; gèneB^{lox/+}*, parfaitement viables et sans phénotype, qui seront eux-mêmes croisés avec des homozygotes *gèneB^{lox/lox}*. La probabilité d'obtenir des descendants mutants, donc de génotype *gèneA::Cre; gèneB^{lox/lox}*, est égale à la probabilité que le parent double hétérozygote produise des gamètes de type *gèneA::Cre; gèneB^{lox}*. Si les gènes A et B sont génétiquement indépendants, cette probabilité reflétera leur ségrégation aléatoire à la méiose et sera de 25 %. En revanche, si les deux gènes sont situés à proximité sur un même chromosome, ils auront tendance à ségréger ensemble à la méiose ; ils sont dits génétiquement liés. La probabilité d'un évènement de recombinaison entre eux est inversement proportionnelle à la distance qui les sépare. Or, la production de gamètes de type *gèneA::Cre; gèneB^{lox}* chez le parent double hétérozygote requiert un évènement de crossing-over entre les gènes A et B. S'ils sont liés, la probabilité de réalisation de cet évènement diminue donc considérablement, d'autant plus qu'ils sont proches. Dans notre étude, nous souhaitons invalider spécifiquement le gène *Vlglut2* au sein du lignage dérivant des progéniteurs *Dbx1⁺*. Nous proposons de croiser la lignée *Dbx1::cre* avec une lignée *Vglut2^{lox}* (Voir Wallen-Mackenzie et al., 2006). Malheureusement, chez la souris ces deux gènes sont portés par le chromosome 7 et sont séparés de seulement 2 Mpb (*Dbx1*, MGI:94867 ; *Vglut2/Sc117a6*, MGI:2156052). L'obtention d'animaux invalidés était alors hautement improbable. Une alternative serait de disposer d'une lignée *Dbx1::Cre* obtenue par transgénèse. La recombinase, alors placée aléatoirement dans le génome mais toujours sous le contrôle des séquences régulatrices de *Dbx1*, pourrait co-habiter au sein de cellules homozygotes pour la construction floxée. A ma connaissance, une telle lignée n'est pas disponible à l'heure actuelle.

1.4.4.2 - Contraintes temporelles

Une seconde contrainte inhérente à l'utilisation du système Cre/lox est liée à l'expression dynamique des gènes. Cela est particulièrement exacerbé au cours du développement embryonnaire, où certains gènes ne sont exprimés que pendant des durées très courtes, allant de quelques heures à quelques jours à peine. Pour que l'excision d'une construction floxée se manifeste d'un point de vue fonctionnel, elle doit avoir lieu à un stade où le gène en amont est exprimé. Le cas échéant, la séquence génomique modifiée après l'excision ne serait pas traduite et la protéine invalidée, la toxine, ou la protéine rapporteur ne s'exprimerait pas. Ainsi, le gène gouvernant la recombinase doit être exprimé avant (persistance de la protéine), ou en même temps que l'expression du gène portant la construction floxée.

1.5 - Génotypage des animaux

Le génotypage permet de détecter pour chaque animal la présence de la construction (mutation ou insertion), et la nature hétérozygote ou homozygote de celle-ci. Il est réalisé à partir de tissu embryonnaire prélevé pendant la dissection puis congelé, ou sur un échantillon de queue prélevé entre les stades P7 et P15 pour les animaux de l'élevage. L'échantillon est décongelé puis lysé par la protéinase K à 55°C pendant la nuit et l'ADN génomique en est extrait à l'aide d'une colonne de purification (Qiagen). Alternativement, l'échantillon peut être complètement digéré par incubation dans 100 µl de soude 50 mM pendant 20 min à 95 °C. Cette méthode nettement plus rapide assure aussi la libération de l'ADN nucléaire, sans pour autant le séparer des autres constituants cellulaires. Cinquante µl de Tris-HCl 1M pH 7-8 sont ensuite ajoutés pour tamponner le milieu. Dans tous les cas, le génotypage est réalisé par la méthode de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR). Des amorces sont choisies pour initier l'amplification sélective des séquences génomiques caractéristiques de chaque lignée. Les produits de la PCR sont déposés sur un gel d'agarose 1,5 % et donnent des bandes de tailles caractéristiques selon qu'il s'agisse de la forme sauvage ou de la forme modifiée du gène. Les séquences des amorces ainsi que les tailles des produits de PCR attendus pour chaque lignée sont récapitulées dans la Table I.

Lignée	Séquences détectées	Amorces (5'>3')	Taille des bandes	Tm	
Dbx1LacZ	WT	Sens : GAGGATGAGGAAATCACGGTG	200 pb	66 °C	
		Antisens : GCAAGGAAATGTCTCTGGGAC			
Mut.	Mut.	GATCGGCCATTGAACAAGATG	100 pb		
		AGAGCAGCCGATTGTCTGTTG			
Robo3GFP	WT	TACCAGCTACTTCCAGAGAG	220 pb	60 °C	
		CCAACATCGAGTGGTACAAG			
	Mut.	Mut.	GATCTCTCGTGGGATCATTG		400 pb
			TACCAGCTACTTCCAGAGAG		
Robo3Lox	Cassette	CCAAGGAAAACTTGAGGTTGCAGCTAG	200 pb	62 °C	
		GATTAGGGGAGGTGAGACATAGGG			
Dbx1DTA	Cassette	GGCGTGGTCAAAGTGACGTATC	300 pb	60 °C	
		CGATTTCTGCACAGGCTTG			
Lignées Cre	Cassette	GTCCAATTTACTGACCGTACACC	700 pb	60 °C	
		GTTATTCGGATCATCAGCTACACC			

Table I : amorces utilisées pour le génotypage. Pour chaque lignée, la présence de la séquence mutante (Mut.) ou de la cassette insérée est détectée par un couple d'amorces spécifiques. Quand il est nécessaire de différencier les animaux hétérozygotes des homozygotes, un second couple d'amorces amplifie la séquence sauvage (WT). Tm : température d'hybridation optimale pour le couple d'amorces.

2 - Investigations fonctionnelles *in vivo*

Notre recherche des conséquences fonctionnelles d'altérations génétiques du développement embryonnaire du tronc cérébral sur la genèse de l'activité respiratoire requiert en premier lieu l'analyse du phénotype ventilatoire de l'animal intact à la naissance. Cette étape est abordée par la méthode de la pléthysmographie globale, mise au point par Bartlett and Tenney (1970). L'animal entier est placé dans une chambre d'enregistrement hermétiquement fermée et reliée à une chambre de référence de volume identique via une sonde différentielle de pression très sensible. Le principe de la méthode repose sur le réchauffement et l'enrichissement en vapeur d'eau de l'air au cours du cycle respiratoire. L'air expiré est plus chaud et contient plus de vapeur d'eau que l'air inspiré. A volume constant, ces variations vont induire des modifications de pression dans la chambre d'enregistrement par rapport à la chambre de référence. Ces variations de pression sont recueillies par la sonde différentielle, converties en signaux électriques, et numérisées dans l'ordinateur avec une fréquence d'échantillonnage de 1 KHz. Les paramètres respiratoires accessibles sont (Figure 28): la fréquence (fr), le volume inspiratoire (V_T), les temps d'inspiration (T_i) et d'expiration (T_e) et le volume minute (V_m).

En pratique, les chambres d'enregistrement et de référence sont constituées d'une seringue de 50 mL, afin de s'adapter à la petite taille des souris nouveau-nées ou aux stades fœtaux tardifs. Le volume des chambres peut ainsi être précisément ajusté avec le piston de la seringue. Les animaux, libres de leurs mouvements, sont placés dans la chambre d'enregistrement et leur activité ventilatoire est enregistrée pendant 2 à 3 minutes. Les températures de la chambre d'enregistrement et de l'animal sont mesurées avant chaque enregistrement. A l'issue de l'enregistrement, une portion de la queue est prélevée pour réaliser le génotypage.

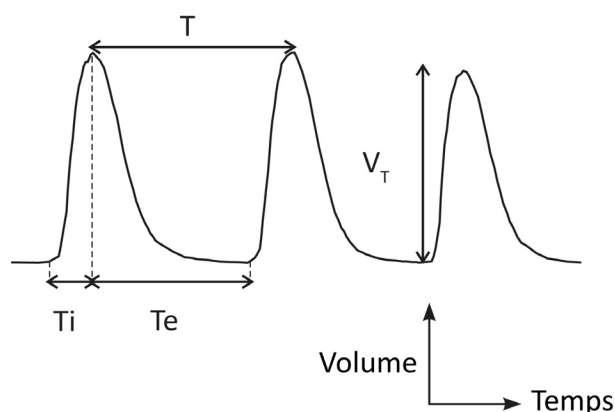


Figure 28 : mesure des paramètres respiratoires par pléthysmographie *in vivo*.

La déflexion vers le haut correspond à l'inspiration, la déflexion vers le bas à l'expiration. Chaque pic correspond à un cycle respiratoire complet. La distance entre deux points équivalents de deux pics successifs, ou période (T), est l'inverse de la fréquence (f). L'amplitude d'un pic correspond au volume inspiratoire. Le temps mis pour atteindre le maximum du pic en partant de la ligne de base est le temps d'inspiration (T_i), le temps mis pour revenir à la ligne de base est le temps d'expiration (T_e).

Pour les enregistrements au stade P0, tous les nouveau-nés de la portée sont placés successivement dans la chambre d'enregistrement. Ils sont ensuite remis avec la femelle allaitante. Pour les enregistrements à E18.5, les fœtus sont obtenus par césarienne (voir plus loin) et sont immédiatement déposés à l'air libre sur du coton chaud et humide et délicatement stimulés avec les doigts. Typiquement, les premières minutes suivant la césarienne sont caractérisées par l'existence de rares activités respiratoires très amples, associées à un mouvement de l'ensemble de l'animal. Assimilables à des soupirs ou suffocations, ces activités peuvent être évoquées par le pincement de la queue. Une ventilation rapide, spontanée, d'amplitude bien moindre et comparable à celle des nouveaux nés aux stades P0 se met en place dans les 15 minutes suivant la césarienne. Les enregistrements pléthysmographiques sont réalisés dès qu'une telle activité est visuellement détectée chez plus de la moitié des fœtus de la portée. Les animaux présentant une ventilation anormale, ou qui ne ventilent pas du tout, sont placés en premier dans le pléthysmographe pour disposer d'enregistrements avant leur mort éventuelle. En parallèle, une attention toute particulière leur est portée pour s'assurer qu'ils sont en vie (mouvements des membres en réponse à un pincement de la queue) et pour tenter de récupérer le déficit. Si leur ventilation s'améliore, ils font l'objet d'une deuxième série d'enregistrements. Si aucune activité ventilatoire ne se met en place dans les 15 minutes suivant la césarienne, ils sont disséqués afin de vérifier l'activité cardiaque et de prélever le tronc cérébral en vue de marquages immunohistochimiques.

Les enregistrements sont réalisés sur le logiciel ELPHY, développé par Gérard Sadoc (CNRS, UNIC). Dans la présente étude, la fréquence respiratoire est le seul paramètre étudié, et il est directement calculé par le logiciel. Il sera exprimé dans les résultats en cycles par minute (ou breath/min). Pour la réalisation des figures, une portion représentative de l'enregistrement, c'est-à-dire dénuée d'artéfacts liés à des mouvements de l'animal dans la chambre, est sélectionnée et le tracé correspondant est exporté vers Adobe Illustrator.

3 - Investigations fonctionnelles in vitro

3.1 - Préparations

Pour s'assurer de l'origine centrale des déficits respiratoires détectés à la naissance par les enregistrements pléthysmographiques, nous avons enregistré l'activité de type respiratoire générée *in vitro* par les préparations de tronc cérébral isolé ou de tranche transversale contenant le preBötC. Chez la souris, ces activités sont détectées à partir du stade E15.5

(Thoby-Brisson et al., 2005, 2009). Tous les enregistrements fonctionnels ont donc été réalisés à ce stade.

3.1.1 - Prélèvement des embryons

Les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale. Une incision de la paroi abdominale met en évidence les cornes utérines qui sont rapidement prélevées et placées dans du Liquide Cérébro-Spinal Artificiel (LCSA) refroidit à 4°C, préalablement saturé en oxygène avec du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) et de composition suivante (en mM) : 120 NaCl ; 8 KCl ; 0,58 NaH₂PO₄ ; 1,15 MgCl₂ ; 1,26 CaCl₂ ; 21 NaHCO₃ ; 30 Glucose, pH 7.4. Les embryons sont ensuite extraits des cornes utérines et des sacs embryonnaires puis placés à 16-18°C dans du LCSA oxygéné en continu jusqu'à leur utilisation expérimentale.

3.1.2 - La préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolé

Cette préparation, dérivée de celle mise au point par Suzue en 1994, fait appel à l'une des caractéristiques essentielles du rythme respiratoire : il résiste à l'isolement *in vitro*. Dans le cadre de la présente thèse, elle est utilisée i) pour enregistrer par électrophysiologie l'activité motrice de la racine cervicale C4 ; ii) pour visualiser, par imagerie calcique de la surface ventrale, les activités des neurones moteurs faciaux et de l'oscillateur respiratoire para-facial embryonnaire (e-pF). Ces deux méthodes peuvent être appliquées simultanément sur la même préparation.

La microchirurgie est effectuée sous loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et de micro-ciseaux. Afin de permettre une approche ventrale, l'embryon est fixé sur le dos par des minuties dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert de sylgard et remplie de LCSA refroidi à 4°C et préalablement saturé en oxygène. Les mouvements spontanés et les pulsions cardiaques permettent de s'assurer avant la dissection que l'embryon est vivant. Le museau et la cage thoracique sont retirés, suivis par les os, encore en formation, du plancher de la boîte crânienne et de la face ventrale des vertèbres. Le tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière sont alors visibles. Le tronc cérébral est totalement dégagé du mésenchyme environnant par une section caudale réalisée au niveau de la moelle épinière (rostral à la racine C6) et une section rostrale à l'intersection méso-rhombencéphalique. Au niveau dorsal le cervelet est retiré, laissant apparaître le 4^{ème} ventricule, qui fait partie des repères anatomiques visuels utilisés lors de la préparation des tranches transversales. Enfin, pour permettre la visualisation de l'activité des groupes neuronaux de la surface ventrale, la pie-mère, méninge la plus interne, est délicatement retirée.

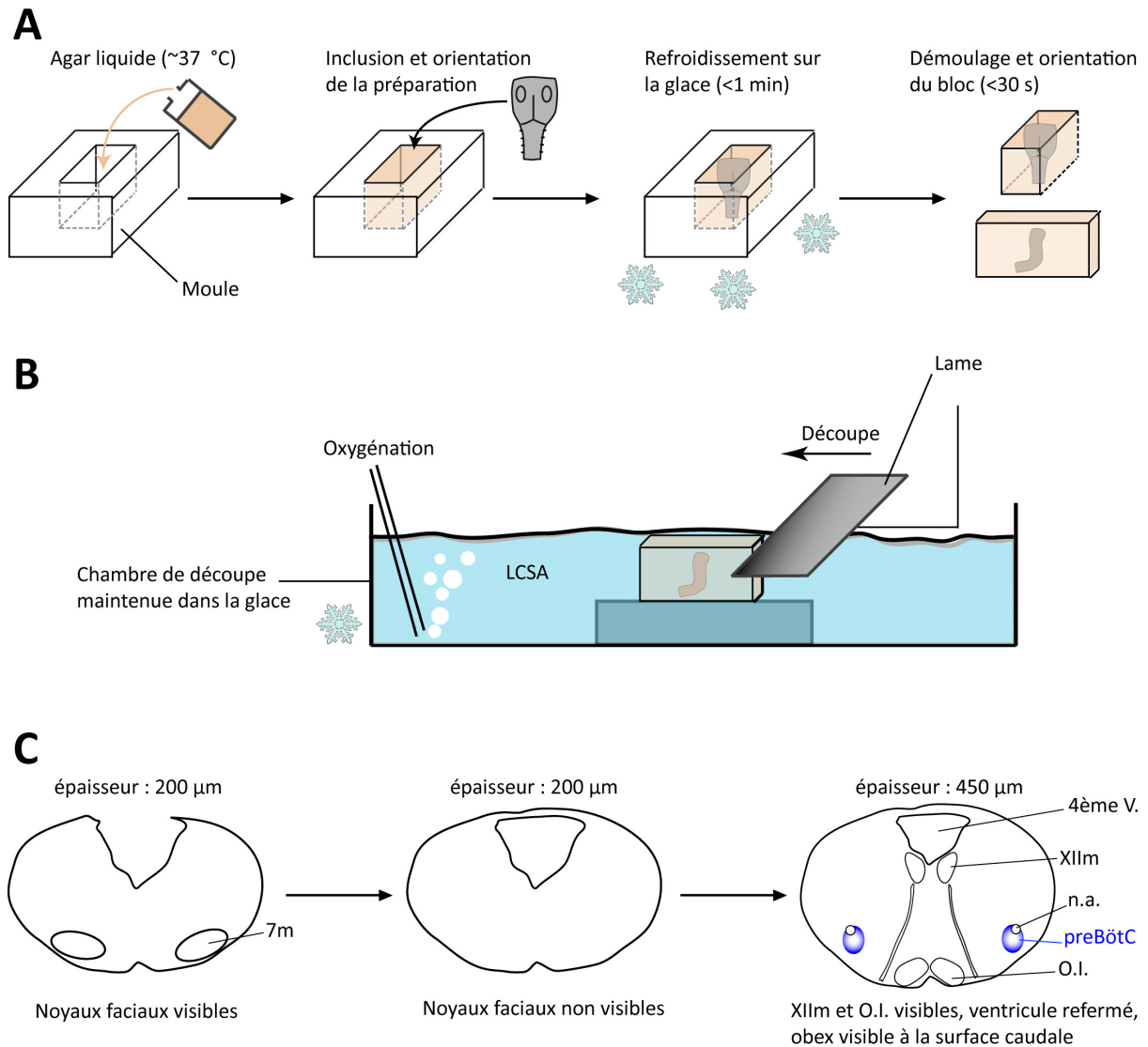


Figure 29 : protocole de préparation de tranche transversale de tronc cérébral contenant le preBötC.

(A) Représentation schématique du protocole d'inclusion du tronc cérébral dans un bloc d'agar en vue de la découpe au vibratome. De l'agar à bas point de fusion (orange) préparé à 4 % dans du LCSA est chauffé au micro-ondes (37 °C) puis versé dans un moule en sylgar. La préparation y est placée et orientée face rostrale vers le haut. L'ensemble est rapidement refroidi sur la glace. Lorsque l'agar est partiellement solidifié, le bloc contenant le tronc cérébral est démoulé. Ce dernier est éventuellement découpé si l'orientation n'est pas optimale.

(B) Représentation schématique de l'orientation du bloc dans la chambre du vibratome. Le bloc contenant le tronc cérébral est collé sur un support amovible puis plongé dans la chambre de découpe d'un vibratome remplie de LCSA (en bleu) à 4 °C et continuellement oxygéné. Les sections sont réalisées dans le sens rostro-caudal depuis la bordure dorsale (vers la droite sur le dessin). Les tranches sont récupérées à l'aide d'une spatule.

(C) Représentation schématique des repères anatomiques utilisés. L'image de gauche illustre la dernière tranche contenant les noyaux moteurs faciaux. Dès que ces derniers ne sont plus visibles (tranche du milieu), on réalise une tranche d'une épaisseur de 450 µm (à droite), contenant le preBötC à sa surface rostrale (en bleu foncé). Les structures représentées sur le schéma, à l'exception du preBötC, sont clairement visibles en lumière réfléchie. L'agar entourant les tranches (non représenté) n'est pas enlevé.

7m : noyau moteur facial ; 4^{ème} V. : 4^{ème} ventricule ; XIIIm : noyau moteur de l'hypoglosse ; n.a. : noyau ambigu ; preBötC : complexe preBötzingier ; O.I. : olive inférieure.

3.1.3 - La tranche transversale contenant le preBötC

Cette préparation s'inspire de celle réalisée par Smith et al. en 1991. Chez l'embryon, la faible taille et la consistance molle des tissus nécessitent une étape supplémentaire d'inclusion du tronc cérébral dans un bloc d'agarose (Thoby-Brisson et al., 2005, Figure 29).

Le tronc cérébral est tout d'abord isolé selon la méthode décrite ci-dessus puis il est ensuite rapidement inclus dans un gel d'agarose à bas point de fusion (4% dans du LCSA) préalablement liquéfié par chauffage au micro-onde à 35-40°C (Figure 29A). Le bloc contenant le tronc cérébral est rapidement refroidi sur la glace, collé sur un support côté rostral vers le haut, puis immédiatement immergé dans la cuve d'un vibratome (Leica VT1000S) contenant du LCSA maintenu à 4°C et oxygéné en continu (Figure 29B). Sous contrôle binoculaire, le bloc contenant le tronc cérébral isolé est sectionné de manière transversale depuis l'extrémité rostrale par pas de 200 µm, jusqu'à l'obtention de tranches portant les repères anatomiques (Figure 29C). Notamment, les noyaux moteurs faciaux sont largement visibles en lumière réfléchie, et sont présents sur 2 à 3 sections successives. Dès l'obtention d'une tranche dépourvue des noyaux faciaux, une tranche de 450 µm est réalisée. Cette tranche se situe donc approximativement 200 µm en arrière des noyaux faciaux. Le preBötC est accessible à sa surface rostrale. La face caudale se situe à la limite caudale du 4^{ème} ventricule.

3.2 - Enregistrement des activités

Après dissection et découpe éventuelle, la préparation est immédiatement placée dans la chambre (volume total 3 mL) du poste d'enregistrement. Le tronc cérébral est déposé face ventrale vers le haut ; la tranche est déposée face rostrale vers le haut. Les préparations sont maintenues sous une grille de nylon. Le poste d'enregistrement est constitué d'un microscope photonique droit (Nikon E-600FN) équipé d'une caméra (Photometrics CoolSnap HQ), et aménagé pour permettre un renouvellement continu de la chambre en LCSA thermostaté à 30°C et oxygéné (Figure 30). Une période de 30 minutes est respectée avant le début des enregistrements afin de permettre au tissu de se réchauffer et de récupérer de la chirurgie.

3.2.1 - Electrophysiologie

Trois types d'enregistrements électrophysiologiques sont mis en œuvre : i) l'enregistrement de nerfs sur des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolé pour caractériser l'activité des sorties motrices respiratoires; ii) des enregistrements de populations neuronales sur tranches pour détecter l'activité du preBötC et iii) des enregistrements en patch-clamp sur tranches pour caractériser l'activité de neurones unitaires.

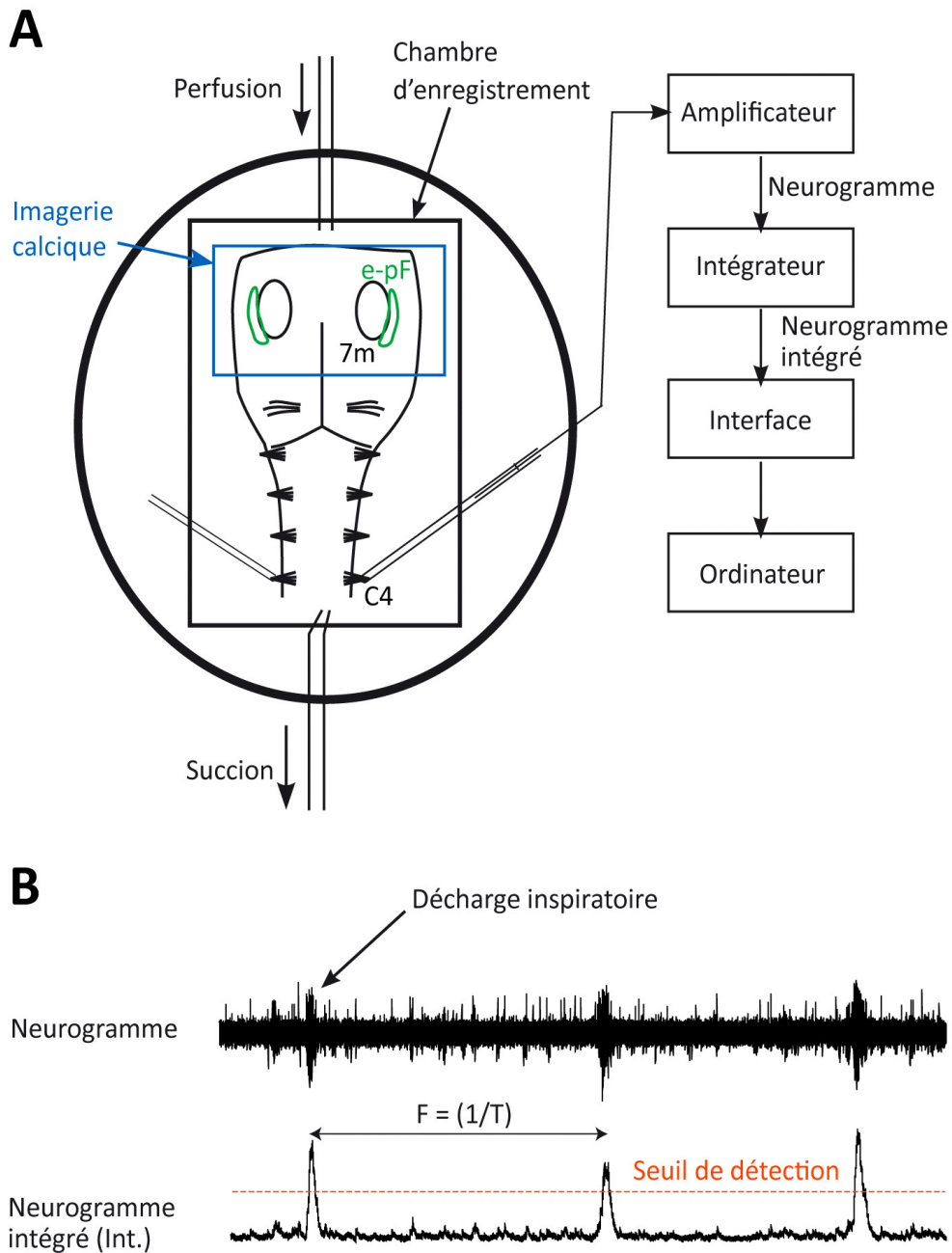


Figure 30 : enregistrement des activités rythmiques *in vitro* sur une préparation de tronc cérébral isolé.

(A) Représentation schématique du système d'enregistrement. La préparation est placée dans une chambre d'enregistrement, contenant du LCSA oxygéné et thermostaté à 30 °C. Un système de perfusion et de succion maintient le volume de la chambre à 2 ml et assure un renouvellement continu du LCSA et donc de l'oxygénation du tissu. Des micropipettes de verre (électrodes de succion) sont positionnées sur chacune des racines cervicales 4 (C4) et sont connectées via un fil d'argent à un amplificateur. Le signal recueilli, ou neurogramme, est intégré puis enregistré dans un ordinateur via une interface. Simultanément, on peut visualiser les activités des nerfs moteurs faciaux (7m) et/ou de l'oscillateur parafacial embryonnaire (e-pF, en vert) par imagerie calcique (le rectangle bleu représente un exemple de champ d'observation à faible grossissement).

(B) Exemples de signaux recueillis. Le neurogramme est issu de l'amplificateur et correspond à l'activité des fibres nerveuses contenues dans la micropipette de verre. Le neurogramme intégré, noté Int. dans les figures des résultats, correspond au même signal après intégration (constante de temps : 100 ms). La fréquence (F) de l'activité rythmique correspond à l'inverse de l'intervalle de temps (T) entre deux pics d'activité successifs (décharges inspiratoires), détectés automatiquement (logiciel pClamp9) par rapport à un seuil (ligne pointillée orange).

3.2.1.1 - Enregistrements des nerfs

Le diaphragme, muscle inspiratoire principal, est innervé par le nerf phrénique. Dans les préparations de tronc cérébral isolé, l'activité des racines nerveuses C4 et C5 constitue donc une trace fidèle de l'activité respiratoire. L'ensemble des racines ventrales est repérable en microscopie optique à faible grossissement. L'enregistrement est réalisé à l'aide d'électrodes de succion, constituées de micropipettes de borosilicate étirées (Clark GC 120 TF, Pangbourn, UK ; étireuse Flaming-Brown modèle P97, Sutter Instruments) puis cassées pour présenter un diamètre d'environ 150 μm à l'extrémité, remplies de LCSA et connectées via un fil d'argent à un amplificateur à haut-gain (Grass, 7P511). Le neurogramme obtenu constitue la somme des activités unitaires de chacune des fibres nerveuses constituant le nerf. Ce signal est filtré (bande passante 3 Hz-3 KHz), intégré (Neurolog System, constante de temps 100 ms), puis enregistré sur un ordinateur via une interface analogique/numérique (Digidata 1322A, Molecular Devices, fréquence d'échantillonnage 10 KHz) et le logiciel pClamp 9 (Molecular Devices). Les données étant directement transférées sur disque dur, il est possible de réaliser des enregistrements continus d'une durée en principe illimitée. Le poste dispose de deux circuits d'enregistrement distincts ; il est donc possible d'acquérir simultanément l'activité de deux racines, notamment de part et d'autres de la ligne médiane. En outre, le signal brut (neurogramme) est envoyé vers un amplificateur audio, permettant l'écoute des activités.

3.2.1.2 - Enregistrements des populations neuronales

L'enregistrement des populations neuronales constitue une première méthode d'enregistrement de l'activité du preBötC isolé dans une tranche transversale. Des électrodes de verre similaires aux électrodes de succion utilisées pour capturer l'activité des racines nerveuses sont positionnées directement à la surface rostrale de la tranche, dans la région ventrolatérale (voir Figure 31A). Le circuit électrique est identique à celui décrit dans le paragraphe ci-dessus. L'électrode est déplacée à l'aide du micromanipulateur jusqu'à obtention d'un signal optimal. De même, il est ici possible d'enregistrer simultanément les activités des deux preBötC situés de part et d'autre de la ligne médiane.

3.2.1.3 - Enregistrements des cellules unitaires

Les enregistrements unitaires de neurones du preBötC ont été utilisés pour caractériser le profil de décharge de cellules dérivant des progéniteurs p0. Les expériences ont donc été réalisées sur des tranches transversales d'embryons issus de la lignée Dbx1^{iresGFP}, à l'aide d'un système d'illumination en épifluorescence. Une cellule GFP⁺ dans la région ventrolatérale est repérée en fluorescence puis enregistrée en patch-clamp configuration cellule-entière sous

contrôle visuel en lumière infrarouge et contraste d'interférence différentielle (DIC). Les électrodes de patch sont fabriquées à partir de tubes de verre borosilicate contenant un filament (Clark GC 150 TF, Pangbourn, UK), étirés et remplis d'une solution intracellulaire de composition suivante (en mM) : 123 K-Gluconate ; 21 KCl ; 0,5 EGTA ; 3 MgCl₂ ; 4 Na₂-ATP ; 10 HEPES, pH = 7.2, et contenant 1 mg/mL de biocytine (Molecular Probes, Eugene, OR). La résistance de ces électrodes est d'environ 6-7 MΩ. Les signaux sont recueillis à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices) et enregistrés sur l'ordinateur.

3.2.2 - *Imagerie calcique*

L'approche par imagerie calcique permet i) à faible grossissement, de détecter visuellement les zones actives sur les deux types de préparations (Figure 31A), ii) à fort grossissement, d'analyser l'activité unitaire de plusieurs cellules simultanément dans une région d'intérêt (Figure 31B). Les préparations (trons cérébraux ou tranches) sont incubées pendant 40 min dans une solution de LCSA oxygéné contenant 2% (vol/vol) de diméthylsulfoxyde (DMSO), 0,2 % (vol/vol) de crémosphore et l'indicateur calcique fluorescent Calcium Green 1-AM (CaG, Molecular Probes) à la concentration de 10 μM. Le groupement acétométhoxyester (AM) rend la sonde perméante. Une fois dans la cellule, celui-ci est hydrolysé par les estérases endogènes, ce qui piège définitivement la sonde dans le cytoplasme. Le CaG a précédemment été utilisé pour détecter les activités respiratoires aux stades post-nataux (Koshiya and Smith, 1999) et aux stades embryonnaires (Thoby-Brisson et al., 2005, 2009, voir aussi la revue de (Ruangkittisakul et al., 2009). Tant à l'échelle du réseau neuronal qu'à l'échelle cellulaire, les variations de fluorescence détectées sont le reflet de l'activité électrophysiologique (Figure 31). Après incubation, les préparations sont transférées dans la chambre d'enregistrement et une période de récupération d'environ 30 min est respectée avant le début des acquisitions. Pour l'imagerie calcique des cellules GFP⁺ sur les tranches de la lignée Dbx1^{GFP}, la préparation est placée directement dans la chambre d'enregistrement avant incubation dans l'indicateur calcique. Une image à fort grossissement des cellules GFP⁺ est capturée, ainsi que le champ correspondant en DIC. Des régions d'intérêt correspondant aux cellules GFP⁺ sont dessinées puis sauvegardées. La préparation est alors incubée dans le CaG, remise dans la chambre d'enregistrement et le champ initial est recherché en DIC. Parmi les cellules marquées au CaG, celles qui expriment la GFP⁺ sont identifiées en rappelant les régions définies avant l'incubation. Dans tous les cas, les variations de fluorescence au cours du temps sont capturées pendant des périodes de 1 à 3 minutes par la caméra CCD (100 ms d'exposition, mode simultané) pilotée par le logiciel Metamorph. Pour

les illustrations, les séquences sont converties en pourcentage de variations de fluorescence par rapport à la fluorescence initiale ($\Delta F/F$) et une table de fausse couleur est appliquée. Les tracés sont obtenus à l'aide d'un module complémentaire du logiciel ELPHY développé par Gérard Sadoc (CNRS, UNIC). Ce même logiciel assure le calcul des fréquences par détection automatique assistée des pics de fluorescence. Un filtre coupe-bas est appliqué aux tracés destinés aux figures pour s'affranchir de la décroissance de fluorescence au cours du temps (photo-bleaching). Les montages sont effectués dans Adobe Illustrator.

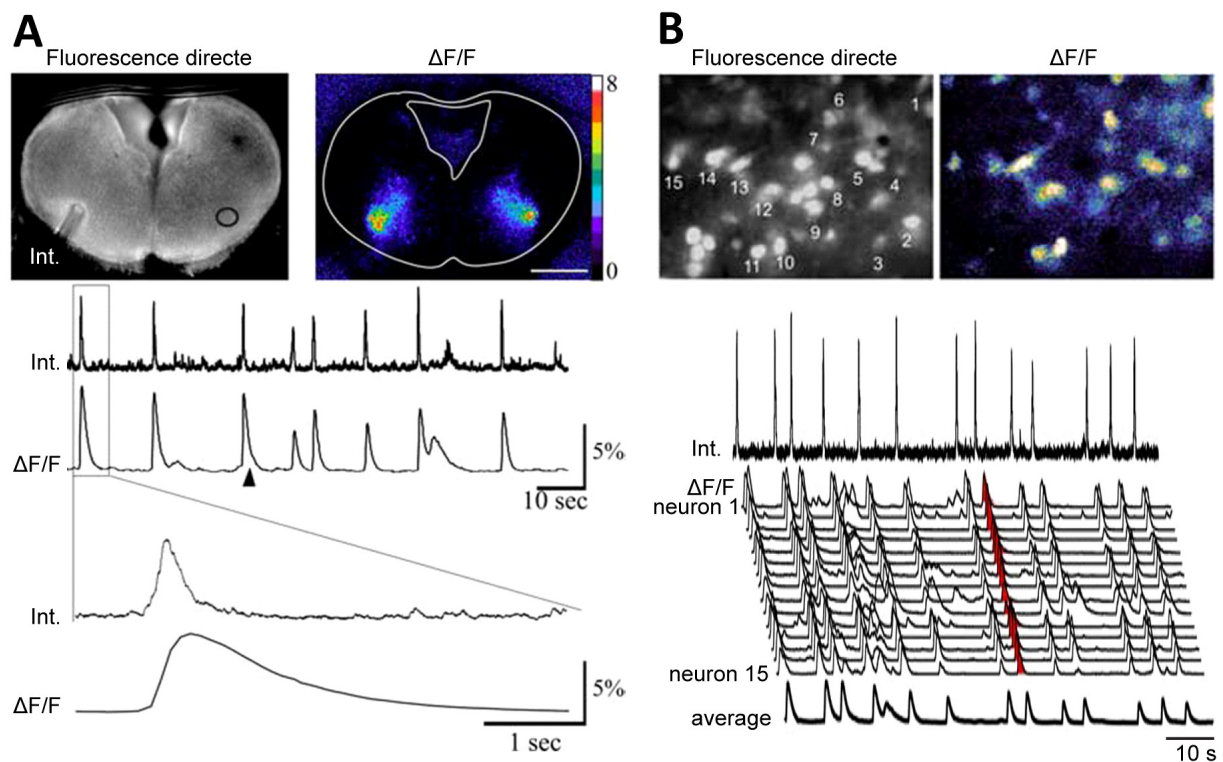


Figure 31 : enregistrement de l'activité du preBötC générée *in vitro* au sein d'une tranche transversale par électrophysiologie et imagerie calcique.

La préparation est une tranche (450 μm) d'embryon au stade E15.5, incubée dans 10 μM de Calcium-Green 1-AM selon la méthode décrite dans le texte.

(A) Les images illustrent, à faible grossissement, la fluorescence basale émise par l'indicateur calcique (fluorescence directe, à gauche) et le pourcentage de variation de fluorescence représenté en pseudo-couleurs ($\Delta F/F$, à droite) pendant une décharge inspiratoire. La zone ventrolatérale caractérisée par une intensité de fluorescence plus élevée correspond au preBötC. L'activité électrophysiologique de la population neuronale est enregistrée simultanément à l'aide d'une électrode de verre apposée directement sur le preBötC de gauche (image de gauche, Int.). Les deux séries de traces sont les signaux électrophysiologiques intégrés (Int., traces du haut) dérivés de l'électrode, et de fluorescence ($\Delta F/F$, traces du bas) correspondant à la région du preBötC de droite (cercle noir sur l'image de gauche). Les variations de fluorescence sont parfaitement concomitantes des décharges électrophysiologiques enregistrées par l'électrode.

(B) Observations à plus fort grossissement (40x) dans la région du preBötC. Les variations de fluorescence de 15 neurones individuels ($\Delta F/F$, neurone 1 à 15) déchargeant en phase avec l'activité de la population neuronale (Int.) sont représentées.

Adapté de Thoby-Brisson et al., 2005.

4 - Investigations anatomiques

Les marquages anatomiques par immunohistochimie ont été un outil essentiel aux travaux présentés dans cette thèse. D'une part, sur les lignées rapporteur, ils ont permis de caractériser la contribution des lignages cellulaires issus de progéniteurs particuliers aux neurones constitutifs du générateur central du rythme. Des immunomarquages multiples, dirigés à la fois contre des marqueurs moléculaires du preBötC (NK1R, Sst) et la (ou les) protéine(s) rapporteur(s) (GFP, β -Gal) ont été réalisés sur des coupes coronales fines (20 μ m) de tronc cérébral fixé. D'autre part, les altérations fonctionnelles résultantes de l'absence sélectives d'un lignage (mutants simples ou conditionnels) ont été caractérisées par la même approche. Enfin, nous avons mis au point une méthode permettant de mettre en évidence les neurones commissuraux du preBötC et les projections axonales qu'ils émettent, par une technique d'injection unilatérale d'un neurotraceur, la biocytine.

4.1 - Préparation des tissus

Pour les expériences aux stades E15.5 à E18.5, le prélèvement du tronc cérébral est effectué comme décrit plus haut. Celui-ci est ensuite fixé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du Tampon Phosphate-Sodium (PBS) à 4°C pour une durée de 2 à 4h, sous agitation légère. Pour les marquages au stade E10.5, l'embryon entier est plongé dans le fixateur. A l'issue de cette étape de fixation, les tissus sont brièvement rincés dans du PBS. Ils subissent ensuite une étape de cryoprotection pendant une à deux nuits dans une solution de PBS contenant 30% de sucrose. Les tissus sont ensuite positionnés précisément dans un cube en plastique contenant un milieu de montage (OCT). L'ensemble est rapidement congelé aux alentours de -40 °C dans une solution d'isopentane refroidie par de la carboglace. Cette astuce d'incubation est comparable à la méthode décrite plus haut pour l'inclusion des troncs cérébraux dans l'agare en vue de la découpe au vibratome (Figure 29). Les cubes obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation ou découpés immédiatement.

4.2 - Découpe des sections au cryostat

Les tissus congelés dans le milieu OCT sont démoulés et positionnés sur le porte-objet d'un cryostat afin de réaliser des coupes coronales. La température est constamment maintenue à -20 °C. L'ensemble du tronc cérébral (ou de l'embryon) est découpé depuis l'extrémité rostrale en sections de 20 μ m. Les sections sont récupérées alternativement sur 2 ou 3 jeux de lames, de telle sorte que les sections se succédant sur une lame donnée sont séparées de 40 ou

60 µm respectivement. Cette astuce permet de disposer de plusieurs jeux de lames contenant les sections correspondantes du même animal. Les sections sont rapidement séchées à l'air puis sont immédiatement immunomarquées ou congelées à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

4.3 - Protocole d'immunomarquage

Il s'agit d'un protocole classique d'immunomarquage indirect en fluorescence. Il se déroule selon les étapes suivantes :

- Décongélation des sections : température ambiante, 10 min.
- Rinçages en PBS : température ambiante, 5 min, agitation légère. Incubation dans un milieu bloquant et perméabilisant constitué d'une solution de PBS supplémentée par 5 % (vol/vol) de sérum fœtal de veau (Fœtal Bovine Serum, FBS) et de 0.2 % (vol/vol) Triton X-100 : deux fois 20 min, température ambiante, agitation légère.
- Incubation dans les anticorps primaires (Table II), préparés dans le milieu bloquant : 12-48 h, 4 °C.
- Rinçages dans du milieu bloquant : 3 fois 5 min, 4 °C, agitation robuste.
- Incubation dans les anticorps secondaires (Table III), préparés dans le milieu bloquant : 30 min, 4 °C, agitation légère, dans l'obscurité.
- Rinçages dans du PBS : 3 fois 5 min, 4 °C, agitation robuste, dans l'obscurité.
- Séchage : température ambiante, 10 min, dans l'obscurité.
- Montage entre lame et lamelle dans un milieu stabilisant la fluorescence et contenant éventuellement l'indicateur nucléaire DAPI (Vectashield + DAPI, H-1200, Vector Labs). Si les observations doivent être repoussées, les lames sont conservées à 4°C dans l'obscurité quelques jours.

Les lames sont scannées à l'aide des raies laser à 488, 561 et 633 nm sur un microscope confocal/bi-photonique Leica SP2 piloté par le logiciel Leica Confocal Software. Le DAPI est excité avec un laser bi-photonique réglé sur 750 nm. Un séparateur de faisceaux acoustico-optique (Acousto-Optic Beam Splitter, AOBS) permet la détection de la lumière émise dans des gammes très précises du spectre et minimise les interférences (qui se manifestent notamment par la capture du signal d'un fluorophore par un photomultiplicateur dédié à un autre fluorophore) pouvant conduire à l'observation de faux-positifs. En cas de persistance de ces artéfacts, les acquisitions sont réalisées en mode séquentiel (illumination d'un fluorophore à la fois). Pour réaliser les comptages cellulaires dans la région du preBötC (voir plus bas), un objectif de grossissement 40x, fournissant un champ de 300 µm par 300 µm est utilisé. Dans ce

cas, 3 ou 4 coupes optiques sont effectuées pour scanner l'intégralité de la profondeur de la section, puis une projection maximale est réalisée. Les images sont capturées en 1024*1024 pixels 8 bits et transférées dans ImageJ ou Adobe Photoshop pour réaliser les projections et l'édition. Pour les images destinées aux illustrations, un filtre anti-bruit est appliqué dans Adobe Photoshop (rayon 2) et une optimisation du contraste et de la luminosité est effectuée manuellement.

Antigène reconnu	Espèce	Fabriquant, référence	Dilution finale
NK1R	Lapin	Sigma, S8305	1:5000
Sst (somatostatine 14)	Lapin	Peninsula Lab, T-4103	1:500
β -Galactosidase	Poulet	Abcam, ab9361	1:1000
GFP	Poulet	Aves, GFP-1020	1:1000
GFP	Lapin	Invitrogen, A11122	1:2000
Islet 1,2	Souris	DHSB, 39,4D5c	1:500
Pax3/7	Chèvre	Santa Cruz, sc-7748	1:200
Evx1	Cochon d'Inde	Coll. Thomas. Jessell	1:6000
Lbx1	Lapin	Coll. Thomas. Jessell	1:1000
Dbx1	Lapin	Coll. A. Pierani	1:10000
Phox2b	Lapin	Coll. JF Brunet	1:800

Table II : références des anticorps primaires utilisés. Tous les anticorps sont conservés à -20°C dans des aliquots destinés à une utilisation unique.

Espèce reconnue	Espèce	Fluorophore associé	Fabriquant, référence
Lapin	Ane	Alexa 488	Molecular Probes
Lapin	Ane	Cy-5	Jackson IR 711-176-152
Lapin	Chèvre	Alexa 555	Invitrogen, A21428
Poulet	Chèvre	Alexa 488	Invitrogen, A11039
Poulet	Chèvre	Cy-5	Jackson IR, 703-176-155
Souris	Chèvre	Cy-3	Abcam, ab6945
Souris	Chèvre	Cy-5	Abcam, ab6563
Cochon d'Inde	Ane	Cy-3	Jackson IR, 706-166-148
Cochon d'Inde	Ane	Cy-5	Jackson IR, 706-176-148
Chèvre	Ane	Alexa 594	Invitrogen, A21467

Table III : références des anticorps secondaires utilisés. Tous les anticorps sont conservés à -20°C dans des aliquots destinés à une utilisation unique et sont utilisés à une dilution finale de 1:500.

4.4 - Localisation anatomique du preBötC

Dans cette étude, nous avons été confrontés à la dualité des définitions du preBötC. D'une part, nous l'étudions à la fois d'un point de vue fonctionnel sur des tranches épaisses, avec le critère essentiel du maintien d'une activité spontanée lorsqu'il est isolé, et d'un point

de vue anatomique sur des sections fines, avec le critère essentiel de la présence de neurones exprimant NK1R et/ou Sst. Il nous fallait définir des critères permettant que ces deux approches considèrent la même région confinée du tronc cérébral. D'autre part, nous avons été amenés à comparer des lignées sauvages à des lignées qui ne présentent pas de mouvements respiratoires à la naissance et chez qui le preBötC n'est pas détectable, que ce soit du point de vue anatomique ou fonctionnel. Il nous fallait établir des critères définissant la région du preBötC le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral chez les différentes lignées, même en l'absence des traits fonctionnels et anatomiques classiquement associés à l'oscillateur.

L'activité spontanée caractéristique du preBötC isolé dans une tranche transversale est présente dans une région ventrale et médiane au noyau ambigu (n.a.) qui peut être intégralement contenue dans un carré de 300 μm par 300 μm , positionné de telle sorte que sa bordure dorsolatérale jouxte la bordure ventrale du n.a. D'un point de vue antéro-postérieur, l'activité rythmique est systématiquement détectée à la surface rostrale d'une tranche de 450 μm d'épaisseur effectuée 200-250 μm (E15.5) ou 250-300 μm (E18.5) en arrière de la limite caudale des noyaux moteurs faciaux (voir section 3.1.3 et Figure 28). D'un point de vue anatomique, ce niveau axial délimite la frontière rostrale d'une colonne de neurones NK1R⁺ bordant ventralement le n.a. et s'étendant caudalement sur environ 300 μm . A partir du stade E18.5, des corps cellulaires Sst⁺ sont détectables en position ventromédiane du n.a. dans les sections correspondantes. Les anticorps anti-NK1R et anti-Sst ayant tous deux été produits chez le lapin, nous n'avons pas pu décrire le chevauchement entre ces deux populations aux stades embryonnaires. Il n'en demeure pas moins que les cellules exprimant l'une ou l'autre de ces protéines semblent localisées aux mêmes niveaux axiaux et peuvent être largement contenues aux deux stades embryonnaires dans un carré de 300 μm par 300 μm .

L'ensemble de ces observations suggère qu'une région délimitée par un carré de 300 μm de côté bordant ventrolatéralement le n.a., située 200-250 μm en arrière des noyaux faciaux et s'étendant sur 300 à 350 μm rostralement satisfait à la fois les critères fonctionnels et anatomiques du preBötC. Nous emploierons le terme de « région du preBötC » (ou « preBötC area ») pour y faire référence.

Les comptages cellulaires ont été effectués dans la région du preBötC ainsi définie. Quand cela était possible, la détection de NK1R ou Sst était systématiquement incluse au protocole d'immunomarquage. Le cas échéant, ces protéines sont révélées sur des sections alternées du même tronc cérébral. Chez les animaux dépourvus de cellules NK1R⁺ ou Sst⁺, la région du preBötC est uniquement définie selon la distance par rapport aux noyaux faciaux.

Les comptages sont effectués dans le même carré de 300 μm de côté, positionné ventrolatéralement au n.a.

Dans tous les cas, les neurones exprimant un marqueur donné sont comptés dans cette région, sur un minimum de trois, et un maximum de neuf sections successives couvrant entre 120 μm et 360 μm d'extension rostro-caudale respectivement. Chaque type de marquage est répété sur un minimum de 3 animaux (n). Les neurones positifs pour le marqueur considéré sont comptés manuellement à l'aide du module complémentaire « cell-counter plug-in » dans ImageJ. Pour chaque animal, on obtient ainsi un nombre moyen de neurones par section. La moyenne de celui-ci entre animaux donne le nombre moyen global de cellules par section, exprimé dans les résultats. Les barres d'erreur des histogrammes représentent l'écart standard à la moyenne (s.e.m.). Pour calculer les pourcentages, le nombre total de cellules, comptées sur l'ensemble des animaux, a été considéré. Tous les comptages sont effectués sur des projections (maximum) de 3 ou 4 coupes optiques. Les coupes optiques individuelles, et éventuellement les observations à plus fort grossissement, sont observées en parallèle pour s'assurer de la co-localisation.

4.5 - Marquage rétrograde des neurones commissuraux du preBötC

Le preBötC contient des neurones commissuraux, projetant à la fois vers l'oscillateur contra-latéral ainsi que vers des groupes respiratoires plus rostraux (BötC, pFRG) et plus caudaux (VRG). Nous avons développé une méthode permettant de marquer sélectivement les neurones commissuraux qui assurent, dans le plan de la tranche, la connectivité entre les deux preBötC de part et d'autre de la ligne médiane.

L'approche repose sur des injections unilatérales de Biocytine, une vitamine communément utilisée pour tracer les projections neuronales. La biocytine a été dissoute à 2 mg/ml dans de l'eau contenant 2% (vol/vol) de DMSO. Quelques μg de Fast-Green FCF (sigma) ont été ajoutés pour obtenir une solution colorée, visible sous la loupe binoculaire. A l'aide d'une microélectrode de patch cassée (diamètre à l'extrémité de 10 à 20 μm), la solution est injectée par pression continue. Afin de restreindre spatialement le site d'injection, une pipette de succion connectée à une pompe est apposée à proximité de la pipette d'injection pour aspirer continuellement toute la solution qui ne pénétrerait pas le tissu (Figure 32). L'injection est réalisée directement dans la région du preBötC sur une tranche transversale de 450 μm obtenue selon les critères décrits ci-dessus et maintenue dans une chambre de perfusion assurant des conditions physiologiques similaires à celles utilisées pour les enregistrements. La micropipette d'injection est positionnée immédiatement ventralement et

latéralement au n.a., visible en lumière transmise sous la loupe binoculaire. L'injection a lieu pendant 45 minutes, en vérifiant et ajustant régulièrement l'écoulement de la solution et l'efficacité de la pipette de succion. A l'issue de l'injection, la préparation est maintenue dans la chambre de perfusion pendant environ 2 h, puis fixée dans du paraformaldéhyde 4%. Pour les illustrations, le protocole d'immunomarquage est réalisé sur les tranches entières. Pour les comptages cellulaires, la tranche de 450 μm est congelée puis sectionnée en sections de 20 μm . Les neurones rétro-marqués à la biocytine sont comptés dans la région du preBötC contralatérale au site d'injection selon la méthode décrite ci-dessus. En sommant le nombre de cellules marquées par section pour toutes les sections, on obtient le nombre de cellules par tranche initiale de 450 μm , ou nombre de cellules par preBötC exprimé dans les résultats. La biocytine est détectée pendant le protocole d'immunohistochimie (voir matériels et méthode des articles) par de l'extravidine couplé à un fluorophore (FITC ou Cy3).

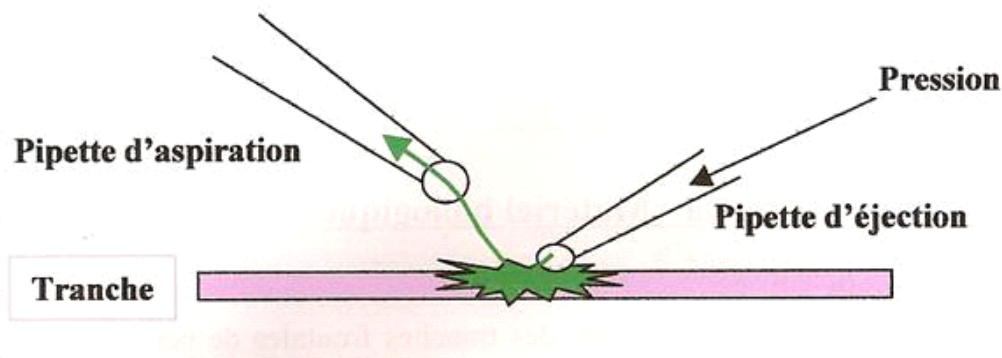


Figure 32: représentation schématique de la procédure d'injection de biocytine par pression.

Une micropipette de verre fine (injection, à droite) est reliée à un système délivrant de la pression en continu à partir de l'air comprimé du bâtiment. Le tissu est injecté en apposant directement la pipette d'injection à la surface de la tranche. Une pipette plus large (à gauche) est connectée à une pompe et assure en continu l'aspiration du colorant en excès.

Résultats

I. ORIGINE EMBRYONNAIRE DES NEURONES DU PREBÖTC

Ce premier chapitre renferme l'essentiel des résultats obtenus pendant cette thèse. Il s'agit de l'identification du rôle crucial joué par les interneurones dérivant des progéniteurs caractérisés par l'expression du facteur de transcription à homéodomaine *Dbx1*. Pour une grande partie, ils ont très récemment fait l'objet d'une publication, incluse dans ce chapitre. Je présenterai ensuite quelques données complémentaires qui serviront à alimenter certains paragraphes de la discussion.

1 - Présentation du problème

L'enjeu de mes travaux était l'identification d'un programme génétique aboutissant à la spécification de neurones d'importance fonctionnelle au sein de l'oscillateur respiratoire principal, le preBötC.

A mon arrivée au laboratoire, des résultats préliminaires suggéraient qu'en dépit de sa position ventrale au sein du bulbe, le preBötC ne semble pas dériver des progéniteurs les plus ventraux. Son programme de spécification serait en outre distinct de celui aboutissant aux neurones du groupe respiratoire para-facial (Thoby-Brisson et al., 2009). Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'oscillateur renferme des populations de neurones commissuraux, qui pourraient être chevauchantes avec celles directement impliquées dans la rythmogenèse. Nous avons donc proposé d'étudier la contribution de progéniteurs connus pour donner naissance à des interneurones commissuraux.

Dans la moelle épinière ventrale, deux sources des neurones commissuraux ventraux ont été décrites. D'une part, les progéniteurs p3 caractérisés par l'expression de *Nkx2.2/Nkx2.9* (Briscoe et al., 1999; Goulding et al., 2002) donnent naissance aux interneurones commissuraux de la classe V3 identifiables par l'expression du facteur de transcription *Sim-1*. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'élaboration d'une activité locomotrice coordonnée entre les moitiés droite et gauche de la moelle épinière (Zhang et al., 2008). Pour autant, les interneurones V3 sont absents du tronc cérébral, où le domaine p3 est topologiquement remplacé par le domaine de progéniteurs donnant naissance aux neurones moteurs du système végétatif (domaine pVMN, Briscoe et al., 1999; Pattyn et al., 2000; Pattyn et al., 2003b; Pattyn

et al., 2003a). La seconde population de neurones commissuraux dans la moelle épinière ventrale est issue du domaine p0 caractérisé par l'expression de Dbx1 (Pierani et al., 1999; Moran-Rivard et al., 2001; Pierani et al., 2001). Ils sous-tendent les mécanismes d'inhibition réciproque nécessaires à l'alternance des décharges entre les effecteurs des côtés droit et gauche de l'organisme (Lanuza et al., 2004). Nous avons donc entrepris l'investigation de la contribution des progéniteurs Dbx1-positifs et de leur descendance, les interneurones V0, à la rythmogenèse respiratoire et/ou à la synchronisation bilatérale des activités.

2 - Résultats de la publication résumés en français

Cette étude adresse la contribution des progéniteurs neuraux p0, caractérisés par l'expression du facteur de transcription Dbx1, et leur descendants cellulaires, les interneurones V0, à la rythmogenèse respiratoire chez la souris.

Les animaux portant la mutation nulle de Dbx1 (*Dbx1^{LacZ/LacZ}*) meurent dès la naissance en raison d'une absence de mouvements respiratoires. Nous démontrons l'origine centrale de ce déficit *in vitro*, par une approche fonctionnelle associant enregistrements électrophysiologiques et imagerie calcique. Alors qu'il est rythmiquement actif dès le stade embryonnaire E15.5 chez les animaux contrôles, le complexe preBötzinger (preBötC), oscillateur respiratoire principal, est dépourvu de toute activité chez les mutants Dbx1 nuls. Ces observations démontrent que Dbx1 est requis pour la rythmogenèse centrale et la survie à la naissance.

Dans un deuxième temps, sur des lignées rapporteur (*Dbx1^{LacZ/+}* et *Dbx1^{iresGFP}*), nous montrons qu'une population d'interneurones V0 est retrouvée à partir du stade E15.5 dans la région anatomique correspondant au preBötC (ci-après dénommée région du preBötC ou "preBötC area" dans l'article). Ces cellules présentent un profil de décharge caractéristique de neurones respiratoires. En outre, une large fraction des neurones glutamatergiques (exprimant Vglut2) dans la région du preBötC, y compris ceux exprimant le récepteur NK1R et la Somatosatine (Sst), considérés comme essentiels à la rythmogenèse, est dérivée des progéniteurs Dbx1⁺. Ces cellules ne sont pas spécifiées (NK1R, Sst) ou leur nombre est dramatiquement réduit (Vglut2) chez les mutants Dbx1 nuls. Ces déficits cellulaires sont très probablement à l'origine du phénotype fonctionnel. Ces observations montrent que les interneurones V0 sont directement impliqués dans la rythmogenèse et constituent les populations cellulaires glutamatergiques critiques de l'oscillateur.

Nous montrons en outre que les déficits fonctionnels et anatomiques résultant de la perte de fonction de *Dbx1* ne sont pas retrouvés après ablation sélective (*Pax7::cre;Dbx1^{DTA}*) des progéniteurs *Dbx1⁺/Pax7⁺* de la moitié dorsale du domaine p0. En outre, sur des embryons issus de la lignée rapporteur *Dbx1^{LacZ/+}*, nous retrouvons dans la région du preBötC de nombreux neurones V0 exprimant *Evx1*, seul marqueur post-mitotique connu des interneurons issus de la moitié ventrale (interneurones V0_V). Ces observations suggèrent que les constituants essentiels de l'oscillateur sont de la classe neuronale V0_V.

Nous avons par ailleurs mis en évidence un déficit de connectivité commissurale au sein du preBötC chez les mutants *Dbx1* nuls, suggérant que le domaine p0 donne naissance aux interneurons commissuraux de l'oscillateur. Cette hypothèse a été confirmée par deux approches. D'une part, le traçage des projections axonales révèle qu'une large fraction des neurones du preBötC projetant du côté contralatéral est de nature V0. D'autre part, l'inactivation sélective au sein du lignage V0 du gène *Robo3* (*Dbx1::cre;Robo3^{loxP}*), nécessaire, dans l'ensemble du tronc cérébral, au déploiement des projections axonales commissurales, conduit à la désynchronisation bilatérale des activités générées à l'échelle du preBötC.

En conclusion, ces travaux montrent les populations neuronales constitutives de l'oscillateur sont dérivés des progéniteurs *Dbx1⁺*. La descendance de ces derniers assure, au sein du preBötC, la genèse du rythme et sa synchronisation bilatérale, deux traits vitaux du comportement respiratoire.

3 - Publication

Hindbrain Interneurons and Axon Guidance Signaling Critical for Breathing

Julien Bouvier, Muriel Thoby-Brisson, Nicolas Renier, Véronique Dubreuil, Johan Ericson, Jean Champagnat, Alessandra Pierani, Alain Chédotal & Gilles Fortin

Nature Neuroscience. 2010 Sep;13(9):1066-74.

Publié en ligne le 2 Août 2010 (doi:10.1038/nn.2622).

Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing

Julien Bouvier¹, Muriel Thoby-Brisson^{1,8}, Nicolas Renier^{2-4,8}, Véronique Dubreuil⁵, Johan Ericson⁶, Jean Champagnat¹, Alessandra Pierani⁷, Alain Chédotal²⁻⁴ & Gilles Fortin¹

Breathing is a bilaterally synchronous behavior that relies on a respiratory rhythm generator located in the brainstem. An essential component of this generator is the preBötzinger complex (preBötC), which paces inspirations. Little is known about the developmental origin of the interneuronal populations forming the preBötC oscillator network. We found that the homeobox gene *Dbx1* controls the fate of glutamatergic interneurons required for preBötC rhythm generation in the mouse embryo. We also found that a conditional inactivation in *Dbx1*-derived cells of the *roundabout homolog 3* (*Robo3*) gene, which is necessary for axonal midline crossing, resulted in left-right de-synchronization of the preBötC oscillator. Together, these findings identify *Dbx1*-derived interneurons as the core rhythmogenic elements of the preBötC oscillator and indicate that *Robo3*-dependent guidance signaling in these cells is required for bilaterally synchronous activity.

Breathing is a motor behavior generated by a respiratory rhythm-generating network located in the brainstem that produces a synchronous bilateral drive onto cranial and spinal populations of motor neurons that innervate cranial, thoracic and abdominal respiratory muscles¹. A functional respiratory network is necessary for survival at birth and respiratory-like movements and respiratory-like network activity in the brainstem are detected before birth. In fetal and newborn rodents, the respiratory rhythm-generating network consists of two distinct, but functionally coupled, oscillators: the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) and the preBötC. Previous work in the mouse embryo revealed that the embryonic parafacial (e-pF) oscillator (the forerunner of the RTN/pFRG) and the preBötC emerge independently at distinct anterior-posterior positions close to the facial branchiomotor nucleus and to the nucleus ambiguus, respectively². The e-pF and preBötC become active sequentially; the e-pF becomes active at E14.5 and the preBötC becomes active at E15.5, with the e-pF coupling to it². It was recently found in multiple mutant mice in which the RTN/pFRG does not form²⁻⁴ that one of its roles is to increase the frequency of the respiratory rhythm-generating network through entrainment of the preBötC, which in turn controls the motor output.

Little is known about the developmental origin and molecular determinants of preBötC neurons. The preBötC, which was first identified functionally⁵, is anatomically characterized as a collection of glutamatergic neurons in the ventral respiratory column, located beneath the nucleus ambiguus, that express the neurokinin type1 receptor (NK1R)⁶ and somatostatin (*Sst*)^{7,8}. Accordingly, chemical ablation of NK1R⁹ preBötC neurons or genetic/viral silencing of *Sst*-positive preBötC neurons¹⁰ stops breathing in rats.

Mafb mutants are the only mouse mutants in which the preBötC is disrupted¹¹, but the early widespread expression of *Mafb* in the caudal hindbrain leaves open the possibility that impaired development of other structures contributes to the lethal respiratory phenotype of these mutants. Previously, we found an 'absent breathing' phenotype that was associated with a defective preBötC oscillator after disruption of the type 2 vesicular glutamate transporter (*Vglut2*, also known as *Slc17a6*) in the conditional *Nestin::cre; Vglut2^{loxP/loxP}* mutant¹². However, the global and nonselective disruption of glutamatergic transmission in these mice precluded evaluation of the specific contribution of preBötC neurons to the breathing deficit.

The bilateral synchronization of the preBötC is likely to rely on commissural projections^{7,8,13,14}, including those arising from glutamatergic NK1R⁷ and *Sst*^{7,8} neurons. However, the molecular mechanisms underlying commissural connectivity of the preBötC have not been addressed. Several recent studies have shown that the development of many commissural projections is controlled by *Robo3* (also known as *Rig1*) in the mammalian hindbrain and spinal cord¹⁵⁻¹⁹.

In vertebrates, the intricate spatial order of diverse neuronal types, which is essential to the subsequent formation of functional circuits, arises from transcriptional codes coordinating anterior-posterior and dorsal-ventral patterning of the neural tube^{20,21}. Distinct classes of interneurons and motor neurons differentiate in relation to the expression of homeodomain proteins in progenitor domains at defined locations in the neural tube²². In mammals, the role of transcriptionally identified commissural interneurons in regulating the function of neural networks has been best characterized at the level of the central pattern generator that controls locomotion in the spinal cord²³. There,

¹Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR 3294, Gif-sur-Yvette, France. ²INSERM, U968, Paris, France. ³UPMC Univ Paris 06, UMR S968, Institut de la Vision, Paris, France. ⁴CNRS, UMR 7210, Paris, France. ⁵CNRS, UMR 7216, Université Paris Diderot, Paris, France. ⁶Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. ⁷Institut Jacques Monod, CNRS UMR 7592, Université Paris Diderot, Paris, France. ⁸These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.P. (pierani.alessandra@ijm.univ-paris-diderot.fr), A.C. (alain.chédotal@inserm.fr) or G.F. (gilles.fortin@inaf.cnrs-gif.fr).

Received 2 June; accepted 22 July; published online 2 August 2010; doi:10.1038/nn.2622

ARTICLES

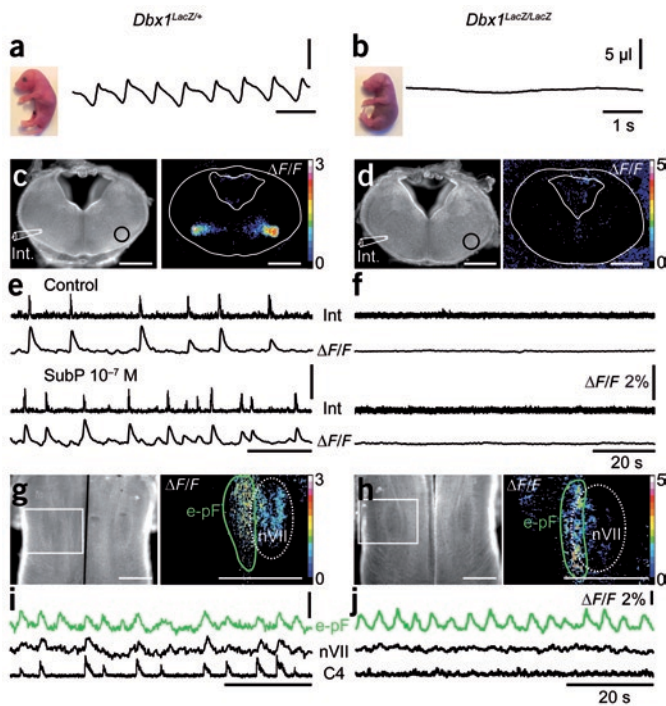


Figure 1 Disrupted breathing and rhythm generation in the preBötC of *Dbx1* null mice. (a,b) Plethysmographic recordings of the ventilation of *Dbx1^{LacZ/+}* (a) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (b) E18.5 embryos 1 min after surgical delivery. All of the *Dbx1^{LacZ/+}* mice initiated respiratory cycles of inspirations (upward deflections) and expirations (downward deflections), whereas none of the *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice showed any sign of ventilation and all died cyanotic. (c,d) Bilateral rhythmic fluorescence changes ($\Delta F/F$) of the preBötC in E15.5 slice preparations (c, dorsal at top) were absent in the mutant (d). (e,f) Corresponding concurrent electrophysiological (Int) and optical ($\Delta F/F$) recordings. Spontaneous preBötC rhythmic bursts increased in frequency in the presence of substance P (SubP) in *Dbx1^{LacZ/+}* preparations (e). The preBötC was inactive in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* preparations and could not be induced by SubP (f). (g,h) Calcium imaging of the ventral surface in E15.5 *Dbx1^{LacZ/+}* (g) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (h) whole hindbrain preparations. Rhythmic activity of the e-pF oscillator (green outline), partially coupled at this stage to that of facial motor nucleus (nVII, white dotted outline), was maintained in the *Dbx1* null mutant. (i,j) Simultaneous optical recordings of the e-pF (green) and of the nVII (black) and electrophysiological recording of the fourth cervical spinal root (C4) in *Dbx1^{LacZ/+}* (i) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (j) preparations. The rhythmic activity of the e-pF was unaffected in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* preparations, albeit in the absence of any activity of the motor outputs. All scale bars in images represent 500 μ m.

the absence of so-called ventral V0 or V3 classes of interneurons that originate from progenitor cells P0 and P3, respectively, which express the *Dbx1* and *Nkx2.2/Sim1* genes, correlates with impaired left-right alternation²⁴ and impaired robustness of the symmetrical left-right patterning of locomotor activity¹⁹. Analogous to the spinal cord, and considering that V3 interneurons are absent at the level of the hindbrain, where the P3 progenitor domain is replaced by a domain that gives rise to visceral motor neurons^{25–28}, we considered the progeny of *Dbx1*-expressing P0 progenitors to be candidate preBötC neurons and investigated the respiratory outcome of a null mutation of the *Dbx1* gene²⁹.

We used several transgenic mouse lines to identify the origin of preBötC neurons and the molecular identity of their embryonic progenitors. We found that rhythm generation by the preBötC depends on the homeobox gene *Dbx1*, which is expressed in the P0 neural progenitor domain of the hindbrain^{29,30}. *Dbx1* ablation completely silenced the preBötC and caused a massive loss of preBötC glutamatergic neurons, including all of the NK1R- and Sst-positive interneurons. *Dbx1*-dependent neurons ensured not only rhythmicity, but also bilateral synchrony of the preBötC, where *Robo3* signaling was required for these cells to project to the contralateral preBötC. The selective disruption of *Robo3* in the descendants of *Dbx1*-positive progenitors resulted in a preBötC featuring asynchronous left-right rhythmicity. This suggests that the core preBötC (that is, the collective of cells insuring its two essential properties: rhythm generation and bilateral synchrony) arises from the *Dbx1*-positive progenitor domain. Thus, *Dbx1*, beyond its classical role in the regionalization of the neuroepithelium and specification of neuronal subtypes, acts as an important regulator for the assembly of a vital oscillator network.

RESULTS

***Dbx1* null mutants do not breathe**

At birth, *Dbx1* null (*Dbx1^{LacZ/LacZ}*) mutants had a beating heart, but showed no breathing movements, turned cyanotic and died within minutes of delivery (Fig. 1). *Dbx1* heterozygous (*Dbx1^{LacZ/+}*) and wild-type littermates initiated breathing (frequency (*f*) = 80.2 \pm 7.7 breaths per

min, *n* = 10 from 3 litters) immediately after birth or on delivery from uterine horns on embryonic day 18.5 (E18.5; Fig. 1a), but *Dbx1^{LacZ/LacZ}* pups (E18.5, *n* = 7; postnatal day 0, *n* = 3) failed to do so (Fig. 1b). At E15.5, the onset of so-called fetal breathing², electrophysiological recordings and calcium imaging of *Dbx1^{LacZ/LacZ}* transverse preBötC slices (*n* = 7, Fig. 1c–f) and whole hindbrain preparations (*n* = 3, Fig. 1g–j) revealed the absence of respiratory rhythm-like fluorescence changes in the preBötC area (Fig. 1c,d) and activity in the fourth cervical root (C4), where the phrenic nerve exits to innervate the diaphragm (Fig. 1i,j). Furthermore, bath applications of glutamate agonists AMPA (1 μ M, *n* = 2) and NMDA (1 μ M, *n* = 3, data not shown) or the neuropeptide Substance P (0.1 μ M, *n* = 4) failed to initiate preBötC and C4 rhythmic bursting activity (Fig. 1e,f).

In contrast, spontaneous rhythmic fluorescence changes in the e-pF oscillator area *f* = 12.9 \pm 0.6 bursts per min, *n* = 5) were still observed in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos (*f* = 15.1 \pm 1.9 bursts per min, *n* = 3; Fig. 1g–j). Thus, although it was active, the e-pF oscillator was apparently unable to rhythmically drive the respiratory motor outputs in the absence of a functional preBötC oscillator. These observations suggest that the respiratory deficit of *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice results from the catastrophic impairment of the preBötC oscillator.

***Dbx1*-derived interneurons in the preBötC**

We next examined the contribution of *Dbx1*-positive progenitors to the preBötC by genetic fate mapping (Fig. 2), using a previously characterized *Dbx1^{LacZ/+}* line²⁹ in which β -galactosidase (β -Gal) expression outlasts that of *Dbx1*, which is turned off as progenitors exit the cell cycle²⁴ (Fig. 2a–d), and a *Dbx1^{iresGFP}* line (Online Methods) that expresses green fluorescent protein (GFP) under the control of the *Dbx1* promoter as a polycistronic RNA without altering the expression of the endogenous *Dbx1* protein (Fig. 2e–g). This line allows visualization of *Dbx1*-derived cells in physiological preparations (Fig. 2g). In *Dbx1^{LacZ/+}* E15.5 embryos (*n* = 9), β -Gal-positive cells migrated medially from ventricular positions near the sulcus limitans to populate territories bordering the *Isl1,2*-positive (a motor neuronal marker³¹) hypoglossal and dorsal motor vagal nuclei and radially to occupy a ventro-lateral area in the vicinity of the *Isl1,2*-positive nucleus ambiguus³² (Fig. 2c). The position of β -Gal-positive cells beneath the nucleus ambiguus corresponded well with the spatially restricted domain in which spontaneous rhythmic fluorescence changes characterized the activity of the



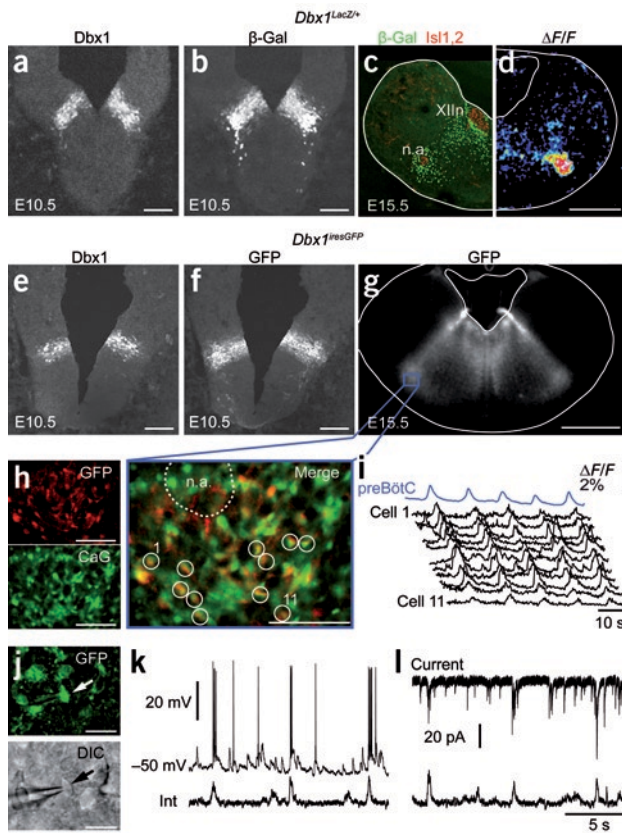


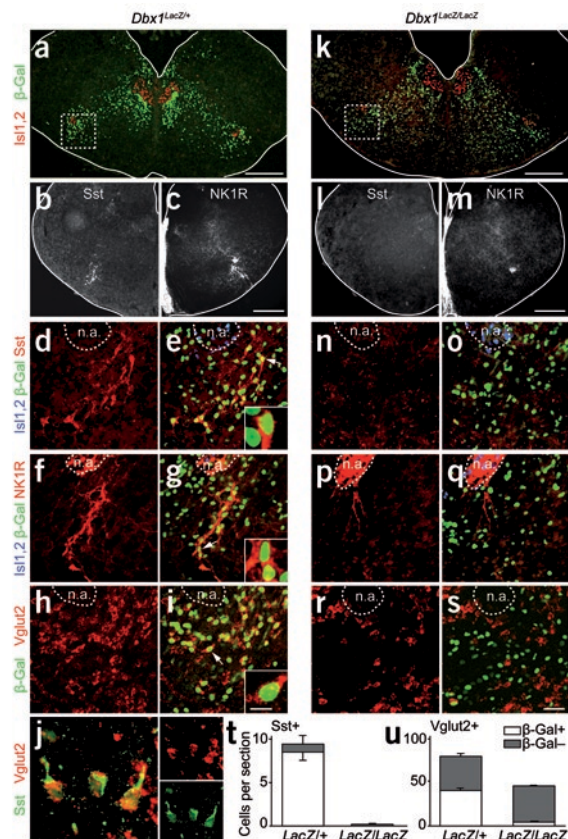
Figure 2 Dbx1-derived cells in the preBötC are rhythmically active. (a) Expression of Dbx1 protein in a *Dbx1^{LacZ/+}* E10.5 transverse hindbrain section. (b) β -Gal protein expression. (c) β -Gal protein expression (green) in half of a E15.5 transverse section (midline at right) and *Isl1,2* (red) expressed by the hypoglossal nucleus (XIIIn) and the nucleus ambiguus (n.a.). (d) Peak fluorescence change ($\Delta F/F$) during one burst of the preBötC in half of a physiological slice (midline at left). (e) Expression of Dbx1 in a *Dbx1^{iresGFP}* E10.5 transverse hindbrain section. (f) GFP protein expression. (g) GFP expression in a E15.5 preBötC slice preparation during an electrophysiological recording session. (h) Same field (blue rectangle in g) showing GFP expression (red) and Calcium Green-1 AM-loaded cells (CaG, green). A merged image is shown on the right at a higher magnification and was used to derive the individual rhythmic activity of 11 double-labeled (yellow) preBötC cells. (i) Corresponding fluorescence changes of individual cells (black) and averaged preBötC signal (blue). (j) GFP expression (green) and differential interference contrast (DIC) image used to position the patch micropipette (arrows). (k) Membrane potential changes (top trace) of a GFP-positive preBötC neuron showing spontaneous rhythmic burst discharges of action potential phased to the integrated (Int) preBötC population bursting activity. (l) Membrane current changes in the same neuron showing rhythmic bursting volleys of synaptic currents phased to the activity of the preBötC. Scale bars represent 100 μ m (a,b,e,f), 500 μ m (c,d), 50 μ m (h) and 15 μ m (j). E10.5 sections are taken from the level of rhombomere 7. XIIIn, hypoglossal nucleus.

preBötC oscillator in transverse medullary slice preparations loaded with Calcium Green-1 AM (Fig. 2d)³². Imaging in this region in E15.5 *Dbx1^{iresGFP}* preBötC slices and selecting GFP-positive cells for which registration with the optical signal was obvious revealed synchronous rhythmic fluorescent changes for 54 of 64 GFP-positive cells from five slices (Fig. 2h,i). Furthermore, the rhythmic status of Dbx1-derived cells in the vicinity of the nucleus ambiguus was confirmed by whole-cell recordings (Fig. 2j,l). Seven of ten recorded GFP-positive neurons

(five slices) spontaneously discharged rhythmic bursts of action potentials (Fig. 2k) and showed transient volleys of inward synaptic currents in voltage-clamp mode that were in phase with population bursting activity recorded from the contralateral preBötC (Fig. 2l). Thus, Dbx1-derived cells have functional signatures of preBötC neurons.

To estimate the birth date of Dbx1-derived cells of the preBötC area, we performed single-pulse BrdU injections on pregnant dams from E9.5 to E14.5 (Supplementary Fig. 1). We found that the majority of β -Gal-positive cells in the preBötC area were generated between E10.5

Figure 3 Phenotypic profiles of Dbx1-derived cells of the preBötC. (a–s) Immunohistochemical stainings in *Dbx1^{LacZ/+}* (a–j) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (k–s) embryos. β -Gal (green) and *Isl1,2* (red) expression in E15.5 transverse sections are shown in a and k. *Sst* (b,l) and *NK1R* (c,m) expression at E18.5 are shown. *Sst* expression in the preBötC area is shown in d and n (dotted square in a,k). Merged images showing *Isl1,2* (blue), β -Gal (green) and *Sst* (red) expression are shown in e and o. Inset, β -Gal and *Sst* double-positive neuron. *NK1R* expression is shown in f and p. Merged images showing *Isl1,2* (blue), β -Gal (green) and *NK1R* (red) expressions are shown in g and q. Inset, β -Gal and *NK1R* double-positive neuron. *Vglut2 in situ* hybridization is shown in h and r. Merged images showing β -Gal (green) staining and *Vglut2 in situ* hybridization (red) are shown in i and s. *Vglut2 in situ* hybridization (red) and immunostaining for *Sst* (green) are shown in j; the two panels on the right show the corresponding non-superimposed images. (t) Histogram showing the fractions of *Sst*-positive cells in the preBötC area that did (white) or did not (gray) express β -Gal for both genotypes. Note that *Sst* expression relied on Dbx1-derived neurons and was suppressed in the *Dbx1* null mutant. (u) Data are presented as in t for *Vglut2*-positive cells. About half of the *Vglut2* expression in the preBötC area was accounted for by Dbx1-derived cells (white) and was largely absent in the *Dbx1* null mutant. Neurons were counted on 3–8 sections from five (t, *Dbx1^{LacZ/+}*) and four (t, *Dbx1^{LacZ/LacZ}*; u) mice, and the results are given as the average number of cells in the preBötC area per 20- μ m section. n.a., nucleus ambiguus. Error bars represent s.e.m. Scale bars represent 300 μ m (a–c,k–m), 50 μ m (s, applying also to d–i,n–r), 15 μ m (insets) and 25 μ m (j).



ARTICLES

Table 1 Summary of cellular phenotypes in the preBötC area in *Dbx1^{LacZ/+}* and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos

Marker	Percentage of β-Gal-positive cells expressing the marker		Percentage of marker-positive cells expressing β-Gal	
	<i>Dbx1^{LacZ/+}</i>	<i>Dbx1^{LacZ/LacZ}</i>	<i>Dbx1^{LacZ/+}</i>	<i>Dbx1^{LacZ/LacZ}</i>
Vglut2	81.7 (917 of 1,122, <i>n</i> = 4)	8.4 (198 of 2,351, <i>n</i> = 4)	52.0 (917 of 1,765, <i>n</i> = 4)	9.6 (198 of 2,073, <i>n</i> = 4)
Robo3/GFP	28.5 (441 of 1,547, <i>n</i> = 3)	4.2 (33 of 784, <i>n</i> = 2)	44.7 (441 of 986, <i>n</i> = 3)	8.3 (33 of 398, <i>n</i> = 2)
Evx1	31.3 (471 of 1,505, <i>n</i> = 3)	0.4 (7 of 1,973, <i>n</i> = 3)	53.9 (471 of 874, <i>n</i> = 3)	1.4 (7 of 494, <i>n</i> = 3)
Sst	13.2 (254 of 1,921, <i>n</i> = 5)	0.0 (1 of 2,351, <i>n</i> = 4)	91.1 (254 of 284, <i>n</i> = 5)	0.0 (1 of 10, <i>n</i> = 4)

The ratios of the total number of cells counted in 3–9 sections from *n* mice are given in the parentheses.

(37.8%) and E11.5 (41.9%). Virtually no β-Gal and BrdU double-positive cells were found following injections at E9.5 (1.6%), E12.5 (2.8%) or E13.5 (0.9%) (Supplementary Fig. 1). The numbers and positions of β-Gal-positive cells in the preBötC area at E15.5 (74 ± 6 cells per section, *n* = 9 embryos) and E18.5 (79 ± 3 cells per section, *n* = 5 embryos; Supplementary Fig. 1) were similar, confirming their final settling in the preBötC at E15.5 (ref. 32) and the persistence of β-Gal expression²⁹ at least up to E18.5.

We further defined the molecular phenotype of β-Gal-positive cells in the preBötC using a combination of markers (Fig. 3). Cells were stained for β-Gal, Isl1,2 (Fig. 3a) and for either Sst or NK1R, two established markers for subsets of preBötC neurons (Fig. 3b,c). We found that 91% of Sst-positive neurons expressed β-Gal and were thus derived from Dbx1-positive progenitors (Fig. 3d,e,t). Conversely, Sst-positive neurons accounted for about 13% of the β-Gal-positive cells of the preBötC area (Table 1). Because of the predominant staining of cellular processes by an antibody to NK1R (Fig. 3f,g), β-Gal expression in NK1R-positive somas, although verified in all cases, depended on few observations and should be considered as a qualitative indication that the majority of NK1R-positive cells were also derived from Dbx1-positive progenitors.

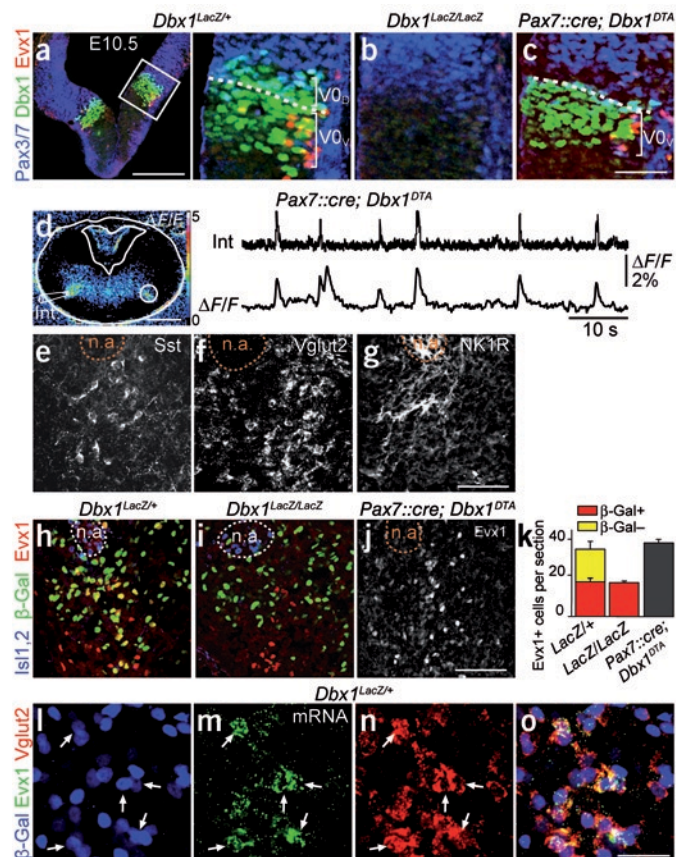
Glutamatergic neurotransmission is required for rhythm generation in the preBötC^{5,33,34} and the type 2 vesicular glutamate transporter (Vglut2) is required for the loading of synaptic vesicles¹². We investigated whether Dbx1-derived preBötC neurons were glutamatergic. Combining β-Gal immunostaining and *in situ* hybridization for Vglut2

(ref. 3), we found that 82% of β-Gal-positive cells in the preBötC area expressed Vglut2 (Fig. 3h,i and Table 1), including most (96%) of the Sst-positive neurons (Fig. 3j). These data suggest that a subset of Dbx1-positive progenitors gives rise between E10.5–11.5 to glutamatergic interneurons displaying, at later embryonic stages, the appropriate locations, neurochemical identities and functional properties of constitutive neurons of the preBötC.

Disruption of preBötC molecular identity

The absence of respiratory-like rhythmic activity in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice could be a result of an absence or a substantial depletion of preBötC neurons. To test this hypothesis, we counted the number of β-Gal-, NK1R- and Sst-positive neurons in control and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutant mice. The spatial distribution and total number of β-Gal-positive cells in the preBötC area were similar in *Dbx1^{LacZ/+}* (74.6 ± 6.0 cells per section, 9 embryos) and in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice (71.5 ± 6.5 cells per section, 5 embryos), suggesting that the absence of the Dbx1 protein in progenitors did not affect the survival or migration of Dbx1-derived neuronal progenies in the preBötC (Fig. 3a,k).

Figure 4 The preBötC derives from ventral Dbx1-positive progenitors. (a) Pax3/7 (blue), Dbx1 (green) and Evx1 (red) expression in a E10.5 *Dbx1^{LacZ/+}* hindbrain transverse section. Right, magnification of the square in the left image. Evx1-positive ventral VO (VO_V) interneurons arose laterally from the ventral Dbx1-positive, Pax7-negative progenitors and not from the dorsal Pax7-positive, Dbx1-positive progenitors that gave rise to the dorsal VO (VO_D) interneurons. (b,c) Data are presented as in a for *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (b) and *Pax7::Cre;Dbx1^{DTA}* sections (c). Dbx1-positive progenitors were lost in the *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice and Dbx1 protein expression was restricted to the ventral domain in the *Pax7::Cre;Dbx1^{DTA}* mice. (d) Calcium imaging of a *Pax7::Cre;Dbx1^{DTA}* E15.5 slice showing preserved preBötC rhythmic activity. (e–g) E18.5 transverse sections in the *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mutant. Expression of Sst (e), Vglut2 (f) and NK1R (g) was conserved in the preBötC area. (h,i) Expressions of Isl1,2 (blue), β-Gal (green) and Evx1 (red) in *Dbx1^{LacZ/+}* (h) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (i) mice in the preBötC area at E15.5 showing two populations of Evx1-positive cells that did (yellow) or did not (red) express β-Gal. Note the selective lack of β-Gal and Evx1 double-positive cells in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants. (j) Evx1-positive cells were preserved in the *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mice. (k) Histogram (mean ± s.e.m.) showing the changes, in the preBötC area, in the number of Evx1-positive cells and, where applicable, the fractions that did (yellow) or did not (red) express β-Gal. (l–o) Expression of β-Gal (blue, l), Evx1 (green, m) and Vglut2 (red, n) and a merged image (o) in the preBötC area. Note the combined expressions of β-Gal and Vglut2 in all of the Evx1-positive cells (arrows). n.a., nucleus ambiguus. Scale bars represent 500 μm (d), 200 μm (a, left), 100 μm (e–j) and 50 μm (c, applying also to b and right panel of a; and l–o). E10.5 sections were taken from the level of rhombomere 7.



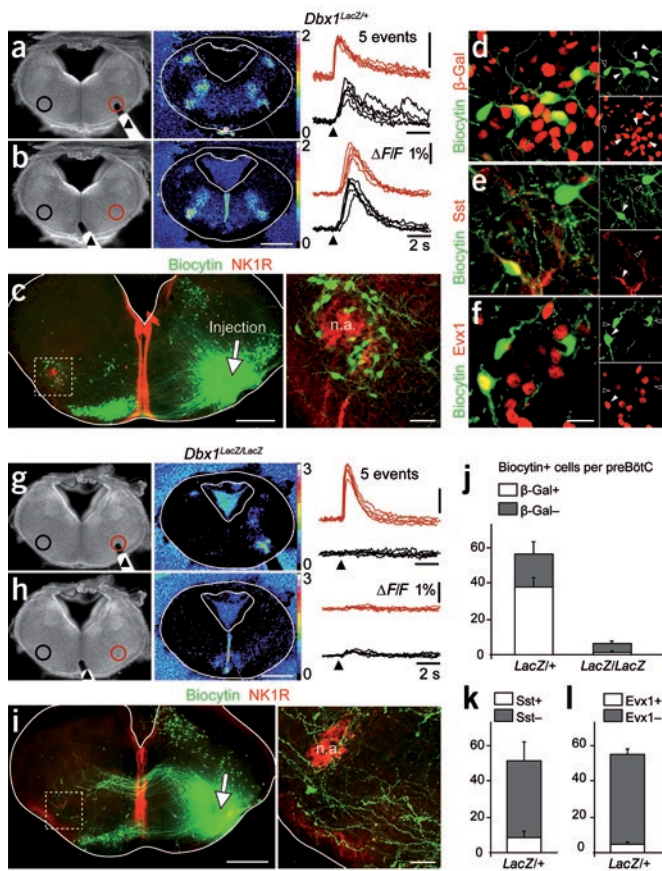


Figure 5 preBötC commissural connectivity is disrupted in *Dbx1* null mutants. (a–i) preBötC commissural connectivity in *Dbx1^{LacZ/+}* (a–f) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (g–i) E15.5 slices. (a,b,g,h) Calcium Green-1 AM–loaded preBötC slices used to optically record the left (black outlined region) and right (red outlined region) preBötC evoked responses ($\Delta F/F$, middle panel) showing the location of the stimulating electrode on the right preBötC (a,g) or on the midline (b,h). Right, color traces represent superimposed responses of the right (red) and the left (black) preBötC to five individual electrical stimulations (black arrowhead). Note the absence of contralateral responses in the *Dbx1* null mutant. Expression of biocytin (green) and NK1R (red) in E15.5 slices injected with biocytin onto the right preBötC (arrow) are shown in c and i. Right, higher magnification images of the contralateral preBötC (dotted square) showing abundant retrogradely labeled somas (green) in *Dbx1^{LacZ/+}* (c), but not *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (i), slices. Biocytin-labeled somas (green) in the preBötC area of *Dbx1^{LacZ/+}* slices are shown, counterstained for β -Gal (d), Sst (e) and Evx1 (f); the pairs of panels on the right show the corresponding non-superimposed images. (j) Histogram showing the fractions of biocytin-labeled preBötC cells that did (white) or did not (gray) express β -Gal for both genotypes. Note the marked reduction of commissural neurons in null mutants, owing to the absence of double-labeled cells. (k,l) Histograms showing, in *Dbx1^{LacZ/+}* slices, the fractions of biocytin-labeled cells coexpressing Sst (k) and Evx1 (l). Results are given as the average number of biocytin-positive cells in the preBötC area coexpressing the marker per physiological slice. n.a., nucleus ambiguus. Error bars represent s.e.m. Scale bars represent 500 μ m (a,b,g,h, left panels of c,i), 50 μ m (right panels of c,i) and 20 μ m (d–f).

In *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants, however, there was an abnormal differentiation of the preBötC that was shown most conspicuously by the complete absence of Sst and NK1R immunoreactivity (Fig. 3l,m). This resulted from a loss of expression of the markers in β -Gal–positive cells (Fig. 3n–q,u). Notably, the impairment of the differentiation of *Dbx1*-derived cells in the mutants extended to the loss of Vglut2 expression in 90% of β -Gal–positive cells (Fig. 3r,s,u and Table 1). The latter change is probably the cause of the preBötC functional deficit.

The preBötC originates in ventral *Dbx1*-positive domain

In the developing spinal cord, the *Dbx1*-positive progenitor domain is subdivided along the dorsoventral axis into dorsal (which express Pax7) and ventral (which do not express Pax7) subdomains^{24,29}. To establish whether such a partitioning of *Dbx1*-expressing progenitors exists in the hindbrain and accordingly allocates the preBötC progenitors, we performed Pax3 and Pax7 immunostaining in *Dbx1^{LacZ/+}* mice and analyzed the conditional *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mutant, in which Pax7 and *Dbx1* double-positive progenitors express diphtheria toxin and, consequently, die (Fig. 4). In E10.5 *Dbx1^{LacZ/+}* embryos, dorsal, but not ventral, *Dbx1*-positive progenitors coexpressed Pax7, as in the spinal cord (Fig. 4a). In *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mice, although the dorsal *Dbx1*-positive domain of progenitors was effectively missing (Fig. 4a–c), neither the functional alterations nor the molecular changes identified in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants were observed. In transverse slices, the rhythmicity of the preBötC was maintained (Fig. 4d) and was generated at a frequency ($f = 4.7 \pm 0.9$ bursts per min, $n = 7$) similar to that seen in control preparations (wild type, $f = 4.5 \pm 0.4$ bursts per min, $n = 26$). In addition, Sst- and Vglut2-positive cells were found in numbers (Sst positive, 7.7 ± 1.0 cells per section; Vglut2-positive, 87.4 ± 4.2 cells per section, 3 embryos) similar to those in *Dbx1^{LacZ/+}* embryos (Sst-positive,

9.4 ± 1.2 cells per section; Vglut2-positive, 80.0 ± 3.2 cells per section, 4 embryos; Fig. 4e,f). Furthermore, NK1R expression was also normal in the *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mutants (Fig. 4g).

To further test the idea that *Dbx1*-derived Sst-, NK1R- and Vglut2-positive cells of the preBötC area originate from the ventral subdomain of *Dbx1*-positive progenitors, we investigated the outcome of the *Dbx1* mutations on Evx1-positive cells that are thought to arise from the *Dbx1*-positive ventral progenitor subdomain at the spinal level^{24,29}. At E10.5 in the hindbrain, Evx1-positive cells were confined to lateral positions of the ventral *Dbx1*-positive, Pax7-negative subdomain (Fig. 4a) and were preserved in *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* embryos (Fig. 4c). Later in development (E15.5), almost half (46%) of Evx1-positive cells present in the preBötC area were not derived from *Dbx1⁺* progenitors as they did not express β -Gal and were not affected in *Dbx1^{LacZ/+}* and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos (Fig. 4h,i). The complementing half of Evx1-positive cells, however, contributed to about a third (31%) of the β -Gal–positive cell population of the preBötC area (Fig. 4h and Table 1) and almost all (98%) of the cells expressed Vglut2 (Fig. 4l–o). Given that the full complement of Evx1-positive cells was maintained in *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* embryos (Fig. 4j,k), whereas Evx1 expression was lost in β -Gal–positive cells of the *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos (Fig. 4i,k), we conclude that Sst- and NK1R-positive cells, similar to Evx1 and β -Gal double-positive cells, are glutamatergic preBötC interneurons arising from ventral *Dbx1*-positive progenitors.

As expected from the functional conservation of the e-pF oscillator, lineage tracing experiments in *Dbx1^{LacZ/+}* embryos revealed no contribution to the e-pF by cells deriving from *Dbx1*-positive progenitors. Moreover, immunostaining in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos revealed that the e-pF neurons, as defined by Phox2b, Isl1,2 and Vglut2 expression^{2,3}, were preserved (Supplementary Fig. 2).

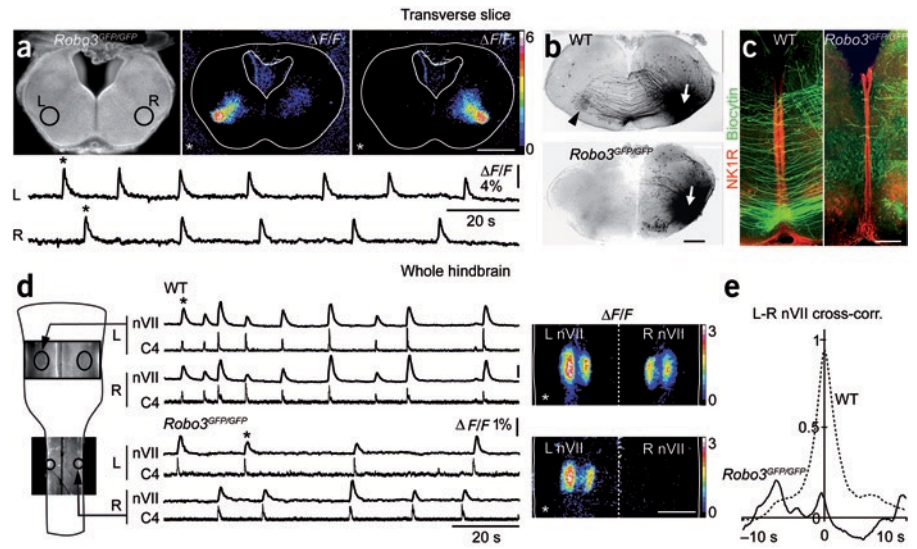
Impaired preBötC commissural connectivity

Apart from its rhythmogenic property, the other essential feature of the preBötC is its bilaterally synchronous mode of activity. We therefore explored whether this property was, similar to rhythmic activity, intrinsic to the *Dbx1*-derived population of neurons.

We asked whether commissural connectivity in the preBötC was altered in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos (Fig. 5). In *Dbx1^{LacZ/+}* preBötC slices, we optically recorded the responses evoked by electrical stimulation

ARTICLES

Figure 6 Left-right de-synchronization of the preBötC and of motor neuronal outputs in *Robo3^{GFP/GFP}* embryos. (a) Calcium green-1 AM-loaded E15.5 preBötC slice used to optically record activities of the left (L, outlined region) and right (R, outlined region) preBötC (L and R traces below). Note the persistence of rhythmic calcium fluorescence changes in both the left and right preBötC ($\Delta F/F$ panels sampled at the time indicated by asterisks on traces) in the absence of bilateral synchronization. (b) Biotin injections (white arrow) in wild-type (WT) and *Robo3^{GFP/GFP}* physiological slices showing the presence (WT, black arrowhead) and the absence (*Robo3^{GFP/GFP}*) of contralaterally labeled preBötC neurons. (c) Higher magnification view of NK1R (red) and biocytin (green) expression over the midline in the same slices showing that midline crossing axons present in wild type (left) were missing in *Robo3^{GFP/GFP}* mutant slices. (d) Whole hindbrain E15.5 preparations (left schematic, anterior at top) used to concurrently optically record the activities of the left and right facial motor nucleus (nVII) anteriorly, and electrophysiologically the left and right C4 spinal root, posteriorly. Note on corresponding traces that the rhythmic activity of the nVII ($\Delta F/F$ panels, midline, dotted line) and C4 motor outputs was bilaterally synchronized in a wild-type preparation (top set of traces), but was unilaterally synchronized in a *Robo3^{GFP/GFP}* preparation (bottom set of traces). (e) Corresponding left/right nVII cross-correlations for wild type (dotted curve) and *Robo3^{GFP/GFP}*. Scale bars represent 500 μ m (a,b,d) and 200 μ m (c).



delivered between rhythmic spontaneous bursts by concentric bipolar electrodes positioned over the preBötC on one side or on the midline. In all cases ($n = 3$ slices and see refs. 12,32), bilateral preBötC fluorescence changes were evoked (Fig. 5a,b), similar to those occurring spontaneously (data not shown)³². In contrast, in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* preparations ($n = 4$), preBötC stimulations evoked fluorescence changes that were spatially restricted to cells in the immediate vicinity of the stimulating electrode. Midline stimulations systematically failed to evoke any responses in the preBötC areas or anywhere else in the slice (Fig. 5g,h). Thus, the *Dbx1* null mutation disrupted all excitatory communication across the midline between ventrolateral areas of the medulla encompassing the preBötC. Corroborating this, tracing experiments in *Dbx1^{LacZ/+}* preBötC transverse slices using unilateral injections of biocytin in the preBötC area identified retrogradely stained neurons in the contralateral preBötC and anterogradely stained axonal terminals (Fig. 5c). Of the preBötC commissural interneurons retrogradely labeled with biocytin, 67% coexpressed β -Gal (Fig. 5d,j), 16% coexpressed Sst (Fig. 5e,k) and 8.5% expressed Evx1 (Fig. 5f,l). In *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutant preparations, the number of commissural preBötC interneurons was reduced by 89%, largely as a result of the loss of retrograde labeling in β -Gal-positive cells (Fig. 5i,j). Collectively, these data indicate that preBötC commissural excitatory communication is functionally and anatomically disrupted in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos and suggest that the formation of contralateral projections is an intrinsic property of Dbx1-derived cells.

Independent left-right rhythms in the absence of commissures

Robo3 is an important regulator of commissure formation in the spinal cord and hindbrain^{16–18}. *Robo3* null (*Robo3^{GFP/GFP}*) mutants die at birth for unknown reasons. We asked whether the preBötC bilateral synchronization was disrupted in these mice.

We first investigated whether Dbx1-derived cells of the preBötC express *Robo3*. In *Dbx1^{LacZ/+}; Robo3^{GFP/+}* embryos, about 30% of β -Gal-positive cells in the preBötC area expressed GFP, which corresponded to about half of the GFP-positive cells present in the preBötC area (Supplementary Fig. 3 and Table 1). GFP was not expressed in β -Gal-positive cells in *Dbx1^{LacZ/LacZ}; Robo3^{GFP/+}* mutants

(Supplementary Fig. 3), which is consistent with disrupted commissural connectivity.

We then optically recorded the activity of the preBötC in transverse slices ($n = 6$) or that of the facial motor nucleus concurrently with the electrical activity of C4 output in whole hindbrain preparations ($n = 5$) from E15.5 *Robo3^{GFP/GFP}* embryos (Fig. 6). In slices, spontaneous rhythmic activity of the preBötC was preserved in the left and right preBötC, although with a slightly lower frequency than in *Robo3^{GFP/+}* or wild-type embryos (*Robo3^{GFP/GFP}*, $f = 3.1 \pm 0.2$ bursts per min, 12 preBötCs from 6 slices; pooled controls, 4.5 ± 0.4 bursts per min, 26 slices). However, there was a complete loss of bilateral synchronization (Fig. 6a). In whole hindbrain preparations, we recorded rhythmic coactive bursts of activity in the facial motor nucleus and C4 root on the same side of the midline, but never from opposite sides ($n = 6$ preparations; Fig. 6d,e). Notably, the rhythmic activity in *Robo3^{GFP/GFP}* preparations was suppressed by bath application of the preBötC-depressing μ -opioid agonist DAMGO (0.1 μ M, $n = 3$, data not shown). Tracing experiments in which we injected biocytin unilaterally to the preBötC in *Robo3^{GFP/GFP}* slice preparations revealed the absence of any midline-crossing axons (Fig. 6b,c). This confirms that *Robo3* is required for axons to cross the midline in the hindbrain¹⁶. Accordingly, *Robo3^{GFP/GFP}* E18.5 embryos ($n = 5$) delivered from uterine horns or postnatal day 0 neonates ($n = 2$) featured a conspicuous split breathing behavior that was characterized by independent left and right rhythmic contractions of the diaphragm (Supplementary Movie 1), indicating that unilateral rhythmic motor circuits can be maintained throughout the hindbrain and the spinal cord in the absence of *Robo3*. Such uncoordinated left and right rhythmic respiratory efforts probably preclude efficient breathing, thus explaining the cyanosis and death within 8 h of birth of all (7 of 7) of the *Robo3^{GFP/GFP}* mice that were delivered at E18.5 or were born naturally. These data are consistent with the notion that *Robo3* signaling is important for commissural axon pathfinding in the hindbrain and also suggest that commissural connectivity may be dispensable for emergence of respiratory rhythmic activity.

Finally, we asked whether *Robo3*-mediated signaling was required cell-autonomously in Dbx1-derived neurons for bilateral synchrony

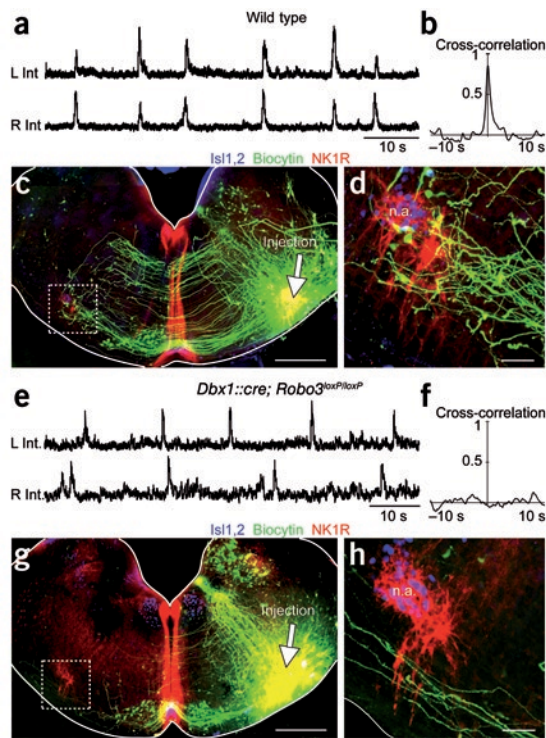


Figure 7 Left/right de-synchronization of the preBötC in the *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* conditional mutant. (a) Integrated population electrical activity of the left (L Int) and right (R Int) preBötC recorded in a E15.5 wild-type slice showing rhythmic and synchronized bursts. (b) Corresponding left-right preBötC cross-correlogram. (c) Islet1,2 (blue), biocytin (green) and NK1R (red) expression in a physiological slice injected with biocytin onto the right preBötC (arrow) showing retrogradely filled contralateral preBötC neurons (dotted square), shown at higher magnification in d. (e, f) Data are presented as in a and b for a *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* conditional mutant physiological slice showing de-synchronized rhythmic activities of the left and right preBötC (e), resulting in a flat cross-correlogram (f). (g, h) Data are presented as in c and d for the *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* mutant showing that preBötC commissural connectivity was disrupted and that the number of retrogradely labeled contralateral preBötC neurons was massively reduced (h). n.a., nucleus ambiguus. Scale bars represent 300 μm (c,g) and 50 μm (d,h).

and right preBötC. Thus, in the hindbrain, the homeobox gene *Dbx1* lies upstream of a developmental program providing neurons with molecular properties that ensure built-in rhythm generation, bilateral synchrony, and the neuromodulatory influence and responsiveness of the vital preBötC respiratory oscillator.

Rhythm generation in the preBötC relies on glutamatergic synaptic transmission. *In vitro*, the preBötC rhythmic activity can be reversibly suppressed by the transient inhibition of AMPA/kainate receptors^{5,32,34} and its embryonic emergence is prevented in *Vglut2* null mutants¹². The deletion^{9,35} or silencing¹⁰ of NK1R- and *Sst*-expressing preBötC neurons, respectively, disrupts breathing in the adult rat. We found that NK1R- and *Sst*-expressing preBötC interneurons were lacking in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants. As NK1R- and *Sst*-positive neurons may form only partially overlapping neuronal populations in the preBötC¹⁰, the severe respiratory effect of their deletion is probably a result of their role in supporting the glutamatergic neurotransmission required for rhythm generation^{7,36}. Indeed, most (82%) preBötC *Dbx1*-derived cells expressed *Vglut2* and were not present in the *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos. We propose that the complete absence of rhythm in the preBötC of *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos results from a depletion of glutamatergic interneurons. This is consistent with current models of rhythm generation in the preBötC in which glutamatergic interneurons contribute to the recurrent excitatory connections, priming the collective and periodic all-or-none population burst firing that defines the oscillator activity^{1,5,7,12,34,36}.

The associated collective loss of NK1R, *Sst* and *Vglut2* expression indicate that *Dbx1* is required to specify the molecular properties that characterize the preBötC anatomically^{8,9} and underlie its function. The anatomical and functional preBötC phenotypes of *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mice were not recapitulated in *Pax7::cre; Dbx1^{DTA}* mice, indicating that little if any of the phenotype is contributed by cells originating in the dorsal domain of *Dbx1*-positive progenitors. Thus, the neurons that are critical for ensuring rhythm generation of the preBötC belong to the ventral V0 (V0_v) interneuronal class²⁴.

A propensity shared by both preBötC cells and V0 spinal cord interneurons²⁴ is to project axons across the midline. We identified *Robo3* as a necessary receptor for this process. Notably, the left-right synchrony of the preBötC was abolished in *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* embryos. However, rhythmic preBötC were spared on either side of the midline in conditional or straight *Robo3* null mutants. This is consistent with previous observations of maintained preBötC rhythmic activity in slices following midline section³⁷ or in island preparations³⁸, indicating that commissural connectivity is dispensable for both emergence and maintenance of the rhythm. Therefore, rhythm generation appears as a *Dbx1*-dependent and *Robo3*-dispensable process that relies on ipsilateral recurrent excitatory connections.

of the preBötC using a mouse carrying a *Robo3* conditional allele (*Robo3^{loxP/loxP}*)¹⁷. We compared the preBötC rhythm generation and bilateral synchronization of wild-type (Fig. 7a–d) and *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* mice (Fig. 7e–h). As previously observed in *Robo3^{GFP/GFP}* mutants, the *Robo3* conditional mutation did not prevent rhythmic activity in left and right preBötC (4.9 ± 0.4 bursts per min, 12 preBötC) in all of the transverse slice preparations that we tested (n = 6), but led to their complete de-synchronization (Fig. 7e,f). In addition, biocytin tracing experiments in *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* preparations revealed a 92% deficit of stained commissural interneurons (wild type, 56.4 ± 5.3 cells per preBötC, n = 5; *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}*, 4.3 ± 2.3 cells per preBötC, n = 5; Fig. 7g,h), which is comparable to that of *Dbx1^{LacZ/LacZ}* embryos (Fig. 5). Similar to *Robo3^{GFP/GFP}* mutants, none of *Dbx1::cre; Robo3^{loxP/loxP}* mice survived after birth (data not shown).

Our data indicate that *Dbx1*-derived neurons are necessary for enforcing bilateral synchrony of the preBötC, an essential feature that depends on the fraction of *Dbx1*-derived cells in the preBötC (30%) that express *Robo3*. Thus, similar to rhythm generation, bilateral synchrony of the preBötC emerges as a property that is intrinsic to *Dbx1*-derived cells.

DISCUSSION

Using molecular genetic strategies in embryos, we found that *Dbx1*-expressing progenitors give rise to the neurons necessary for rhythm generation and bilateral synchrony of the preBötC, the main respiratory oscillator. Spontaneous, collective and bilateral preBötC rhythmic behavior was permanently abrogated in the absence of *Dbx1*, leading to the complete absence of respiratory efforts at birth. The *Dbx1* null mutation caused a massive reduction of the number of glutamatergic preBötC interneurons, including the constitutive NK1R- and *Sst*-expressing neurons. The glutamatergic neurons born outside of the ventral domain of *Dbx1*-positive progenitors, including those of the unaffected e-pF oscillator, were unable to compensate for the lethal respiratory deficit resulting from *Dbx1* inactivation. In addition, preventing commissural *Dbx1*-derived interneurons from projecting axons across the midline was sufficient to de-synchronize the rhythms of left

ARTICLES

The strength of the link between Dbx1 and Robo3 probably ensures that the preBötC constitutes a major commissural hub of central respiratory circuits. The adult respiratory motor command *in vivo* involves sequential phases (for example, inspiratory, post-inspiratory and expiratory^{1,39}) that proceed in synchrony across the midline. The robustness of bilateral coactivity of the central control of breathing rests on the existence of multiple excitatory commissural relays at sensory integrative and pre-motor levels³⁹ that all probably depend on Robo3. A major finding of our study is that a large fraction of the preBötC cells endowed with both glutamatergic and commissural identities, including V0_v Sst-positive, Evx1-positive and probably the majority of NK1R-positive cells, were Dbx1-dependent. All of these neurons are collectively candidates for rhythm generation. Thus, our data indicate that ventral Dbx1-positive progenitors of the caudal hindbrain are fated to become confined sources of rhythmic neural activity with built-in synchronicity across the midline. This is consistent with previous findings in the adult rat that Sst-positive neurons contribute to the preBötC commissural apparatus^{7,8} and specifically project onto major respiratory relay structures in the brainstem, including the preBötC^{7,8}. Spinal Evx1-positive cells comprise rostrally projecting commissural interneurons⁴⁰ that may, in the hindbrain, help to couple the preBötC and the e-pF². Future experiments should reveal the extent to which Dbx1-derived and/or Robo3-expressing neurons further support the connectivity of the respiratory rhythm generating network, such as between the preBötC and the e-pF or between the oscillator level and pre-motor circuits. In any case, Dbx1 and Robo3 stand as major determinants of the respiratory central network.

It was shown that Robo3-deficient axons navigate and finally project onto their normal target, but on the ipsilateral side¹⁷. Consistent with this, the rhythmic entrainment of facial and C4/phrenic motor neuronal targets was unilaterally unaffected in *Robo3* null mutants. Therefore, at the preBötC level, re-routed axons probably form ipsilateral connections with other preBötC neurons that are, in terms of rhythm generation, functionally equivalent to those normally established with contralateral partners. Robo3 expression in Dbx1-derived cells was lost in the absence of Dbx1 protein. Previous studies have identified several transcription factors that directly control the expression of Robo receptors^{41,42}. In *Lhx2/Lhx9* double knockout animals, the selective loss of Robo3 expression on a subset of DL1 spinal cord commissural interneurons prevents their axons from crossing the midline. Our results suggest that Robo3 could also be a transcriptional target of Dbx1.

We are not aware of any human respiratory deficits that would point to an unbalanced left-right central respiratory command. Recent studies have shown that mutations in genes encoding axon guidance receptors such as DCC⁴³ and Robo3 (ref. 15) lead to specific motor deficits that, at least to some extent, involve hindbrain commissures. The rare human syndrome horizontal gaze palsy with progressive scoliosis (HGPPS) is caused by mutations in the *Robo3* gene. Individuals with HGPPS are unable to perform conjugate lateral eye movements and have reduced hindbrain and spinal cord commissures, including uncrossed corticospinal tract and dorsal column-medial lemniscus¹⁵. One of the two signature traits of individuals with HGPPS is a severe scoliosis of unknown origin. Although speculative, the marked independence of left-right breathing activities and diaphragm contractions in *Robo3* null mice raises the possibility that, owing to its continuous character, even a mild imbalance of the periodic mechanical constraint exerted by respiration on the axial skeleton may result in the abnormal posture of individuals with HGPPS.

Hindbrain interneurons in para-facial and para-vagal locations organize into rhythmically active cellular assemblies in the mouse embryo that are reminiscent of the two oscillators comprising the fetal and

postnatal respiratory rhythm-generating network, respectively. Several features indicate that the e-pF and preBötC oscillators are not serially homologous structures. The e-pF and preBötC oscillators derive from the dorsal and ventral domains of the neural tube, respectively, giving rise to Db2 (ref. 3) and V0 neurons. In mice, their constituent cells were born before E10.5 (J.F. Brunet and C. Goridis, personal communication, e-pF) and during E10.5–11.5 (preBötC), a sequence that matches their later functional emergence at E14.5 (ref. 2) and E15.5 (ref. 32). We have previously shown that the preBötC oscillator could emerge in the absence of the e-pF oscillator² and found that the converse was also possible in the *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutant. This firmly establishes that the embryonic parafacial and the preBötC oscillators arise independently. Thus, the preBötC appears to be inserted in an e-pF-containing network; the complete absence of breathing in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants in the presence of an active e-pF oscillator further demonstrates that the preBötC then takes on a prominent role.

Understanding the intrinsic logic of central pattern-generating neuronal networks remains a challenging issue in neuroscience. The respiratory rhythm-generating network in the hindbrain controls an exclusively synchronous bilateral motor behavior¹, whereas the locomotor central pattern generator (CPG) in the spinal cord is able to transit between left/right alternating and synchronous modes in most vertebrates⁴⁴. Our results indicate that a pool of neural progenitors are allocated for the assembly of these two CPGs and that Dbx1 and Robo3, which are expressed in these cells, are targets of regulatory interaction that may constrain their respective operating principles. Dbx1-derived V0 commissural interneurons in the lumbar spinal cord have been shown to have a largely (70%) inhibitory glycinergic or GABAergic nature, whereas the remainder express Vglut2 (ref. 24). The absence of V0 interneurons in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants leads, at the spinal cord level, to a marked increase in the incidence of abnormal bilateral co-bursting of the left and right flexor/extensor motoneurons during drug-induced locomotion *in vitro*²⁴. Thus, at the spinal level, the V0 interneurons mediate crossed inhibition conditioning left-right alternating phasic activity. In the hindbrain, three independent lines of evidence, electrical stimulation, retrograde tracing and *Robo3* conditional deletion, demonstrate the commissural phenotype of Dbx1-derived interneurons. Unlike in the spinal cord, however, 82% of V0 interneurons in the preBötC area were glutamatergic and therefore directly transmit their excitation across the midline to enforce bilateral phasing of activities. Recently, glycinergic neurons, which are estimated to contribute to 20% of the preBötC population, were shown to have pacemaker membrane properties⁴⁵. Although the Dbx1-derived nature of these cells and the pacemaker status of Dbx1-derived cells have not been established, the possibility exists that these glycinergic cells could complement the fraction of Dbx1-derived glutamatergic neurons. If this were the case, our results suggest that the different balance between the excitatory and inhibitory V0 interneurons in the hindbrain and the spinal cord may be a fundamental divergence of the respiratory and locomotor CPGs' building blocks. Regulatory genes specifying the glutamatergic fate in the preBötC are unknown, but differ from those operating in the dorsal neural tube, which require Tlx3 (ref. 46), a transcription factor that is not expressed in the V0 domain. Because an optimal excitatory/inhibitory ratio would appear to be important, an immediate concern is now to investigate regional regulatory mechanisms affecting P0 progenitors and the ensuing neurogenic programs that control the excitatory versus inhibitory cell fate of V0_v interneurons in the caudal hindbrain.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.-F. Brunet, C. Goridis and A. Lumsden for comments on the manuscript; M. Tessier-Lavigne for providing the *Robo3* knockout; S. Karaz for providing specimens; and S. Autran and V. Mézières for technical assistance with genotyping. J.B. is supported by Région Ile-de-France and the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale Equipe (A.C.), the Association Française contre les Myopathies (ASS-SUB06-00123, A.C.), the Ville de Paris (2006 ASES 102, A.P.) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-NEUR-007-01 BIS to A.P., ANR-08-MNPS-030-01 to A.C. and ANR-07-NEUR-007-01 to G.F.). This work benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit and the Anicampus mouse facility of the Gif-sur-Yvette campus. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut de la Santé et de la Recherche Médicale.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.E., A.P., J.C. and G.F. conceived the study. N.R. and A.C. designed the *Robo3* experiments. J.B. and M.T.-B. performed the experiments. V.D. carried out *Vglut2 in situ* hybridization. J.B., M.T.-B. and G.F. analyzed the data. J.E., A.C. and A.P. provided reagents and mice. G.F. wrote the paper. All of the authors discussed the results and implications and commented on the manuscript at all stages.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprintsandpermissions/>.

1. Feldman, J.L. & Del Negro, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 232–242 (2006).
2. Thoby-Brisson, M. *et al.* Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzing complex. *Nat. Neurosci.* **12**, 1028–1035 (2009).
3. Dubreuil, V. *et al.* Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in *Phox2b* mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J. Neurosci.* **29**, 14836–14846 (2009).
4. Rose, M.F., Ahmad, K.A., Thaller, C. & Zoghbi, H.Y. Excitatory neurons of the proprioceptive, interoceptive and arousal hindbrain networks share a developmental requirement for *Math1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 22462–22467 (2009).
5. Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W. & Feldman, J.L. Pre-Bötzing complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726–729 (1991).
6. Gray, P.A., Rekling, J.C., Bocchiaro, C.M. & Feldman, J.L. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzing complex. *Science* **286**, 1566–1568 (1999).
7. Stornetta, R.L. *et al.* A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzing complex. *J. Comp. Neurol.* **455**, 499–512 (2003).
8. Tan, W., Pagliardini, S., Yang, P., Janczewski, W.A. & Feldman, J.L. Projections of preBötzing Complex neurons in adult rats. *J. Comp. Neurol.* **518**, 1862–1878 (2010).
9. Gray, P.A., Janczewski, W.A., Mellen, N., McCrimmon, D.R. & Feldman, J.L. Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 927–930 (2001).
10. Tan, W. *et al.* Silencing preBötzing complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat. Neurosci.* **11**, 538–540 (2008).
11. Bianchi, B. *et al.* *Matf* deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat. Neurosci.* **6**, 1091–1100 (2003).
12. Wallén-Mackenzie, A. *et al.* Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J. Neurosci.* **26**, 12294–12307 (2006).
13. Koizumi, H. *et al.* Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated *in vitro*. *J. Neurosci.* **28**, 2353–2365 (2008).
14. Koshiya, N. & Smith, J.C. Neuronal pacemaker for breathing visualized *in vitro*. *Nature* **400**, 360–363 (1999).
15. Jen, J.C. *et al.* Mutations in a human *ROBO* gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* **304**, 1509–1513 (2004).
16. Marillat, V. *et al.* The slit receptor *Rig-1/Robo3* controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* **43**, 69–79 (2004).

17. Renier, N. *et al.* Genetic dissection of the function of hindbrain axonal commissures. *PLoS Biol.* **8**, e1000325 (2010).
18. Sabatier, C. *et al.* The divergent *Robo* family protein *rig-1/Robo3* is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* **117**, 157–169 (2004).
19. Zhang, Y. *et al.* V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron* **60**, 84–96 (2008).
20. Jessell, T.M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 20–29 (2000).
21. Lumsden, A. & Krumlauf, R. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109–1115 (1996).
22. Briscoe, J. & Ericson, J. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 43–49 (2001).
23. Garcia-Campmany, L., Stam, F.J. & Goulding, M. From circuits to behavior: motor networks in vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 116–125 (2010).
24. Lanuza, G.M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T.M. & Goulding, M. Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* **42**, 375–386 (2004).
25. Briscoe, J. *et al.* Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling. *Nature* **398**, 622–627 (1999).
26. Pattyn, A., Hirsch, M.-R., Goridis, C. & Brunet, J.-F. Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene *Phox2b*. *Development* **127**, 1349–1358 (2000).
27. Pattyn, A. *et al.* Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev.* **17**, 729–737 (2003).
28. Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J.M., Sander, M. & Ericson, J. Complementary roles for *Nkx6* and *Nkx2* class proteins in the establishment of motoneuron identity in the hindbrain. *Development* **130**, 4149–4159 (2003).
29. Pierani, A. *et al.* Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein *Dbx1*. *Neuron* **29**, 367–384 (2001).
30. Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C. & Jessell, T.M. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903–915 (1999).
31. Ericson, J. *et al.* *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* **90**, 169–180 (1997).
32. Thoby-Brisson, M., Trinh, J.B., Champagnat, J. & Fortin, G. Emergence of the pre-Bötzing respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J. Neurosci.* **25**, 4307–4318 (2005).
33. Funk, G.D., Smith, J.C. & Feldman, J.L. Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: role of excitatory amino acids. *J. Neurophysiol.* **70**, 1497–1515 (1998).
34. Rekling, J.C. & Feldman, J.L. PreBötzing complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 385–405 (1998).
35. McKay, L.C., Janczewski, W.A. & Feldman, J.L. Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzing complex neurons. *Nat. Neurosci.* **8**, 1142–1144 (2005).
36. Liu, Y.Y. *et al.* Relationship between two types of vesicular glutamate transporters and neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Bötzing complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 41–48 (2003).
37. Del Negro, C.A., Johnson, S.M., Butera, R.J. & Smith, J.C. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzing complex. III. Experimental tests of model predictions. *J. Neurophysiol.* **86**, 59–74 (2001).
38. Johnson, S.M., Koshiya, N. & Smith, J.C. Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzing complex “island”. *J. Neurophysiol.* **85**, 1772–1776 (2001).
39. Bianchi, A.L., Denavit-Saubie, M. & Champagnat, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* **75**, 1–45 (1995).
40. Moran-Rivard, L. *et al.* *Evx1* is a postmitotic determinant of *v0* interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* **29**, 385–399 (2001).
41. Geisen, M.J. *et al.* *Hox* paralog group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons through slit-*robo* signaling. *PLoS Biol.* **6**, e142 (2008).
42. Wilson, S.I., Shafer, B., Lee, K.J. & Dodd, J. A molecular program for contralateral trajectory: *Rig-1* control by LIM homeodomain transcription factors. *Neuron* **59**, 413–424 (2008).
43. Srour, M. *et al.* Mutations in *DCC* cause congenital mirror movements. *Science* **328**, 592 (2010).
44. Kiehn, O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 279–306 (2006).
45. Morgado-Valle, C., Baca, S.M. & Feldman, J.L. Glycinergic pacemaker neurons in preBötzing complex of neonatal mouse. *J. Neurosci.* **30**, 3634–3639 (2010).
46. Cheng, L. *et al.* *Tlx3* and *Tlx1* are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat. Neurosci.* **7**, 510–517 (2004).



ARTICLES

ONLINE METHODS

Experiments were performed in accordance with European and French agricultural ministry guidelines for the care and use of laboratory animals (Council directives 2889 and 86/609/EEC).

Animal strains. All of the mutant mouse lines were described previously: *Dbx1^{nlslacZ}* (*Dbx1^{LacZ}*)²⁹, *Dbx1^{Cre}* (*Dbx1::cre*)⁴⁷, *Robo3^{GFP}* (ref. 18), *Robo3^{loxP}* (ref. 17), *Pax7::cre*⁴⁸. *Dbx1^{iresGFP}* mice were generated by inserting an *IRES-GFP-pGK-Hygro^r* cassette into the BamHI site present in the 3' UTR of the *Dbx1* gene. Recombination was achieved in two steps using the I-SceI-induced gene replacement system⁴⁹. All mice were bred in a C57BL6 background. Day of plug was considered to be E0.5.

In situ hybridization and immunohistochemistry. Transverse 20- μ m sections were obtained using a cryostat (Leica). The methods for *in situ* hybridization coupled with immunohistochemistry and for double-fluorescence *in situ* hybridization on cryosections have been described previously³. *Evx1* and *Vglut2* (*Slc17a6*) riboprobes were synthesized using a DIG RNA labeling kit (Roche), as specified by the manufacturer. For fluorescent immunohistochemistry, sections were incubated overnight at 4 °C with one or several of the following: antibody to NK1R (Sigma S8305, 1:5,000), rabbit antibody to somatostatin (Peninsula Labs T-4103, 1:500), rabbit antibody to GFP (Invitrogen A11122, 1:1,000), chicken antibody to β -Gal (abcam 9361, 1:1,000), chicken antibody to GFP (Aves Labs 1020, 1:2,000), mouse antibody to Islet1,2 (DSHB 39.4D5c, 1:250) and guinea-pig antibody to *Evx1* (gift from T.M. Jessell, Columbia University, 1:4,000). For secondary antibodies, we used donkey antibody to rabbit Cy5 (Jackson IR 744-176-152, 1:500), goat antibody to rabbit Alexa 594 (Invitrogen A11012, 1:500), goat antibody to chicken Alexa 488 or 647 (Invitrogen A11039 and A21449, respectively, 1:500), goat antibody to mouse FITC, Cy3 or Cy5 (Abcam 6945, 6563 and 6785-1, 1:500), and donkey antibody to guinea pig Cy3 (Jackson IR 706-166-148, 1:500). Biotin was revealed using extravidin conjugated to either FITC or Cy3 at a final concentration of 1:400 during the secondary antibody incubation. Slides were scanned on a SP2 confocal microscope (Leica Microsystems). A contrast enhancement and a noise reduction filter were applied to the images using Adobe Photoshop.

Definition of the preBötC area and cellular counts. The embryonic preBötC area was defined using previously determined physiological and anatomical criteria^{32,50} that were confirmed here. Spontaneous rhythmic activity characterizing the preBötC was present in transverse slice preparations in a domain ventral and medial to the nucleus ambiguus that was fully circumscribed by a 300 μ m \times 300 μ m square positioned such that the ventral aspect of the nucleus ambiguus was set in the dorsolateral quadrant (Figs. 3 and 4). Rhythmic activity was systematically detected at the rostral surface of 450- μ m-thick transverse medullary slices set 250 μ m and 300 μ m posterior to the caudal limit of the facial nucleus in E15.5 and E18.5 embryos, respectively. These slices encompass a 300–350- μ m longitudinal column of the ventrolateral medulla presenting highest density of interneurons showing somatic and cellular processes expressing high level of NK1R at these stages and at E18.5 highest density of Sst-positive neurons. Thus neuronal counts in the preBötC area were performed in the volume defined by the 300 μ m \times 300 μ m square area, having an anterior posterior extent of 300 μ m starting 250 μ m and 300 μ m caudal to the posterior limit of the facial motor nucleus for E15.5 and E18.5 embryos, respectively.

For each marker, neurons were counted manually on raw images, with the help of the cell counter plug-in in ImageJ, in 3–9 cryosections from the preBötC area on one side, in 2–4 mice. Cellular counts per section from all mice were summed to calculate the proportions presented in Table 1 or were averaged per mouse and a grand mean \pm s.e.m. was calculated across mice to produce cells per section histograms summarizing anatomical stainings in Figures 3 and 4 and Supplementary Figures 1 and 3. For cellular counting after retrograde tracing experiments using biocytin, physiological 450- μ m-thick slices were frozen and re-sectioned in 20- μ m-thick sections and retrogradely filled neurons were counted from all sections. These numbers were averaged across preparations.

In vitro preparations. Pregnant mice were killed by cervical dislocation on E15.5. Embryos were excised from the uterus and kept at 16–18 °C in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) bubbled with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) until the electrophysiological and/or optical recordings sessions. aCSF consisted of

120 mM NaCl, 8 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 21 mM NaHCO₃, 0.58 mM Na₂HPO₄ and 30 mM glucose, pH = 7.4. A high external [K⁺] was purposefully used to ensure maintenance of the functional mode of the preBötC previously described at the time of its emergence³². Whole hindbrain preparations and preBötC slices were prepared as previously described³². Briefly, hindbrains attached to the first six segments spinal segments were isolated from the embryo and either transferred in a recording chamber, ventral side up, for recordings or embedded in an agar block, mounted onto a vibratome (Leica) and serially sectioned in the transverse plane from rostral to caudal until the posterior limit of the facial nucleus was reached. Using this as a landmark, we further removed a 200–250- μ m-thick slices and cut the 450- μ m-thick physiological slice that exposes the preBötC at its rostral surface. Both en bloc preparations and slices were kept at 30 °C in a recording or injection chamber and continuously superfused with oxygenated aCSF. Prior to any recordings or injection, preparations were allowed to recover for 30 min.

Electrophysiological recordings. C4 nerve root activity in whole hindbrain preparations and population activity of the preBötC on transverse slices were recorded using glass micropipettes suction electrodes (150 μ m tip diameter) filled with aCSF and connected through silver wires to a high-gain AC amplifier (Grass, 7P511). The signal was filtered (bandwidth, 3–3,000 Hz), integrated using an electronic filter (Neurolog System, time constant = 100 ms), recorded on a computer via a digitizing interface (Digidata 1322A, Molecular Devices) and analyzed with the pClamp9 software (Molecular Devices).

Whole-cell patch-clamp neuronal recordings of GFP-expressing cells were performed on transverse slices using an E-600-FN upright microscope (Nikon) equipped with a standard epifluorescent illumination system and a Coolsnap HQ CCD camera (Photometrics). After identification of a GFP-positive cell in the area of the preBötC, whole-cell recording was achieved under visual control using differential interference contrast. Patch electrodes (resistance of 4 to 6 M Ω) were pulled from borosilicate glass tubes (Clark GC 150TF) and filled with a solution containing 123 mM potassium gluconic acid, 21 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES, pH 7.2, supplemented with 1 mg ml⁻¹ biocytin (Molecular Probes). Electrophysiological signals were recorded using an Axopatch200B amplifier (Molecular Devices), a digitizing interface (Digidata 1322A, Molecular Devices) and the software program pClamp9 (Molecular Devices). Substance P and the μ -opioid agonist DAMGO were obtained from Sigma, dissolved in aCSF and bath applied for 10–15 min at the final concentration of 0.1 μ M. Values are given as means \pm s.e.m. and statistical significance was tested using unpaired difference Student's *t* test. Differences were regarded as significant if *P* < 0.05.

Calcium imaging. Whole hindbrain and slices were incubated for 40 min in oxygenated aCSF containing the cell-permeable calcium indicator dye Calcium Green-1 AM. After a 30-min recovery period in the recording chamber to wash out the dye excess, whole hindbrain preparations were positioned in the recording chamber with the ventral side up. Fluorescence images were captured using a cooled CCD camera (Coolsnap HQ, Photometrics) using an exposure time of 100 ms in overlapping mode (simultaneous exposure and readout) mounted on an E-600-FN upright microscope (Nikon) equipped with a standard epifluorescent illumination system. A fluorescein filter set was used to excite the dye and capture the emitted light during periods of 60–180 s. Images were analyzed using Metamorph software (Universal Imaging). To perform calcium imaging of GFP-expressing cells, we first acquired images of GFP cells together with corresponding differential interference contrast images. After dye loading, we carefully re-positioned over the same cellular field by aligning cellular profiles with the differential interference contrast image stored before incubation. The GFP-labeled cells false-colored red image (Fig. 2h) and the calcium-loaded cells false-colored green image (Fig. 2h) were overlaid to determine double-labeled somas and to position regions of interest for measurements of fluorescence changes (Fig. 2h). In all cases, the average intensity in a region of interest was calculated for each frame and changes in fluorescence were normalized to their initial value by expression as the ratio of changes in fluorescence to initial fluorescence ($\Delta F/F$).

Plethysmographic recordings. E18.5 fetuses delivered from pregnant dams (*Dbx1^{LacZ/+}* in-crossings) or postnatal day 0 neonates were placed inside an enclosed 30-ml plethysmographic chamber for 90 s. Chamber temperature was

taken before and after the recording. Ventilation was measured by recording pressure fluctuations, relative to a reference chamber of corresponding size, that are proportional to tidal volume. Data were sampled at 1 kHz. Respiratory frequency was calculated on a breath-to-breath basis using whole body plethysmography (Buxco Electronics) and analyzed using Elphy (UNIC, CNRS).

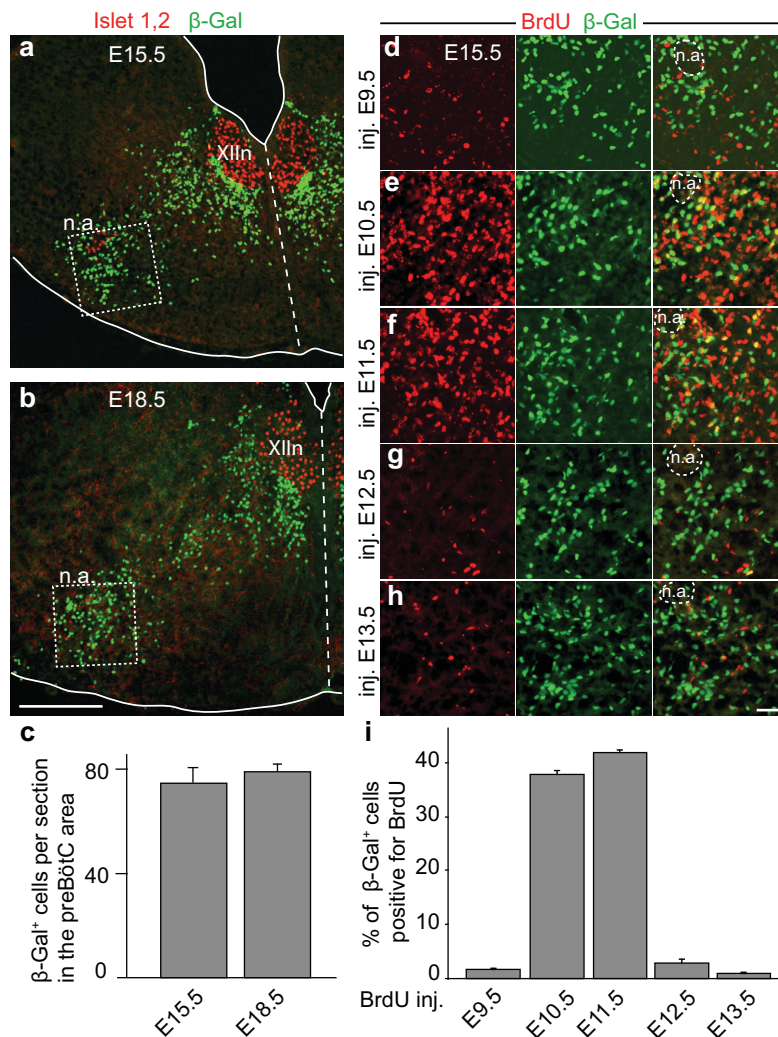
Retrograde labeling of commissural neurons in the preBötC. Biotin was dissolved at 2 mg ml^{-1} in distilled water containing 2% DMSO (vol/vol) and a few micrograms of Fast-Green FCF (Sigma) to obtain a solution visible under standard transmitted light illumination. Using broken-tip patch-clamp micropipette (tip diameter = 10–20 μm), the solution was pressure injected over 45 min onto the preBötC area on medullary transverse slices continuously superfused with oxygenated aCSF. A larger micropipette (tip diameter = 100–200 μm) connected to a pump was placed above the injection site to continuously absorb any dye overspill thus ensuring its focal application. After the injection, micropipettes were removed and the slice was maintained in the chamber for at least 1 h to

allow intracellular diffusion of the dye. It was then fixed in 4% paraformaldehyde (wt/vol) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C for 2 h, then rinsed in PBS and immuno-processed. For cellular counting, the 450- μm slices were cryoprotected in 30% sucrose (wt/vol) in PBS, frozen, re-sectioned into 20- μm sections and processed for immunohistochemistry as described above.

47. Bielle, F. *et al.* Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat. Neurosci.* **8**, 1002–1012 (2005).
48. Keller, C., Hansen, M.S., Coffin, C.M. & Capecchi, M.R. Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes Dev.* **18**, 2608–2613 (2004).
49. Cohen-Tannoudji, M. *et al.* I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1444–1448 (1998).
50. Bouvier, J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 510–520 (2008).

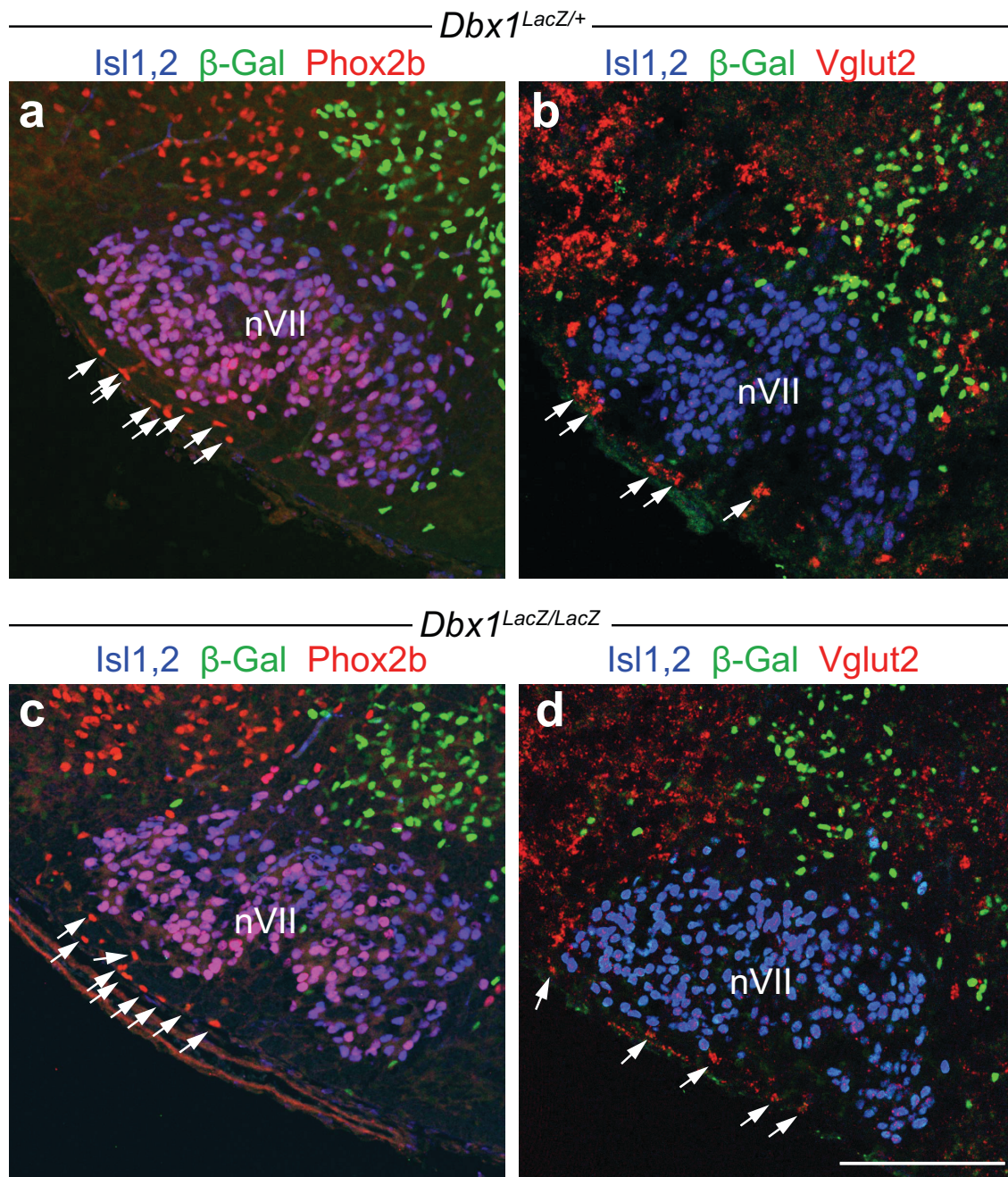
Hindbrain Interneurons and Axon Guidance Signalling Critical for Breathing

Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chédotal A and Fortin G.



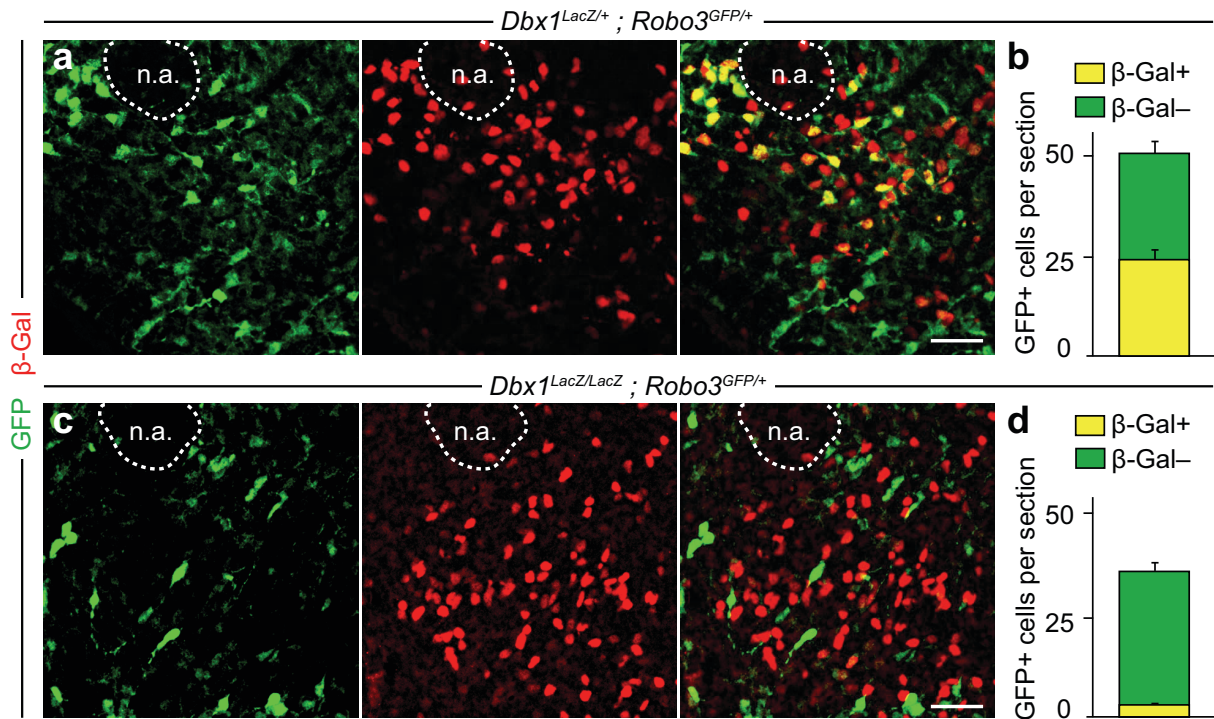
Supplementary Figure 1: Dbx1-derived preBötC cells are born during the E10.5-11.5 period.

(a-c) Immunohistochemical stainings showing the perdurance of β -Gal protein between E15.5 and E18.5. (a,b) Merged expressions of Islet1,2 (red) and β -Gal (green) on 20 μ m transverse sections of *Dbx1^{LacZ/+}* embryos at E15.5 (a) and E18.5 (b). Half-sections are shown, with the dotted line representing the midline and the dotted square the preBötC area. (c) Histogram showing, in the preBötC area, the average number (\pm s.e.m.) of β -Gal⁺ cells per 20 μ m section. There is no obvious difference between the two developmental stages. (d-i) Birthdating experiments of β -Gal⁺ cells in the preBötC area on *Dbx1^{LacZ/+}* embryos. (d-h) Immunohistochemical stainings on 20 μ m transverse sections at E15.5 showing BrdU (red), β -Gal (green) and merged expressions (right panels) after single pulse BrdU injection (inj.) at indicated stage. Co-expression (yellow) was only observed when BrdU was injected at E10.5 (e) or E11.5 (f). (i) Histogram showing, in the preBötC area, the percentage of β -Gal⁺ cells that were also positive for BrdU, for each stage of BrdU injection (BrdU inj.). Scale bars (in μ m): a,b (300); d-h (50). n.a.: nucleus ambiguus.



Supplementary Figure 2: Phox2b⁺ and Vglut2⁺ cells of the e-pF oscillator are maintained in Dbx1 null mice.

Immunohistochemical stainings and ISH at E15.5 on 20 μm transverse sections at the level of the e-pF, on *Dbx1^{LacZ/+}* (**a,b**) and *Dbx1^{LacZ/LacZ}* null (**c,d**) embryos. (**a**) Merged expressions of Islet1,2 (blue), β-Gal (Green) and Phox2b (red) showing Phox2b⁺, Islet1,2⁻ e-pF cells (arrows) located beneath and lateral to the facial motor nucleus (nVII, expressing both markers; left sides are shown). Note that none are co-expressing β-Gal. (**b**) Merged expressions of Islet1,2 (blue), β-Gal (Green) and vGlut2 ISH (red), showing that glutamatergic e-pF cells (arrows) are not co-expressing β-Gal. (**c,d**) Same experiments as in (**a**) and (**b**) in *Dbx1^{LacZ/LacZ}* null embryos, showing that e-pF cells are maintained (arrows). Scale bar (in μm): 200.



Supplementary Figure 3: Robo3 is expressed by Dbx1-derived interneurons.

Immunohistochemical stainings of E15.5 transverse sections of *Robo3^{GFP/+}* embryos also carrying either the *Dbx1* heterozygous mutation (*Dbx1^{LacZ/+};Robo3^{GFP/+}*, **a,b**) or the *Dbx1* null mutation (*Dbx1^{LacZ/LacZ};Robo3^{GFP/+}*, **c,d**). **(a)** GFP expression (Green), β -Gal expression (red) and merged expressions in the preBötC area showing co-labeled (yellow) somas. **(b)** Histogram showing, in the preBötC area, the fractions of GFP⁺ cells, presumably commissural, that are *Dbx1*-derived (yellow) or not (green). **(c)** Same experiment as in **(a)** on a *Dbx1* null embryo. Note the almost complete absence of double-labeled somas. **(d)** Same quantification as in **(b)** in a *Dbx1* null embryo, showing a reduction of the total number of GFP⁺ cells, largely owing to the lack of double-labeled GFP⁺, β -Gal⁺ cells. In **(b)** and **(d)** cells were counted in the preBötC area in 2-7 20 μ m sections from 3 and 2 animals respectively and results are given as the average number of cells in the preBötC area per 20 μ m section (\pm s.e.m.). Scale bars (in μ m): 50. n.a.: nucleus ambiguus.

4 - Résultats complémentaires

Cette section présentera des données s'inscrivant dans notre problématique mais non-incluses dans la publication. Elles adressent le devenir des progéniteurs p0 en l'absence de Dbx1.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les progéniteurs privés d'un facteur de transcription nécessaire à l'acquisition de leur identité ne sont pas éliminés. Typiquement, ils adoptent une identité moléculaire caractéristique de progéniteurs immédiatement adjacents, un phénomène qualifié de respécification (ou transfating). Nous avons aussi vu que cette respécification affecte la production des neurones post-mitotiques et peut donc être significative lors de l'étude des conséquences fonctionnelles d'une mutation nulle d'un facteur de transcription impliqué dans l'identité des progéniteurs.

Au niveau axial contenant le preBötC, les résultats présentés dans la publication montrent que les progéniteurs p0 respécifiés produisent des neurones qui migrent dans la région du preBötC et s'y trouvent en effectif comparable avec la situation des animaux contrôles. L'identité des interneurones produits n'a cependant pas été adressée plus en détails dans la publication. La section suivante présente les quelques données obtenues pendant cette thèse, parfois largement préliminaires, qui adressent cette question.

4.1 - La respécification vers une identité dorsale dB4

Nous avons dans un premier temps recherché une éventuelle respécification des progéniteurs p0 vers une identité dB4 immédiatement plus dorsale. Ce domaine donne naissance à des interneurones caractérisés par l'expression du facteur de transcription Lbx1. A l'aide de marquages immunohistochimiques, nous avons compté la proportion de cellules β -Gal⁺ co-exprimant Lbx1 dans la région du preBötC au stade E15.5 (Figure 33). Chez les embryons *Dbx1^{LacZ/+}*, l'expression de Lbx1 est détectée au sein d'une faible fraction de cellules β -Gal⁺ (7,2 %, 175/2422 cellules, n=2 embryons). Cette proportion devient significative (32,7 %, 594/1819 cellules, n=2) chez les animaux *Dbx1^{LacZ/LacZ}*. Environ un quart des neurones issus des progéniteurs p0 respécifiés adoptent donc une identité dB4. Les comptages ont été effectués dans la région du preBötC, donc concernent uniquement, parmi les neurones respécifiés, ceux ayant migré dans cette région. Il est ainsi possible que la proportion de respécification à l'échelle de l'ensemble des progéniteurs du domaine p0 soit différente.

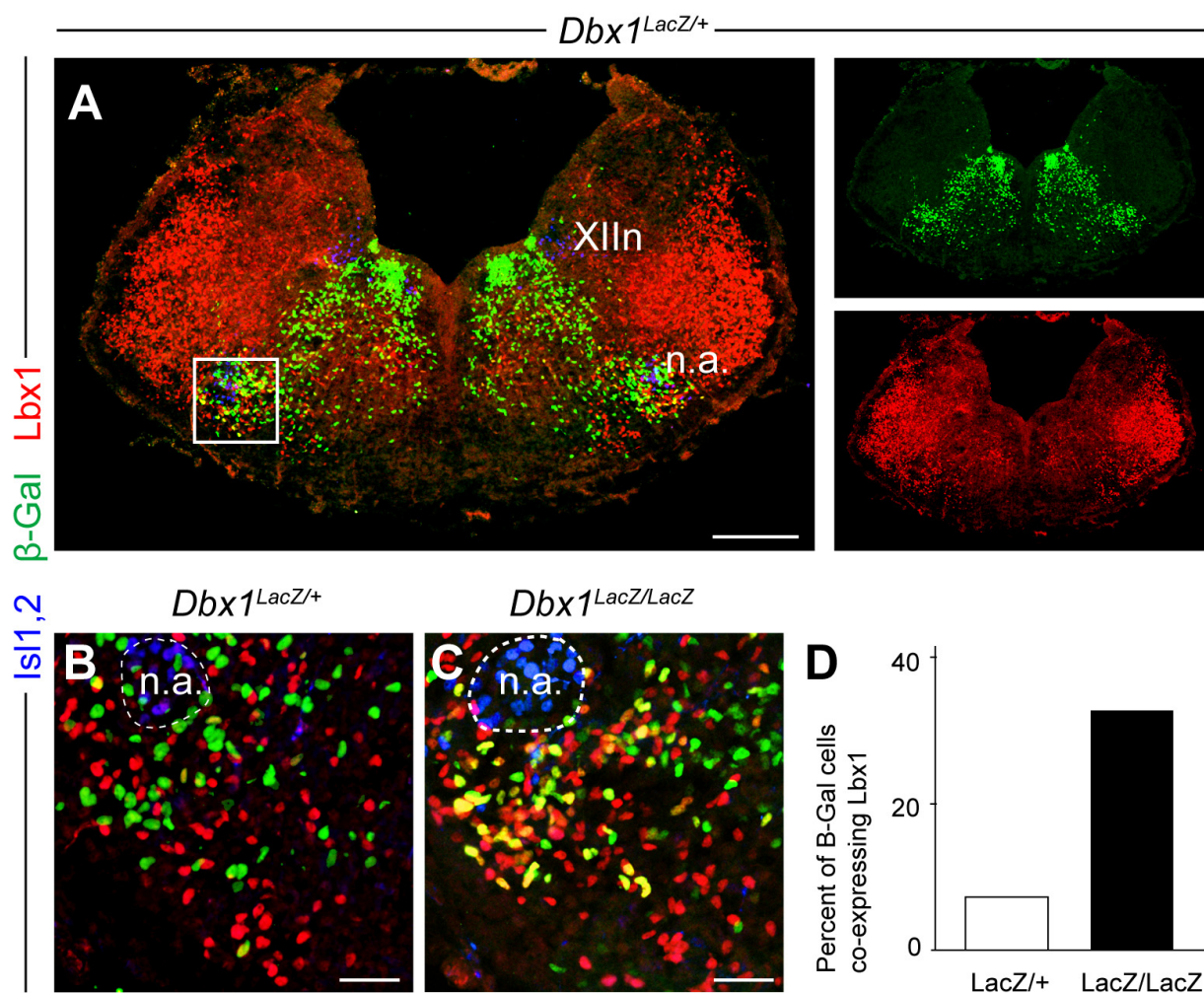


Figure 33 : respécification des interneurons V0 vers une identité dB4 en l'absence de Dbx1.

(A-C). Triple marquage immunohistochimique dirigé contre le marqueur de motoneurons *Isl1,2* (*Isl1,2*, bleu), la β -galactosidase (β -Gal, vert) et la protéine *Lbx1* (rouge) et réalisé sur des sections de tronc cérébral au niveau axial du preBötC chez des embryons *Dbx1^{LacZ/+}* (A, B) et *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (C) au stade E15.5. L'image en A illustre une tranche entière, ainsi que la région du preBötC (carré blanc). Les images en (B) et (C) sont des observations à plus fort grossissement de la région du preBötC. La fraction de cellules β -Gal⁺ co-exprimant (*Lbx1*) au sein du preBötC est nettement augmentée chez les animaux privés de *Dbx1*.

(D). Histogramme illustrant le pourcentage de cellules β -Gal⁺ co-exprimant *Lbx1* dans les deux génotypes (*n*=2 préparations dans chaque cas).

XIIIn : noyau moteur de l'hypoglosse ; n.a. : noyau ambigu. Barres d'échelle : 300 μ m (A), 50 μ m (B,C).

4.2 - L'acquisition d'un phénotype GABAergique

Il a été décrit qu'une population significative d'interneurones de type dB4 adopte un phénotype GABAergique (Cheng et al., 2004; Cheng et al., 2005). Nous avons donc recherché l'expression du neurotransmetteur GABA dans la région du preBötC au sein des interneurons dérivés des progéniteurs p0 (Figure 34). Sur des sections issues d'animaux *Dbx1^{LacZ/+}*, le GABA n'est jamais détecté au sein des cellules β -Gal⁺ (0,7 % soit 7/942 cellules, *n*=1 animal).

Chez les mutants *Dbx1^{LacZ/LacZ}*, nous avons observé une légère augmentation du nombre de somas doublement marqués (14 % des cellules β -Gal⁺ soit 84/514 cellules, n=1 animal). Bien que préliminaires puisque réalisées sur un seul animal, ces observations suggèrent qu'en l'absence de *Dbx1*, une fraction de neurones issus des progéniteurs p0 respécifiés adopte un phénotype GABAergique. Les anticorps dirigés contre *Lbx1* et GABA étant produits chez la même espèce, nous n'avons pas pu analyser dans quelle mesure cette augmentation était associée à une respécification en types neuronaux dB4.

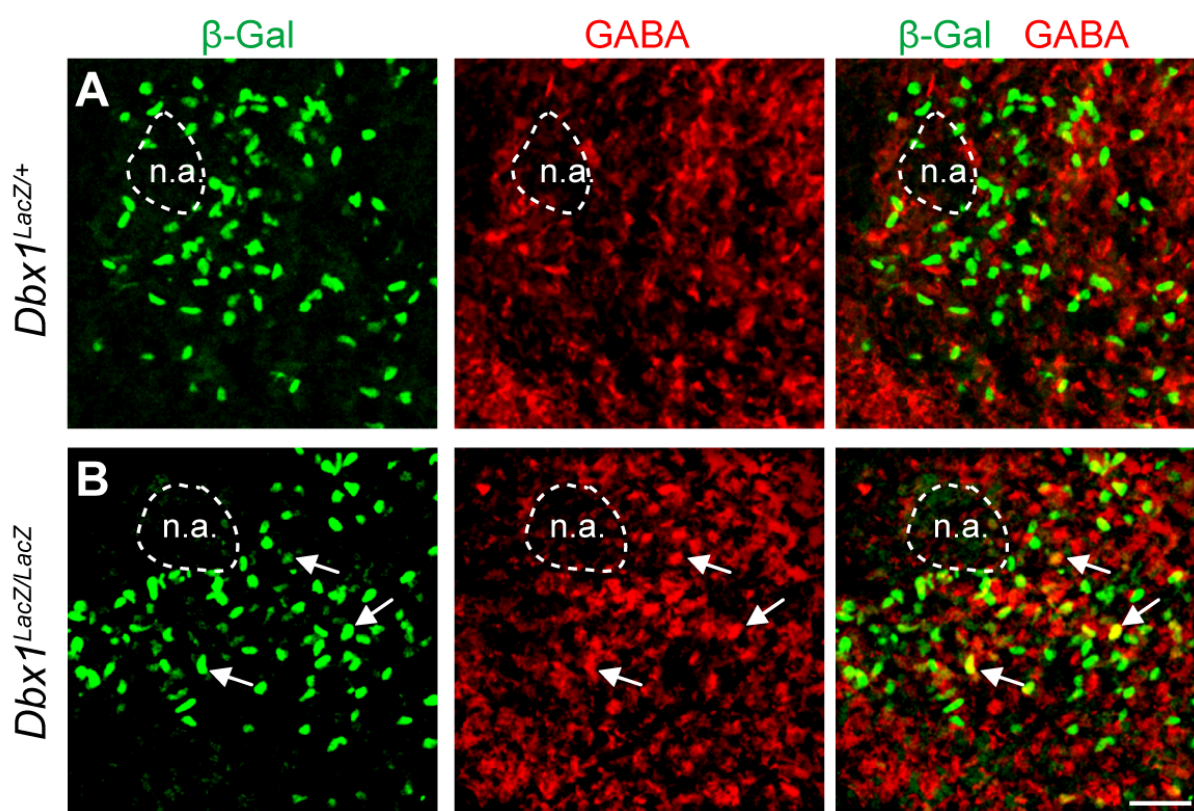


Figure 34 : acquisition d'un phénotype GABAergique par les interneurons V0 en l'absence de *Dbx1*. Expression de la β -galactosidase (β -Gal, vert, à gauche) et du GABA (rouge, au milieu) dans la région du preBötC chez des embryons *Dbx1^{LacZ/+}* (A) et *Dbx1^{LacZ/LacZ}* (B) au stade E15.5. L'image superposée est illustrée à droite. La co-expression (jaune, flèches) du GABA et de la β -Gal n'est détectée que chez les mutants nuls *Dbx1^{LacZ/LacZ}*. n.a. : noyau ambigu. Barre d'échelle : 50 μ m.

4.3 - La respécification vers l'identité ventrale p1

Nous avons tenté de caractériser une éventuelle respécification des progéniteurs p0 vers l'identité p1, immédiatement ventrale. Des immunomarquages dirigés contre *Engrailed-1* (*En1*), marqueur post-mitotique des neurones V1 ont été entrepris. Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter de neurones *En1*⁺ dans les sections réalisées au niveau axial du preBötC au stade 15.5, que ce soit sur les animaux *Dbx1^{LacZ/+}* ou *Dbx1^{LacZ/LacZ}*. Quelques

cellules $En1^+$ sont détectables aux niveaux axiaux plus rostraux (notamment au niveau de l'e-pF/pFRG/RTN), éliminant la possibilité d'une sous-régulation de ce facteur de transcription au stade considéré ou un manque d'efficacité de l'anticorps. En outre, des données indépendantes indiquent que les niveaux axiaux les plus caudaux du rhombencéphale, soit ceux correspondant aux rhombomères 7 et 8 dont est vraisemblablement issu le preBötC, sont dépourvus de progéniteurs p1 $Dbx1^-/Dbx2^+$ (A. Pierani, communication personnelle). Ces observations suggèrent qu'au sein du preBötC, les cellules issues des progéniteurs p0 respécifiées n'adoptent pas une identité de type V1, absente à ce niveau axial.

4.4 - Le maintien d'une signature neuronale

A défaut de l'acquisition de phénotypes glutamatergiques (publication) et GABAergiques (ci-dessus), les neurones de la région du preBötC issus des progéniteurs p0 respécifiées pourraient être des cellules gliales (voir Lanuza et al., 2004). Nous avons recherché la présence du marqueur neuronal NeuN (Mullen et al., 1992) au sein des cellules $\beta\text{-Gal}^+$ dans la région du preBötC au stade E18.5 (Figure 35). Sur les préparations issues d'animaux

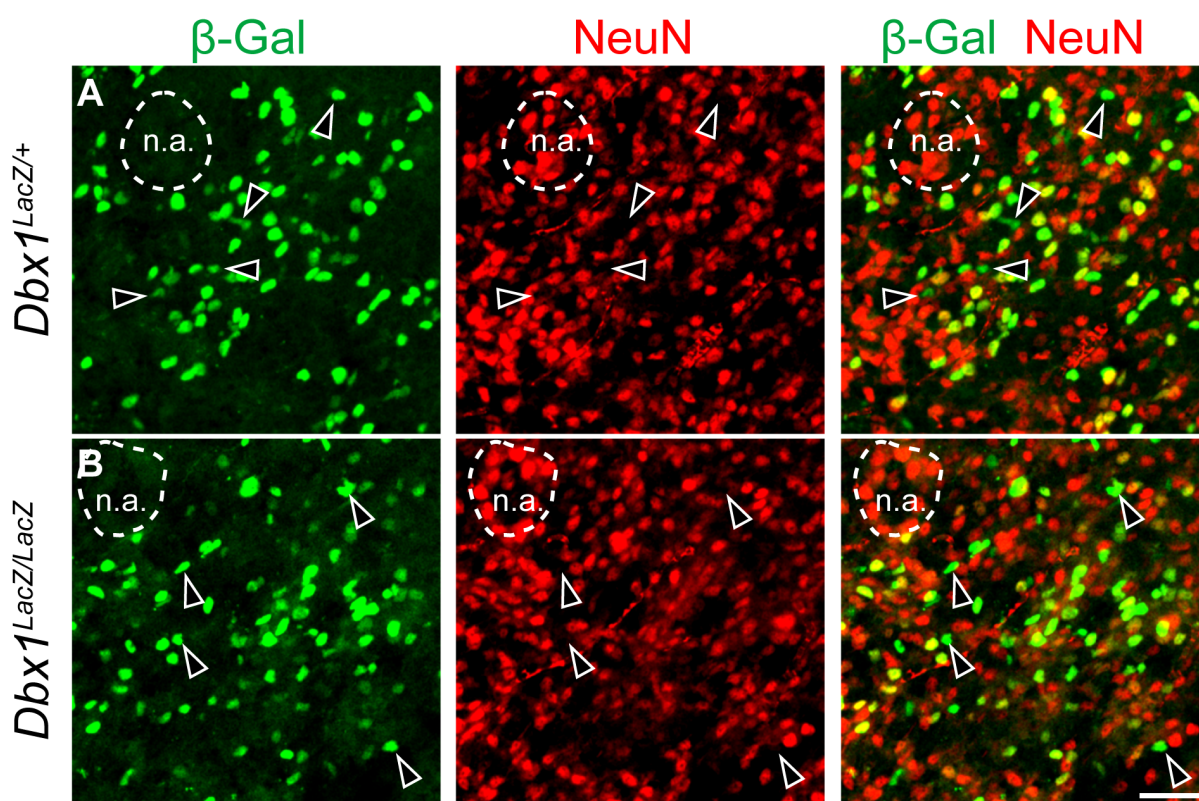


Figure 35 : maintien de l'identité neuronale par les interneurons V0 en l'absence de Dbx1.

Expression de la β -galactosidase ($\beta\text{-Gal}$, vert, à gauche) et du marqueur neuronal NeuN (rouge, au milieu) dans la région du preBötC chez des embryons $Dbx1^{LacZ/+}$ (A) et $Dbx1^{LacZ/LacZ}$ (B) au stade E15.5. L'image superposée est illustrée à droite. Dans les deux génotypes, la majorité des cellules $\beta\text{-Gal}^+$ co-exprime (jaune) NeuN, suggérant qu'il s'agit de neurones et que la mutation n'entraîne pas de respécification vers un type glial.

Les têtes de flèche vides indiquent les cellules $\beta\text{-Gal}^+$ ne co-exprimant pas NeuN.

n.a. : noyau ambigu. Barre d'échelle : 50 μm .

Dbx1^{LacZ/+}, la majorité des cellules β -Gal⁺ co-exprime NeuN (87,2 %, 559/641 cellules, n=1 animal) suggérant qu'il s'agit de neurones. Cette proportion ne semble pas significativement affectée par l'absence de *Dbx1* (*Dbx1^{LacZ/LacZ}* : 82,3 %, 386/469, n = 1). Bien que largement préliminaires, ces résultats suggèrent qu'au sein du preBötC, les cellules issues des progéniteurs p0, respécifiés ou non, sont majoritairement de nature neuronale. Nous n'avons pas obtenu de signal par un immunomarquage dirigé contre la protéine acide fibrillaire gliale (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) aux stades embryonnaires testés (E15.5, E18.5).

4.5 - Conclusions

Ces résultats indiquent que dans la région du preBötC (i) une partie (20%) des neurones issues des progéniteurs respécifiés exprime *Lbx1*, normalement cantonné aux cellules issus des domaines dorsaux dB1-DB4, et (ii) certains d'entre eux, et possiblement ceux exprimant *Lbx1*, acquièrent un phénotype GABAergique. Il n'en demeure pas moins que l'identité de la majorité des neurones β -Gal⁺ chez le mutant *Dbx1* nul reste inconnue.

II. DISSECTION GÉNÉTIQUE DE LA CONNECTIVITÉ AU SEIN DU RÉSEAU NEURONAL RESPIRATOIRE EMBRYONNAIRE

Les résultats présentés au chapitre précédent indiquent qu'un même facteur de transcription, *Dbx1*, contrôle à la fois la spécification des interneurons à l'origine du rythme et ceux assurant la connectivité commissurale au sein du preBötC. J'évoquerai la possibilité qu'il s'agisse de la même population neuronale dans la discussion. Quoiqu'il en soit, nos observations reposent principalement sur une méthode de traçage (injection de biocytine) qui révèle exclusivement les neurones qui envoient des projections commissurales dans le plan de la tranche (Publication Figure 5). En outre, l'invalidation conditionnelle de *Robo3* au sein des interneurons V0 conduit à une perte de la synchronisation bilatérale au niveau de l'oscillateur (Publication, Figure 7). La contribution des interneurons V0 à la connectivité commissurale depuis le preBötC vers d'autres structures, notamment l'e-pF, les relais prémoteurs ou les sorties motrices, n'a pas été questionnée.

J'ai choisi de présenter ici les quelques résultats préliminaires que j'ai pu obtenir au cours de ma thèse qui adressent cette question. Ils illustrent les retombées fonctionnelles de l'approche développementale mise en œuvre ici, et permettent d'enrichir le schéma de connectivité entre les oscillateurs. Ces observations constituent en outre le point de départ d'un nouveau projet de recherche au sein du laboratoire visant à la dissection génétique et fonctionnelle de la connectivité entre les oscillateurs.

1 - La synchronisation bilatérale de l'e-pF

Nous avons vu qu'en l'absence de *Dbx1* (embryons *Dbx1^{LacZ/LacZ}*), le preBötC est dépourvu de toute activité mais que l'activité de l'e-pF est préservée (Publication, Figure 1). L'analyse plus détaillée de cette activité persistante révèle qu'elle n'est pas synchronisée bilatéralement (Figure 36). Sans participer directement à la rythmogenèse au sein de l'e-pF, les interneurons V0 sont donc néanmoins requis pour sa synchronisation bilatérale.

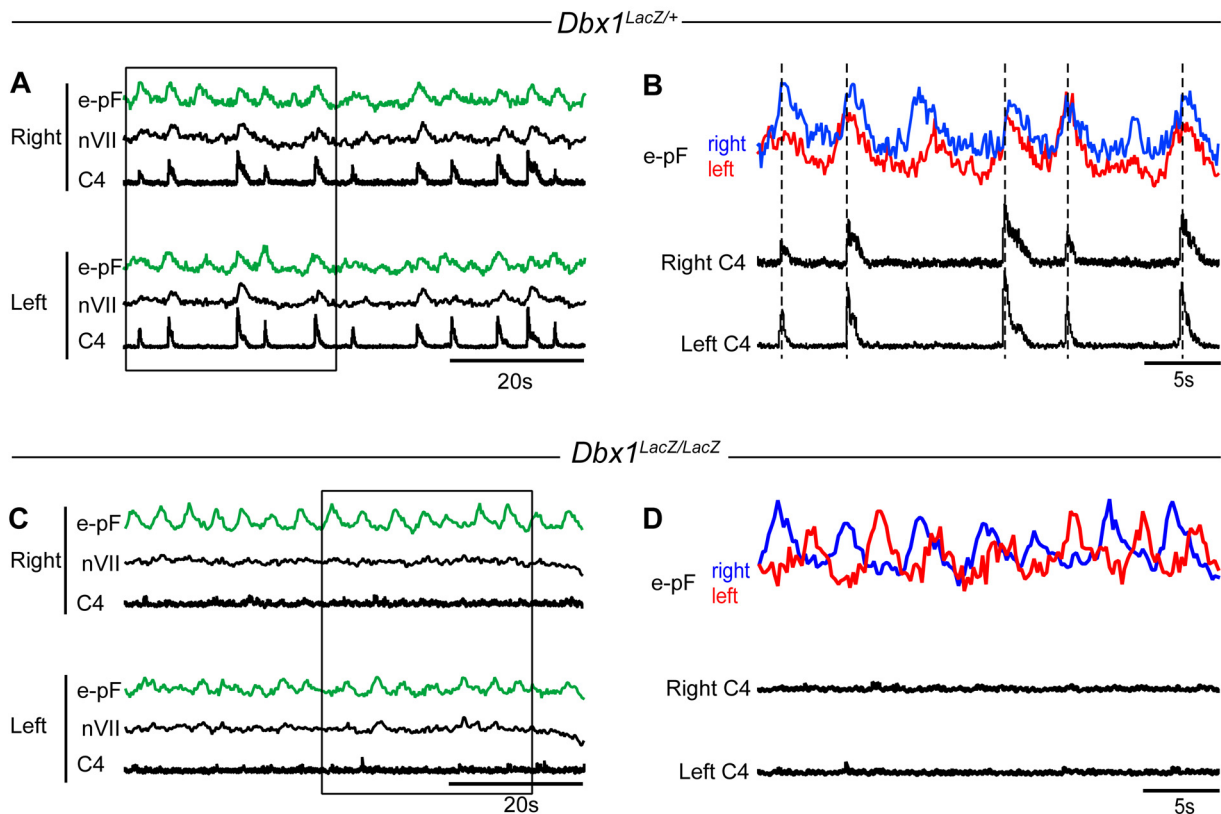


Figure 36 : désynchronisation bilatérale de l'oscillateur de l'e-pF en l'absence de Dbx1.

Enregistrements simultanés de l'e-pF (traces vertes) et du noyau facial (nVII) par imagerie calcique et de la racine cervicale 4 (C4) par électrophysiologie, des côtés droit (right) et gauche (left) d'une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés au stade E15.5.

(A,B). Enregistrements chez des embryons $Dbx1^{LacZ/+}$. La portion du tracé encadrée en (A) est élargie en (B). L'activité de l'e-pF, partiellement couplée à celle des sorties motrices à ce stade (voir la troisième décharge en (B)) est bilatéralement synchronisée (e-pF de droite en bleu, e-pF de gauche en rouge).

(C,D). Mêmes expériences qu'en (A) et (B) chez des embryons $Dbx1^{LacZ/LacZ}$ illustrant l'absence de synchronisation bilatérale de l'e-pF. Ces observations ont été reproduites sur 3 préparations.

2 - La synchronisation bilatérale des activités motrices

En l'absence de Dbx1, l'activité rythmique des motoneurons faciaux (nVII) et de la racine du nerf phrénique (C4) est abolie. Il était donc impossible d'adresser la contribution des neurones V0 sur la transmission de l'activité rythmique vers les nerfs respiratoires à l'aide des mutants $Dbx1^{LacZ/LacZ}$. En revanche, chez les mutants conditionnels $Dbx1::cre;Robo3^{LoxP/LoxP}$, les cellules V0 sont produites mais, privées de la protéine Robo3 fonctionnelle, elles ne peuvent pas franchir la ligne médiane, avec pour conséquence la désynchronisation bilatérale de l'oscillateur du preBötC (Publication, Figure 7). Nous avons donc recherché l'impact de cette mutation conditionnelle de Robo3 sur le comportement respiratoire *in vivo* et sur les activités rythmiques motrices *in vitro*.

De manière remarquable, les 4 animaux mutants conditionnels obtenus au stade E18.5 par césarienne ont adopté dans les 10 minutes une activité ventilatoire indiscernable de celles des animaux contrôles. En particulier, aucun ne présentait de mouvements désynchronisés de la cage thoracique, un phénotype caractéristique des mutants *Robo3* nuls (voir vidéo supplémentaire de la publication). L'absence de projections commissurales par les interneurons V0 n'entraîne donc pas de phénotype à l'échelle des mouvements inspiratoires. Pour autant, seuls les animaux contrôles (de la même portée) ont survécu après avoir été placés

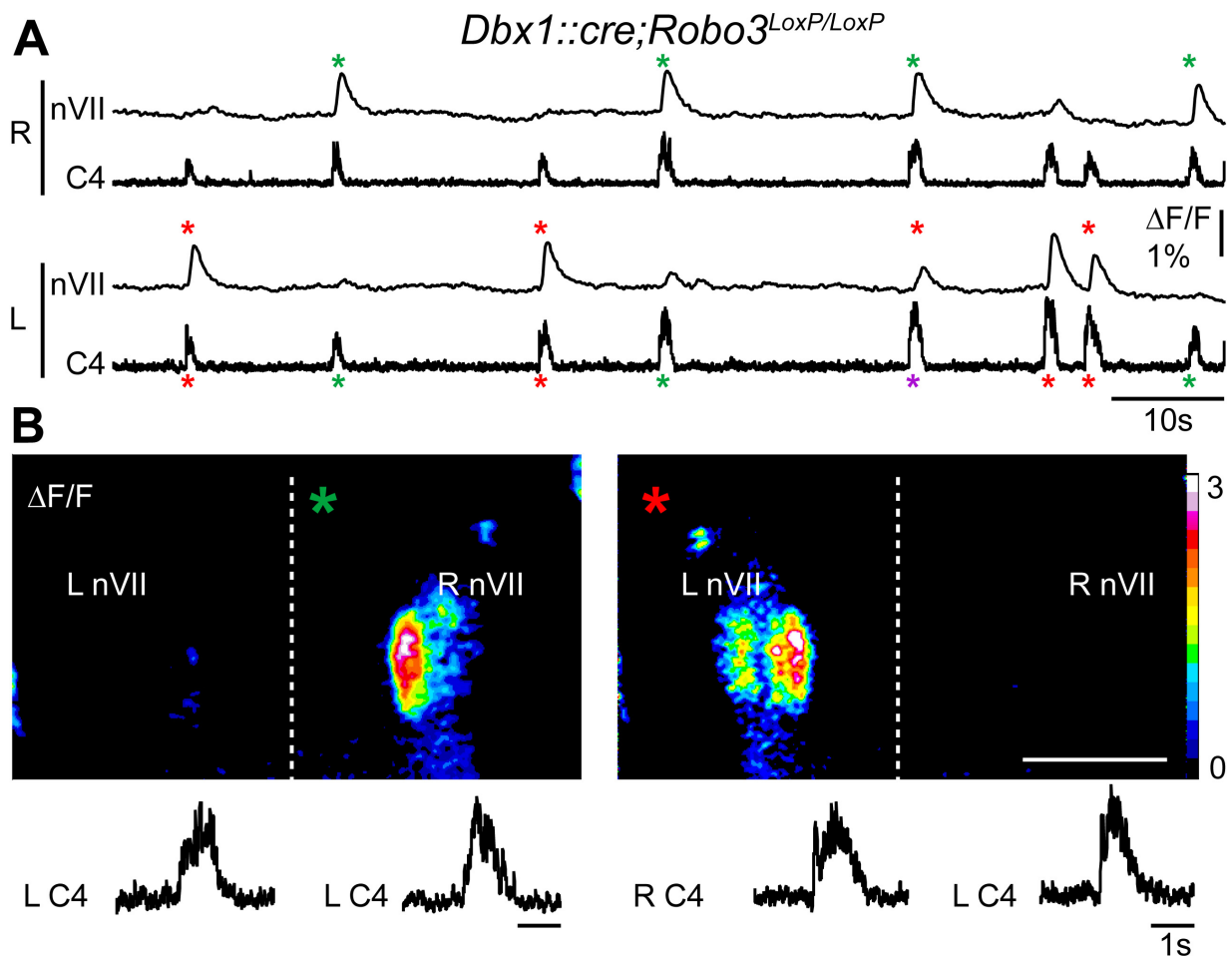


Figure 37 : phénotype moteur résultant de l'inactivation sélective de *Robo3* au sein des interneurons V0.

Seuls les tracés obtenus chez les embryons *Dbx1::cre;Robo3^{LoxP/LoxP}* sont représentés. Les animaux contrôles génèrent une activité entièrement synchronisée bilatéralement et entre les différents étages moteurs, comme l'illustrent la figure 35 et la figure 6 de la publication.

(A). Tracés correspondant aux enregistrements simultanés des décharges du noyau moteur facial (nVII) par imagerie calcique et de la racine cervicale 4 (C4) par électrophysiologie (signal intégré) des deux côtés (droite : R, gauche : L) d'une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés au stade E15.5. Les décharges du noyau facial ne sont pas synchronisées bilatéralement (droite : astérisque verte, gauche : astérisque rouge), mais se manifestent sur les deux racines C4 dont l'activité paraît alors synchronisée. L'astérisque violette indique une décharge des racines C4 concomitante à une décharge synchronisée des deux noyaux faciaux.

(B). Les images illustrent le pourcentage de variations de fluorescence ($\Delta F/F$) pendant une décharge unilatérale du noyau facial droit (astérisque verte, image de gauche) ou gauche (astérisque rouge, image de droite). Les tracés électrophysiologiques en dessous représentent les décharges des racines C4 associées. Barre d'échelle sur les images : 500 μm .

avec une femelle allaitante. Cela suggère l'existence d'un déficit léthal associé à la mutation conditionnelle mais indépendant de la capacité à générer des contractions diaphragmatiques bilatéralement coordonnées.

Nous avons analysé le profil d'activité de la sortie motrice C4 et du noyau facial à l'aide d'enregistrements optiques et électrophysiologiques respectivement, sur des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolé au stade E15.5. Toutes les préparations observées (n=4) montraient une perte de synchronisation bilatérale des décharges des noyaux faciaux (Figure 37). Ce phénotype reflète une transmission ipsilatérale de l'excitation des deux preBötC actifs indépendamment de part et d'autre de la ligne médiane. De manière surprenante, les activités enregistrées sur les racines C4 des côtés droit et gauche n'étaient jamais totalement désynchronisées, comme c'est le cas chez les mutants *Robo3* nuls. Sur deux préparations, elles étaient même parfaitement en phase (Figure 37).

3 - Conclusions

L'ensemble de ces observations suggère que la synchronisation bilatérale des activités de l'e-pF dépend d'interneurones V0. Elle est donc prise en charge par un contingent cellulaire distinct de celui qui assure la rythmogenèse dans cet oscillateur, préservée en l'absence de *Dbx1*. D'autre part, ces résultats indiquent que des populations commissurales distinctes assurent la synchronisation bilatérale entre le preBötC et les différents étages moteurs. Entre le preBötC et les motoneurones faciaux, on retrouve une dépendance aux interneurones commissuraux V0 exprimant *Robo3*. En revanche, une désynchronisation est observée au niveau des sorties motrices inspiratoires (C4) lorsque *Robo3* est invalidé dans tous les types cellulaires, mais pas lorsqu'il est sélectivement invalidé au sein des interneurones V0. Il existerait donc une connectivité commissurale entre le preBötC et les racines C4, dépendante de *Robo3* mais qui n'implique pas les interneurones V0. Celle-ci pourrait être assurée aux étages prémoteurs ou moteurs, ou encore impliquer des voies descendantes croisées depuis le preBötC.

Discussion générale et perspectives

Par bien des aspects les oscillateurs respiratoires du tronc cérébral apparaissent maintenant comme des objets neurobiologiques singuliers à l'aide desquels, ou au sujet desquels, peuvent se décliner de multiples questions de biologie du développement et de physiologie des réseaux neuronaux, qui soulignent la porosité grandissante entre ces deux disciplines lorsqu'il s'agit d'expliquer comment les réseaux neuronaux réalisent et intègrent les fonctions cérébrales. Dans cette discussion nous tenterons, sur la base de l'exemple du complexe preBötzing, d'illustrer ce point.

Notre étude a surtout considéré les stades de développement précoces du tube neural contenant des progéniteurs neuraux et les stades où leur descendance neuronale est déjà connectée et forme un réseau neuronal, dans notre cas spontanément rythmique, avec des propriétés anatomo-fonctionnelles qui semblent être par la suite conservées. Ainsi, des aspects importants du développement des réseaux neuronaux ne sont pas documentés ici. En particulier, la période pendant laquelle les neurones sont déjà différenciés mais non encore impliqués dans des circuits fonctionnels, ainsi les questionnements sur les mécanismes conditionnant (i) les migrations cellulaires, (ii) la présence d'activités électriques rythmiques spontanées primordiales (O'Donovan, 1999; Ben-Ari, 2001; Zhang and Poo, 2001) et leur liens avec l'acquisition des phénotypes neurochimiques (Scain et al., 2010; Goodman and Shatz, 1993; Borodinsky et al., 2004; Spitzer et al., 2004; Spitzer, 2006) ne sont pas envisagés dans cette thèse.

Nous récapitulerons et discuterons les singularités de la population de neurones mise en évidence dans ce travail de thèse (Partie I) et exposerons (Partie II) de quelle manière les résultats obtenus peuvent être dorénavant l'enjeu de questions concernant :

- la coordination des schémas de régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale,
- la spécification cellulaire du phénotype glutamatergique,
- le contrôle d'un effectif neuronal.

I. RÔLE FONCTIONNEL DES NEURONES V0

1 - Les interneurones V0 constituent l'origine embryonnaire unique du preBötC

La contribution essentielle des travaux présentés dans cette thèse est la démonstration que les progéniteurs p0 caractérisés par l'expression de Dbx1 et leurs descendants cellulaires les interneurones V0, jouent un rôle vital au sein du réseau neuronal respiratoire. Dans ce paragraphe, nous allons discuter l'importance fonctionnelle de ce lignage et proposer qu'il constitue l'unique origine embryonnaire du preBötC, l'oscillateur respiratoire principal.

1.1 - Les interneurones V0 sont à l'origine de la rythmogenèse

La nécessité des interneurones V0 à la rythmogenèse respiratoire est dramatiquement illustrée chez les animaux génétiquement privés de Dbx1. A la naissance, ces derniers ne présentent aucun mouvement respiratoire (Publication, Figure 1). Par des investigations fonctionnelles sur des préparations réduites, nous montrons que ce phénotype est associé à une absence complète d'activité au sein de l'oscillateur principal, le preBötC. Nous montrons en outre que la mutation nulle de Dbx1 entraîne une diminution massive du nombre de neurones glutamatergiques au sein de l'oscillateur, y compris ceux co-exprimant NK1R et Sst (Publication, Figure 3). Ce déficit cellulaire est vraisemblablement la cause du dysfonctionnement des mutants. Les populations glutamatergiques spécifiées indépendamment de Dbx1, ou situées en dehors du preBötC comme celles de l'oscillateur de l'e-pF, sont incapables de compenser le déficit de rythmogenèse.

En outre, bien qu'il existe vraisemblablement une respécification des progéniteurs p0 privés de l'expression de Dbx1, notamment vers une identité dorsale de type dB4 (Figure 32), nous proposons que celle-ci ne soit pas responsable du déficit. D'une part, nous avons analysé les mutants *Nes:cre;Dbx1^{DTA}* chez qui les progéniteurs Dbx1⁺ sont physiquement éliminés par l'expression de la toxine diphtérique A (Bielle et al., 2005; Teissier et al., 2010). Nous avons retrouvé, tant à l'échelle de l'organisme que de l'oscillateur isolé, un déficit fonctionnel identique à celui des mutants Dbx1 nuls. Ainsi, respécification ou perte des cellules conduisent à l'absence de rythmogenèse au sein du preBötC. D'autre part, nous montrons que chez les animaux Dbx1 nuls, la respécification des progéniteurs n'altère pas significativement la migration des neurones qu'ils produisent vers la région du preBötC (Publication, Figure 3),

pourtant dépourvue de toute activité rythmique. Ainsi, une mise sous silence de l'oscillateur par l'activité des cellules respécifiées paraît peu probable. Enfin, en raison de l'action dépolarisante des courants médiés par l'ion chlorure aux stades embryonnaires (Owens and Kriegstein, 2002; Ren and Greer, 2006; voir aussi introduction, chapitre III, section 3), une augmentation de la signalisation GABAergique liée à une respécification en neurones dB4 chez les mutants *Dbx1* nuls peut difficilement expliquer la mise sous silence de l'oscillateur. Ces mécanismes de respécification n'ont pas été adressés plus en détails dans le cadre des travaux de cette thèse en raison notamment de l'apparente complexité de la situation. En particulier, nous ne sommes pas parvenus à caractériser une respécification vers une identité V1, immédiatement plus ventrale, comme cela a pu être observé dans la moelle épinière (Moran-Rivard et al., 2001; Pierani et al., 2001). Aucune cellule exprimant le facteur de transcription *Engrailed-1* (*En1*), caractéristique des neurones V1, descendants cellulaires des progéniteurs p1 (Burrill et al., 1997; Higashijima et al., 2004; Sapir et al., 2004), n'a pu être détectée dans la région du preBötC, que ce soit chez les animaux contrôles ou ceux qui portent la mutation nulle de *Dbx1*. Des résultats préliminaires indiquent que le domaine de progéniteurs p1 (*Dbx1*⁻/*Dbx2*⁺) serait absent des territoires rhombomériques les plus caudaux (A. Pierani, communication personnelle), notamment le rhombomère 7, d'où le preBötC est vraisemblablement originaire. L'identité des cellules qui maintiennent l'expression de la β -Gal mais qui n'adoptent pas une identité dB4 chez les mutants *Dbx1* nuls reste donc indéterminée.

D'un point de vue anatomique, nous avons montré sur des embryons issus de la lignée rapporteur *Dbx1*^{LacZ/+}, qu'une population d'interneurones V0 est positionnée ventralement dans la région anatomique du preBötC (Publication, Figures 2 et 3). En outre, des enregistrements électrophysiologiques des interneurones V0 sur la lignée rapporteur *Dbx1*^{iresGFP} révèlent qu'une majorité d'entre eux présente un profil d'activité caractéristique de neurones respiratoires (Publication, Figure 2). Par ailleurs, ils expriment majoritairement le transporteur vésiculaire du glutamate *Vglut2*, indiquant qu'il s'agit d'interneurones glutamatergiques. Enfin, l'expression de *Robo3*, signature du caractère commissural (Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004; Renier et al., 2010), n'est détectée que dans la moitié des interneurones V0 (Publication, Figure supplémentaire 3). Ce lignage participerait donc autant à la connectivité commissurale qu'ipsilatérale, et pourrait donc envoyer des projections locales au sein du preBötC. Ainsi, une fraction d'interneurones V0 glutamatergiques, respiratoires et projetant localement pourrait assurer la connectivité excitatrice récurrente sous-tendant la rythmogénèse selon le modèle du group-pacemaker (Rekling et al., 1996a; Rekling and

Feldman, 1998). Cette hypothèse pourrait être largement étayée par la caractérisation du profil de décharge et du site de projection de la population non-commissurale, notamment par des enregistrements électrophysiologiques de neurones individuels suivis de leur reconstitution morphologique.

Ces observations indiquent que les neurones V0 sont directement impliqués dans la rythmogenèse au sein du preBötC.

1.2 - Les interneurones V0 assurent la synchronisation bilatérale du rythme

Notre étude a par ailleurs établi que la synchronisation bilatérale des activités rythmiques est un trait vital du comportement respiratoire. Ce point est illustré par notre étude des animaux portant une invalidation génétique du récepteur de guidage axonal Robo3, totalement privé de projections commissurales au sein du bulbe (Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004). De façon remarquable, ces mutants présentent à la naissance des mouvements ventilatoires désynchronisés bilatéralement (Publication, vidéo supplémentaire), un comportement incompatible avec la survie. Ce phénotype est retrouvé à l'échelle de l'oscillateur isolé dans une préparation de tranche, où les activités sont générées indépendamment de part et d'autre de la ligne médiane (Publication, Figure 6). D'autres travaux avaient par ailleurs montré, sur cette même préparation, qu'une activité rythmique persiste ipsilatéralement après une section aigue le long de la ligne médiane (Thoby-Brisson et al., 2005; Tarras-Wahlberg and Reikling, 2009). Notre étude sur des embryons génétiquement privés de commissures établit que la connectivité commissurale n'est pas non plus requise à l'émergence des activités rythmiques pendant l'embryogenèse. Il n'en demeure pas moins que la synchronisation bilatérale du rythme respiratoire est un trait vital du comportement respiratoire acquis, au même titre que la rythmogenèse, à l'échelle de l'oscillateur. La question était alors de savoir si, à l'instar de la genèse du rythme, sa synchronisation bilatérale reposait sur des propriétés intrinsèques des interneurones V0. Par une méthode de traçage des projections neuronales, nous montrons en effet que la majorité des interneurones V0 projette directement vers le preBötC contralatéral (Publication, Figure 5). Cette connectivité repose sur l'expression de Robo3, instruite en aval de Dbx1 (Figure supplémentaire 3). L'invalidation génétique de Robo3 spécifiquement dans les descendants cellulaires des progéniteurs p0 suffit à entraîner une perte de synchronisation bilatérale à l'échelle de l'oscillateur (Publication, Figure 7), un phénotype similaire à celui des animaux portant l'invalidation complète Robo3. Ces expériences démontrent clairement la nécessité d'une connectivité commissurale par les neurones V0 pour l'élaboration, au sein du preBötC, d'une activité bilatéralement

synchronisée. Il reste toutefois à déterminer si les mêmes cellules assurent rythmogenèse et synchronisation bilatérale ou si les interneurones V0 constituent deux sous-groupes fonctionnels assurant chacun l'une de ces deux tâches. Il semble toutefois que certaines populations neuronales candidates à la rythmogenèse, notamment celles exprimant NK1R et Sst (Stornetta et al., 2003 ; Tan et al., 2009), et celles dotés de propriétés pacemaker (Koshiya and Smith, 1999) émettent des projections axonales commissurales. Nous montrons d'ailleurs qu'une fraction d'interneurones commissuraux dont les axones croisent dans le plan transverse de la préparation de tranche, co-exprime Sst (Publication, Figure 5). En conséquence, la synchronisation bilatérale de l'activité, trait fonctionnel vital du comportement respiratoire, est assurée au sein de l'oscillateur par une population d'interneurones V0 qui pourrait être largement chevauchante avec la population assurant la rythmogenèse.

1.3 - Le preBötC possède une origine embryonnaire unique

Nous établissons également que les descendants post-mitotiques des progéniteurs Dbx1-positifs contribuent à la totalité des neurones exprimant NK1R et/ou Sst, par ailleurs glutamatergiques, dans la région du preBötC. Ces derniers sont des constituants essentiels de l'oscillateur comme en témoigne de nombreuses études : i) la zone rythmique préservée sur une tranche récapitule le territoire d'expression de NK1R et Sst (Smith et al., 1991 ; Wang et al., 2001 ; Thoby-Brisson et al., 2005), ii) les neurones NK1R⁺ sont largement respiratoires et certains présentent des propriétés intrinsèques compatibles avec un rôle essentiel dans l'initiation des décharges (Gray et al., 1999 ; Rekling and Feldman, 1998 ; Pagliardini et al., 2005 ; Hayes and Del Negro, 2007) iii) la mise au silence moléculaire des neurones Sst⁺ dans cette région suffit à arrêter la genèse du rythme chez le rat éveillé (Tan et al., 2008).

Des populations issues d'autres domaines, notamment dorsaux, ont également été décrites dans la région anatomique de l'oscillateur. Pagliardini et al. (2008) rapportent la présence de nombreux neurones exprimant Lbx1, une signature post-mitotique caractéristique d'une origine dorsale dB1-dB4. Il est même apparu que ceux-ci sont au moins aussi nombreux que les interneurones V0 (Figure 33). Pour autant, aucun n'exprime des marqueurs cellulaires connus de l'oscillateur et leur absence n'empêche pas la genèse de l'activité rythmique (Pagliardini et al., 2008). Une remarque similaire peut être faite pour les neurones d'origine dorsale exprimant Math-1 (Atoh-1), certes peu nombreux, qui sont présents dans la région du preBötC (Rose et al., 2009).

Il apparaît que l'ensemble des propriétés anatomiques et fonctionnelles du preBötC est intégralement récapitulé par les descendants cellulaires du domaine de progéniteurs p0. Celui-ci constituerait donc l'unique origine embryonnaire du preBötC.

2 - Les interneurones V0 : un relai des activités de l'e-pF ?

Les résultats obtenus au cours de cette thèse suggèrent qu'au-delà de son implication cruciale à la rythmogenèse au sein du preBötC, le lignage V0 spécifié par Dbx1 est également impliqué dans la coordination des activités générées par les deux oscillateurs respiratoires. Nous montrons en effet qu'en l'absence de Dbx1, l'activité de l'e-pF est préservée mais ne se manifeste sur aucune des sorties motrices enregistrées (C4, XIIIn, nVII, Publication, Figure 1). Les progéniteurs Dbx1-positifs n'assurent pas la production des cellules rythmogènes de l'e-pF (voir aussi Publication, Figure supplémentaire 2) mais sont néanmoins nécessaires à l'intégration de son activité à l'échelle du réseau respiratoire. Deux hypothèses pour expliquer ces observations seront ici discutées. D'une part, les interneurones V0 constitueraient un centre intégrateur obligatoire des activités générées par l'e-pF. Nous verrons que cette éventualité est largement appuyée par la nécessité de Dbx1 à la synchronisation bilatérale des activités de l'e-pF. D'autre part, ils pourraient former un relai prémoteur requis pour la transmission des activités rythmiques vers les motoneurones respiratoires.

2.1 - Un relai commissural obligatoire

Les résultats complémentaires ont montré que chez les mutants Dbx1 nuls, l'activité rythmique préservée de l'e-pF n'est pas bilatéralement synchronisée (Figure 36). De manière intéressante, une désynchronisation similaire de l'activité de cet oscillateur est retrouvée i) sur l'e-pF isolé dans une tranche transversale ii) après blocage de la neurotransmission glutamatergique (Thoby-Brisson et al., 2009), iii) après réalisation d'une section caudale aux noyaux faciaux (Fortin and Thoby-Brisson, observations non publiées). Ces expériences montrent que la synchronisation des activités de l'e-pF n'est pas assurée par l'oscillateur lui-même. Elle semble au contraire contingente de neurones glutamatergiques du bulbe caudal dépendants de Dbx1. Les interneurones V0 du preBötC constituent des candidats privilégiés à la synchronisation bilatérale de l'e-pF. Les expériences de Mellen et al. (2003) proposaient déjà que le preBötC constitue un centre intégrateur de l'activité du réseau neuronal réseau pre-I. Un couplage fonctionnel entre les deux oscillateurs a également été décrit dès les stades embryonnaires (Thoby-Brisson et al., 2009). Les travaux présents permettent d'enrichir ce

schéma de connectivité. Une population d'interneurones V0 est ainsi requise pour la synchronisation bilatérale et la transmission vers les sorties motrices des activités générées au sein l'oscillateur de l'e-pF. Il doit ainsi exister des neurones V0 dont l'activité rythmique reflète celle de l'e-pF, même aux stades où cet oscillateur est le seul actif. Il serait intéressant de rechercher une telle population cellulaire et de vérifier si elle est chevauchante avec les interneurones V0 du preBötC qui assurent la rythmogenèse.

2.2 - Un relai préMOTEUR potentiel

Une hypothèse alternative pour expliquer l'absence de manifestation des activités de l'e-pF au niveau moteur chez les embryons *Dbx1* nuls invoque des groupes neuronaux préMOTEURS. En effet, au sein du tronc cérébral, la population neuronale V0 ventrale forme une colonne qui s'étend depuis la limite caudale des noyaux faciaux, en passant par le preBötC, et qui inclue tout ou partie du rVRG, riche en neurones préMOTEURS. Ainsi, il n'est ainsi pas impossible que certains neurones préMOTEURS situés à proximité immédiate ou au sein même du preBötC (Koizumi et al., 2008) soient de nature V0. Des interneurones V0 préMOTEURS ont notamment été caractérisés dans la moelle épinière (Lanuza et al., 2004; Zagoraiou et al., 2009). Le déficit d'entraînement moteur par l'e-pF chez les mutants *Dbx1* nuls pourrait refléter une perte de neurones préMOTEURS V0, directement contactés par des neurones rythmogènes de l'e-pF. Les sites de projection de ces derniers, et la localisation des premiers restent cependant à déterminer.

Le facteur de transcription Dbx1 est à l'origine de la spécification d'interneurones dont le rôle dépasse vraisemblablement la genèse de l'activité et sa synchronisation bilatérale à l'échelle du preBötC. Ils formeraient notamment un relai commissural obligatoire pour l'intégration des activités générées en amont au sein de l'e-pF/pFRG/RTN. Ils pourraient en outre constituer un relai préMOTEUR nécessaire à la transmission des activités rythmiques vers les sorties motrices respiratoires.

3 - L'origine embryonnaire distincte des deux oscillateurs

En identifiant un acteur clé de la production des neurones du preBötC pendant l'embryogenèse, les travaux menés dans cette thèse ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle les deux oscillateurs respiratoires ont une origine développementale distincte. En effet, mes travaux permettent d'affirmer que le programme développemental initié par *Dbx1*

aboutit à la spécification des neurones de l'oscillateur du preBötC mais pas à ceux de l'e-pF. Ceci est notamment illustré par le maintien d'une activité rythmique au sein de l'e-pF chez les animaux *Dbx1* nuls (Publication, Figure 1 et Figure supplémentaire 1). Réciproquement, l'activité rythmique du preBötC est maintenue chez les animaux génétiquement privés de l'e-pF (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009; Caubit et al., 2010). Ces observations indiquent que les deux oscillateurs sont spécifiés par des programmes distincts le long de l'axe dorso-ventral : le preBötC a une origine au sein des progéniteurs ventraux p0 alors que l'e-pF est originaire du domaine dorsal de progéniteurs dB2 (Dubreuil et al., 2009). Notre identification du lignage cellulaire aboutissant au preBötC constitue donc un nouvel outil dans l'étude des interactions entre les deux oscillateurs qui participent à l'élaboration d'une commande respiratoire normale pendant l'embryogenèse.

Par ailleurs, les travaux précédents du laboratoire suggèrent que chaque oscillateur dérive de territoires segmentaires distincts. Ainsi, l'e-pF est spécifié au sein des rhombomères r3/r5 exprimant le facteur de transcription *Egr-2/Krox20* (Thoby-Brisson et al., 2009), alors que le preBötC dérive vraisemblablement de segments plus caudaux pouvant impliquer r7/r8 (Borday et al., 2006). Associées aux résultats de cette thèse, ces observations indiquent que les deux oscillateurs sont produits à partir de programmes développementaux distincts : le preBötC dérive de progéniteurs p0 produits caudalement (r7/r8) alors que l'e-pF dérive de progéniteurs dB2 vraisemblablement localisés en r5. Ainsi, les oscillateurs respiratoires ne constituent pas des homologues segmentaires. Ces programmes n'ont en commun que la production de neurones glutamatergiques et diffèrent à la fois par la localisation des cellules qui en découlent et par les principes opératoires distincts des réseaux neuronaux formés.

Ces divergences pourraient refléter une origine évolutive distincte des deux oscillateurs (voir pour revue Wilson et al., 2006). On trouve notamment chez la grenouille post-métamorphique deux comportements respiratoires particulièrement coordonnés, une ventilation de la cavité buccale et une ventilation pulmonaire. Chacun de ces comportements est gouverné par un oscillateur dédié du tronc cérébral. A l'heure actuelle, l'homologie avec les oscillateurs respiratoires de mammifères est sous-tendue par une série d'observations essentiellement pharmacologiques (Galante et al., 1996; Broch et al., 2002; Vasilakos et al., 2005). Il en ressort que l'oscillateur de l'activité pulmonaire pourrait être homologue au preBötC, alors que celui de l'activité buccale s'apparenterait au réseau pre-I de l'e-pF/pFRG/RTN. L'avancement futur de la génomique pourrait permettre d'adresser si des acteurs développementaux similaires à ceux décrits pour les oscillateurs respiratoires des mammifères

sont retrouvés chez l'amphibien. Une telle étude pourrait considérablement alimenter l'hypothèse de l'homologie et renseigner sur l'origine évolutive de chaque oscillateur.

4 - Les interneurons V0 au sein d'autres réseaux neuronaux

Les résultats présentés dans cette thèse illustrent, sur le générateur central respiratoire, l'intérêt d'une approche associant neurobiologie du développement et neurophysiologie pour la compréhension de l'organisation fonctionnelle des réseaux neuronaux. Une contribution du lignage cellulaire spécifié par Dbx1 dans d'autres structures cérébrales a été par ailleurs caractérisée. Nous allons ici comparer son rôle au sein du réseau neuronal respiratoire bulbaire avec son implication au sein de celui qui gouverne, dans la moelle épinière, le comportement locomoteur. Dbx1 semble par ailleurs jouer le rôle d'un organisateur du développement cortical (Bielle et al., 2005; Griveau et al., 2010; Teissier et al., 2010). En revanche, l'absence actuelle de données fonctionnelles au niveau du cortex, et de données moléculaires au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière, empêche la discussion du rôle comparé de Dbx1 dans les régions antérieures et postérieures du tube neural.

Le comportement locomoteur est caractérisé par i) la genèse d'épisodes d'activité rythmiques, ii) une coordination ipsilatérale entre segments médullaires distincts, qui se reflète par une alternance des activités dédiées aux flexeurs et extenseurs, iii) une alternance bilatérale, pour un même segment médullaire, des activités produites de part et d'autre de la ligne médiane. Il est maintenant établi qu'un réseau neuronal dans les couches VII et VIII de la moelle épinière ventrale, qualifié de CPG locomoteur, assure ces trois fonctions (voir par exemple la revue de Kiehn, 2006). De manière intéressante, on y retrouve une implication cruciale des interneurons V0.

Par exemple, et de manière comparable à l'approche mise en œuvre dans cette thèse au sein du tronc cérébral, on attend des neurones impliqués dans la genèse du rythme locomoteur i) qu'ils soient positionnés dans la région ventrale des couches VII et VIII, ii) qu'ils soient recrutés lorsque la locomotion fictive est induite, et iii) que leur présence soit requise pour l'élaboration du rythme. D'une part, lorsque la locomotion fictive est induite *in vitro*, les interneurons V0 expriment le gène d'activité neuronale c-fos (Lanuza et al., 2004) et présentent un profil de décharge en phase avec l'activité rythmique des sorties motrices du même segment (Dyck and Gosgnach, 2009). En revanche, leur absence chez les mutants Dbx1

nuls ne conduit pas à une disparition de l'activité rythmique sur les préparations de moelle épinière isolée aux stades embryonnaires (Lanuza et al., 2004). Il faut mentionner qu'à la différence du rythme respiratoire, qui est spontanément présent *in vitro*, l'activité locomotrice fictive doit être induite et entretenue pharmacologiquement. Cette situation rend plus difficile l'analyse de la contribution sélective d'un type neuronal à la genèse du rythme. En revanche, l'implication des interneurones V0 dans la coordination des activités locomotrices de part et d'autre de la ligne médiane a été bien montrée. Ils apparaissent comme les acteurs principaux de l'alternance droite/gauche des phases d'activité (Lanuza et al., 2004). La majorité d'entre eux envoie des projections inhibitrices vers les motoneurones contralatéraux. Chez les mutants *Dbx1*, la locomotion fictive aux stades embryonnaires est caractérisée par la présence anormale d'une synchronisation bilatérale des activités (Lanuza et al., 2004). En effet, alors que les interneurones V0 sont largement glutamatergiques et transmettent contralateralement leur excitation synchronisant bilatéralement l'activité du preBötC, ils sont largement inhibiteurs dans le CPG locomoteur et assurent l'alternance bilatérale des décharges. La nature neurochimique excitatrice et inhibitrice des interneurones V0 dans le tronc cérébral et la moelle épinière semble constituer une divergence fondamentale des organisations de ces deux CPGs. Nous discuterons dans les perspectives les mécanismes qui pourraient influencer cette divergence.

Le facteur de transcription Dbx1 participe donc à l'élaboration de différents systèmes neuronaux qu'ils soient impliqués dans l'élaboration d'un comportement moteur ou dans le contrôle de l'organisation corticale.

II. ENJEUX ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de cette thèse (Chapitre IV), des molécules appartenant aux voies de signalisation Shh et Bmp définissent un code combinatoire d'expression de facteurs de transcription déterminant l'identité des progéniteurs neuraux. A mesure que les précurseurs neuronaux sortent du cycle cellulaire, ce code combinatoire initie l'expression d'une cascade de facteurs de transcription déterminant l'expression de gènes effecteurs participant à des programmes neurogéniques produisant des types neuronaux spécifiques (voir la revue de Jessell, 2000). Ces programmes conditionnent l'identité fonctionnelle du neurone et influencent un ensemble de propriétés cellulaires qui peuvent inclure la trajectoire des axones, la spécification d'un neurotransmetteur et l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs, par exemple à l'acétylcholine dans les motoneurones (Tanabe et al., 1998). Dans le preBötC, certaines des propriétés cellulaires requises pour son fonctionnement sont connues : les neurones sont glutamatergiques et pour part présentent un axone qui traverse la ligne médiane. Ainsi, les travaux futurs devraient s'attacher à comprendre comment le programme neurogénique conduisant au preBötC peut être restreint axialement au sein du tronc cérébral, comment le nombre réduit des neurones qui le composent peut être régulé, et comment est opérée la spécification du phénotype glutamatergique, et pour la majorité d'entre eux, celle de l'expression du récepteur Robo3 conditionnant leur devenir commissural.

Nous exposerons maintenant quelques pistes basées sur des données existantes de la littérature pour aborder ces questions. Nous n'avons pas de données préliminaires concernant ces scénarii spéculatifs.

1 - La coordination des schémas de régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale

Il apparaît qu'une des questions soulevées par l'organisation duelle du générateur central respiratoire est celle de comprendre les mécanismes susceptibles de produire ces entités discrètes. Comment sont spécifiées, limitées dans leur effectif, et spatialement confinées les lignées neuronales constitutives des oscillateurs ? Une partie de la réponse est à rechercher

dans les interactions entre les schémas de régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale. De nombreuses études ont rapporté l'importante variation des types neuronaux produits aux différents niveaux axiaux du tronc cérébral sur une base segmentaire.

Alors que certains domaines de progéniteurs, et en particulier au sein du rhombencéphale, sont spécifiques d'une position antéro-postérieure donnée (Sieber et al., 2007), ce n'est pas le cas du domaine p0, qui s'étend depuis les rhombomères les plus rostraux jusqu'au tube neural caudal (voir Pierani et al., 1999, 2001). Une information positionnelle perpendiculaire instruit vraisemblablement certains progéniteurs p0 du rhombencéphale caudal, et uniquement ceux-là, à acquérir des propriétés caractéristiques de l'oscillateur du *preBötC*. Un affinement des sous-types neuronaux par les gènes de régionalisation antéro-postérieure est par exemple bien illustré dans le cas des motoneurones spinaux. Ces derniers présentent, le long de l'axe antéro-postérieur, une grande variété de phénotypes, essentiellement caractérisés par leur connectivité vers une cible musculaire appropriée, en dépit de leur origine au sein d'un même domaine de progéniteurs (pMN). Leur spécialisation en des positions précises le long de l'axe antéro-postérieur est codée par un répertoire de gènes Hox (Dasen et al., 2003; Dasen et al., 2005; Dasen et al., 2008). Les protéines Hox étant également exprimées par les interneurons (Belting et al., 1998; Ensini et al., 1998), il est vraisemblable que ce code homéotique participe aussi à leur diversification le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural, et possiblement du rhombencéphale. Les travaux de Thoby-Brisson et al (2009) ont par exemple établi que l'oscillateur de l'e-pF dérive de progéniteurs dorsaux produits probablement au sein du rhombomère 5. Ces travaux caractérisent donc un programme génétique défini à la fois sur le plan dorso-ventral (dB2) et antéro-postérieur (vraisemblablement r5) qui aboutit à un petit effectif neuronal spécialisé et localisé en une position stratégique.

Un autre exemple bien documenté est celui des neurones sérotoninergiques. Un même domaine de progéniteur de l'axe dorso-ventral a été montré comme susceptible, en fonction du niveau axial (axe antéro-postérieur) considéré, de spécifier ou non ces neurones (Pattyn et al., 2003b). Au sein des rhombomères r2-r3 et r5-r7, le domaine le plus ventral de progéniteurs qui produit des motoneurones viscéraux (pvMN) change au cours du temps la combinaison de facteur de transcription qu'il exprime de $Nkx2.2^+/Nkx2.9^+/Phox2b^+$ pour $Nkx2.2^+/Nkx2.9^-/Phox2b^-$. Le maintien de l'expression de *Nkx2.2* et la perte d'expression de *Phox2b* sont nécessaires à une bascule entre une production de motoneurones viscéraux et celle de neurones sérotoninergiques. Au niveau discret de r4, ce basculement est rendu impossible par

l'expression spécifique en r4 de Hoxb1 qui maintient l'expression de Phox2b. Chez les mutants Hoxb1 nuls, des neurones sérotoninergiques sont produits de façon ectopique en lieu et place de motoneurones viscéraux au sein d'un rhombomère qui en est habituellement dépourvu. Sans rentrer ici dans les acteurs moléculaires opérant cette bascule («switch») binaire (Jacob et al., 2007), on entrevoit le type d'interaction moléculaire pouvant opérer pour spécifier dans d'autres rhombomères (vraisemblablement r5 en ce qui concerne l'oscillateur e-pF et r7 en ce qui concerne le preBötC) les interneurones dB2 et V0 qui les forment. A l'heure actuelle, des lignées de souris Cre chez lesquelles la recombinaison serait placée sous le contrôle de séquences de régulation permettant une expression restreinte axialement aux rhombomères d'intérêt (r5 et r7) ne sont pas disponibles à notre connaissance. Un enhancer du gène Krox20 contrôlant l'expression de Krox20 en r5 a été identifié chez le poisson zèbre et est en passe d'être caractérisé chez la souris (communication personnelle de P. Charnay). En ce qui concerne le preBötC, les données concernant des séquences régulatrices susceptibles de réguler l'expression des gènes dans les rhombomères les plus caudaux sont encore plus floues. Les seuls enhanceurs connus conditionnent la limite antérieure d'expression, à la frontière entre les rhombomères 6 et 7, des gènes paralogues Hoxa4, Hoxb4 et Hoxd4 (Gould et al., 1997; Morrison et al., 1997). Ainsi, il n'existe pas à l'heure actuelle d'outils simples pour commencer à disséquer axialement les mécanismes moléculaires influençant les domaines de progéniteurs. Ces questions restent néanmoins fondamentales pour comprendre l'émergence de modules fonctionnelles au sein du tronc cérébral et pourrait aussi expliquer par exemple l'absence du domaine dB2 dont sont issus les neurones de l'oscillateur parafacial au-delà du rhombomère r6, c'est-à-dire aux niveaux les plus caudaux du rhombencéphale dont est très probablement originaire le preBötC.

2 - Spécification du phénotype glutamatergique

L'excitabilité régule de nombreux aspects du développement neuronal en plus de constituer la base de la signalisation rapide dans le système nerveux central (Goodman and Shatz, 1993; Spitzer, 2006). La spécification des neurotransmetteurs est un aspect crucial du développement car elle détermine la polarité des synapses et la fonction des circuits neuronaux.

Plusieurs études de perte et de gain de fonction ont démontré l'implication de plusieurs facteurs de transcription dans la spécification des systèmes de neurotransmission classiques

par les acides aminés excitateurs et inhibiteurs. Lbx1 et Tlx3 agissent comme des contrôleurs des destins binaires GABAergiques et glutamatergiques. Lbx1, dans les neurones de la moelle épinière dorsale, détermine un état basal de spécification GABAergique que Tlx3 est susceptible d'antagoniser pour promouvoir une différenciation glutamatergique. Les neurones exprimant Lbx1 ont une origine au sein des domaines de progéniteurs plus dorsaux (domaines dB (Muller et al., 2005) que Dbx1 (domaine p0). De plus, l'expression de Tlx3 est aussi restreinte à ces domaines dorsaux (Cheng et al., 2004a; Cheng et al., 2005). Ainsi, ce type d'interaction moléculaire semble confiné à la partie dorsale du tube neural et n'est certainement pas effectif au niveau du preBötC. Dans la partie ventrale du tube neural, un travail récent a démontré que la balance de production d'interneurones V2 (domaine p2) de type a (V2a : type excitateur glutamatergique) et b (V2b : type inhibiteur Glycinergique et GABAergique) impliquait un mécanisme de régulation transcriptionnel particulier (Joshi et al., 2009). Dans ce cas, la protéine Lim-only LMO4 favorise la production de V2b à partir des interneurones V2 immatures par une interaction avec les complexes LIM. D'une part, LMO4 inhibe la formation des complexes LIM conduisant à la formation des V2a par compétition avec Lhx3 (gène Lim exprimé par les interneurones V2 immatures) et en parallèle forme un nouveau complexe avec les protéines SCL, Gata2 et NLI. Celui-ci est capable d'activer des enhancers spécifiquement présents sur les gènes exprimés par les interneurones V2b, en promouvant ainsi la production. Ici encore ce mécanisme ne peut pas s'appliquer au preBötC car les progéniteurs P0 ou les interneurones V0 n'expriment pas de gène LIM. Il semble pourtant bien qu'il existe une molécule particulière qui contrôle l'expression de Vglut2 au sein du lignage V0. Ceci dérive de nos expériences récentes ayant recours à une lignée transgénique dans laquelle le promoteur de Vglut2 contrôle l'expression de la chanelrhodopsin2 (ChR2) fusionnée à la protéine fluorescente jaune (Yellow Fluorescent Protein, lignée Vglut2::ChR2-YFP, Hagglund et al., 2010) permettant l'analyse du réseau respiratoire par des moyens optogénétiques. Dans cette lignée, il est frappant de constater que si toutes les populations neuronales notoirement glutamatergiques expriment bien la YFP, il existe une exception remarquable qui concerne toutes les cellules dérivées des progéniteurs Dbx1-positifs. Ainsi, chez des embryons doubles hétérozygotes *Dbx1^{Lacz/+}; Vglut2::ChR2-YFP*, les neurones V0 du preBötC (β -Gal⁺) n'expriment jamais la YFP. Nous interprétons cette observation comme indicative de l'omission, au sein du BAC utilisé pour construire cet allèle, d'une région régulatrice du promoteur Vglut2 contrôlant l'expression du transporteur au sein du lignage Dbx1. Cette région régulatrice n'est sans doute pas sous le contrôle direct de Dbx1 puisque ce

gène n'est exprimé qu'au sein des progéniteurs et que l'absence d'expression de la YFP est attestée dans la descendance cellulaire V0 au stade E15, soit bien après la fin de la période d'expression de Dbx1. Il faut alors envisager l'existence d'un facteur X, dont l'activation est dépendante de Dbx1 et qui persiste au sein des interneurons V0 pour y contrôler l'expression de Vglut2.

3 - Le contrôle d'un effectif neuronal

Enfin, en regard des points considérés précédemment, cette discussion ne peut faire l'économie de la considération des voies de signalisations Notch, un mode fondamental de signalisation entre cellules voisines (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Schweisguth, 2004). Cette voie Notch est fréquemment impliquée dans des choix de différenciations cellulaires *via* le processus d'inhibition latérale qui limite la propagation d'un type de différenciation, ou *via* l'induction latérale qui homogénéise les choix de destinées au sein d'une population. L'activation de la voie Notch résulte en l'activation de gènes qui répriment l'expression de facteurs proneuraux tels que Ngn2, contrôlant ainsi négativement la différenciation.

Dans un travail récent, le groupe du Dr. Johan Ericson vient de démontrer, dans le tube neural au niveau spinal, que les protéines à homéodomaine (protéines HD) Nkx6.1 et Dbx1 contrôlent l'expression spatiale des ligands de Notch Dll1 et Jag1 et des modulateurs négatifs de Notch, les protéines Fringe (Fng). Sont ainsi établis le long de l'axe dorso-ventral des domaines Dll1⁺/Fng⁺ et Jag1⁺/Fng⁻. Les auteurs démontrent que Fng augmente la signalisation Dll1/Notch mais réduit la signalisation Jag1/Notch. Ainsi l'activation de la voie Notch par Dll1 ou Jag1 opère à l'échelle du domaine de progéniteurs alors que la signalisation entre domaines adjacents le long de l'axe dorso-ventral est empêchée. Ainsi les domaines p0 et p1 maintiennent leur identité et gagnent en autonomie dans le contrôle de la neurogenèse s'opérant en leur sein. Ainsi, les interactions entre protéines HD telle que Dbx1 et les composants de la voie de signalisation Notch sont susceptibles de coordonner la spécification des neurones V0 et l'ajustement du nombre de neurones produits. On voit par là que l'effectif neuronal de l'oscillateur preBötC pourrait être contrôlé par ces interactions. Le mutant perte de fonction Dll1 présente une augmentation considérable de l'effectif neuronal V0 et V2 mais pas V1. Au contraire, le mutant perte de fonction Jag1 présente une augmentation considérable du nombre de neurones V1 alors que l'effectif des neurones V0 et V2 est inchangé. Ces signalisations protéines HD / Notch au niveau du rhombencéphale sont de plus, contrairement

à la moelle, présentes aux frontières entre les rhombomères (Cheng et al., 2004b). Ce type d'interaction pourrait donc participer à un contrôle différentiel de la prolifération des différents types d'interneurones issus des domaines de progéniteurs de l'axe dorso-ventral, en relation avec leur appartenance à un segment rhombomérique donné.

Les paragraphes ci-dessus indiquent que notre connaissance des interactions moléculaires au sein du tube neural embryonnaire aboutissant aux oscillateurs respiratoires est encore très limitée. Néanmoins cette thèse renforce les liens déjà existants entre les acteurs moléculaires de la régionalisation du tube neural et l'émergence de modules fonctionnels dans le système nerveux central. Nous pouvons pour la première fois proposer Dbx1 comme une signature transcriptionnelle des neurones rythmogènes de l'oscillateur principal de la respiration. Même s'il est évident que Dbx1 n'est qu'une composante d'une expression génétique combinatoire, les oscillateurs respiratoires constituent des modèles relativement simples pour tenter d'en disséquer les différents acteurs et pour en mesurer les implications fonctionnelles.

Références bibliographiques

- Abadie V, Champagnat J, Fortin G (2000) Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport* 11:141-145.
- Abbott SB, Stornetta RL, Fortuna MG, Depuy SD, West GH, Harris TE, Guyenet PG (2009) Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *J Neurosci* 29:5806-5819.
- Abu-Shaweesh JM, Martin RJ (2008) Neonatal apnea: what's new? *Pediatr Pulmonol* 43:937-944.
- Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S (2003) Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33:459-461.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME (1995) Notch signaling. *Science* 268:225-232.
- Auclair F, Valdes N, Marchand R (1996) Rhombomere-specific origin of branchial and visceral motoneurons of the facial nerve in the rat embryo. *J Comp Neurol* 369:451-461.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA (1995) Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J Physiol* 483 (Pt 3):641-663.
- Balkowiec A, Katz DM (1998) Brain-derived neurotrophic factor is required for normal development of the central respiratory rhythm in mice. *J Physiol* 510 (Pt 2):527-533.
- Balkowiec A, Katz DM (2000) Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci* 20:7417-7423.
- Balkowiec A, Katz DM (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:10399-10407.
- Barajon I, Gossard JP, Hultborn H (1992) Induction of fos expression by activity in the spinal rhythm generator for scratching. *Brain Res* 588:168-172.
- Belting HG, Shashikant CS, Ruddle FH (1998) Multiple phases of expression and regulation of mouse Hoxc8 during early embryogenesis. *J Exp Zool* 282:196-222.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Benarroch EE (2007) Brainstem respiratory control: substrates of respiratory failure of multiple system atrophy. *Mov Disord* 22:155-161.
- Bertrand F, Hugelin A (1971) Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J Neurophysiol* 34:189-207.
- Bianchi AL (1971) [Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation]. *J Physiol (Paris)* 63:5-40.

- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75:1-45.
- Bianchi AL, Grelot L, Iscoe S, Remmers JE (1988) Electrophysiological properties of rostral medullary respiratory neurones in the cat: an intracellular study. *J Physiol* 407:293-310.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919-2937.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002-1012.
- Blanchi B, Sieweke MH (2005) Mutations of brainstem transcription factors and central respiratory disorders. *Trends Mol Med* 11:23-30.
- Blanchi B, Kelly LM, Viemari JC, Lafon I, Burnet H, Bevingut M, Tillmanns S, Daniel L, Graf T, Hilaire G, Sieweke MH (2003) MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat Neurosci* 6:1091-1100.
- Borday C, Coutinho A, Germon I, Champagnat J, Fortin G (2006) Pre-/post-otic rhombomeric interactions control the emergence of a fetal-like respiratory rhythm in the mouse embryo. *J Neurobiol* 66:1285-1301.
- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429:523-530.
- Bosley TM, Salih MA, Jen JC, Lin DD, Oystreck D, Abu-Amero KK, MacDonald DB, al Zayed Z, al Dhalaan H, Kansu T, Stigsby B, Baloh RW (2005) Neurologic features of horizontal gaze palsy and progressive scoliosis with mutations in ROBO3. *Neurology* 64:1196-1203.
- Bouvier J, Autran S, Fortin G, Champagnat J, Thoby-Brisson M (2006) Acute role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the respiratory neural network activity in mice in vitro. *J Physiol Paris* 100:290-296.
- Bouvier J, Autran S, Dehorter N, Katz DM, Champagnat J, Fortin G, Thoby-Brisson M (2008) Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBotzinger complex in vitro. *Eur J Neurosci* 28:510-520.
- Branchereau P, Chapron J, Meyrand P (2002) Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* 22:2598-2606.
- Branchereau P, Morin D, Bonnot A, Ballion B, Chapron J, Viala D (2000) Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res Bull* 53:711-718.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435-445.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J (1999) Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398:622-627.

- Broch L, Morales RD, Sandoval AV, Hedrick MS (2002) Regulation of the respiratory central pattern generator by chloride-dependent inhibition during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J Exp Biol* 205:1161-1169.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96:795-806.
- Burrill JD, Moran L, Goulding MD, Saueressig H (1997) PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. *Development* 124:4493-4503.
- Butera RJ, Jr., Rinzel J, Smith JC (1999) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 82:398-415.
- Butt SJ, Kiehn O (2003) Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals. *Neuron* 38:953-963.
- Bystrzycka EK (1980) Afferent projections to the dorsal and ventral respiratory nuclei in the medulla oblongata of the cat studied by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res* 185:59-66.
- Caubit X, Thoby-Brisson M, Voituren N, Filippi P, Bevenuto M, Faralli H, Zanella S, Fortin G, Hilaire G, Fasano L Teashirt 3 regulates development of neurons involved in both respiratory rhythm and air-flow control. *J Neurosci* 30:9465-9476.
- Caubit X, Thoby-Brisson M, Voituren N, Filippi P, Bevenuto M, Faralli H, Zanella S, Fortin G, Hilaire G, Fasano L (2010) Teashirt 3 regulates development of neurons involved in both respiratory rhythm and airflow control. *J Neurosci* 30:9465-9476.
- Champagnat J, Fortin G (1997) Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *Trends Neurosci* 20:119-124.
- Chandler SH, Tal M (1986) The effects of brain stem transections on the neuronal networks responsible for rhythmical jaw muscle activity in the guinea pig. *J Neurosci* 6:1831-1842.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Chatonnet F, Dominguez del Toro E, Thoby-Brisson M, Champagnat J, Fortin G, Rijli FM, Thäron-Antono C (2003) From hindbrain segmentation to breathing after birth: developmental patterning in rhombomeres 3 and 4. *Mol Neurobiol* 28:277-294.
- Chatonnet F, Wrobel LJ, Mezieres V, Pasqualetti M, Ducret S, Taillebourg E, Charnay P, Rijli FM, Champagnat J (2007) Distinct roles of Hoxa2 and Krox20 in the development of rhythmic neural networks controlling inspiratory depth, respiratory frequency, and jaw opening. *Neural Develop* 2:19.
- Chen Z, Hedner J, Hedner T (1990a) Substance P in the ventrolateral medulla oblongata regulates ventilatory responses. *J Appl Physiol* 68:2631-2639.
- Chen Z, Gore BB, Long H, Ma L, Tessier-Lavigne M (2008) Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* 58:325-332.
- Chen ZB, Hedner J, Hedner T (1990b) Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *J Appl Physiol* 68:693-699.

- Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, Shirasawa S, Goulding M, Ma Q (2005) Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci* 8:1510-1515.
- Cheng L, Arata A, Mizuguchi R, Qian Y, Karunaratne A, Gray PA, Arata S, Shirasawa S, Bouchard M, Luo P, Chen CL, Busslinger M, Goulding M, Onimaru H, Ma Q (2004a) Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat Neurosci* 7:510-517.
- Cheng YC, Amoyel M, Qiu X, Jiang YJ, Xu Q, Wilkinson DG (2004b) Notch activation regulates the segregation and differentiation of rhombomere boundary cells in the zebrafish hindbrain. *Dev Cell* 6:539-550.
- Cherniack NS, von Euler C, Glogowska M, Homma I (1981) Characteristics and rate of occurrence of spontaneous and provoked augmented breaths. *Acta Physiol Scand* 111:349-360.
- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519.
- Cohen MI, Wang SC (1959) Respiratory neuronal activity in pons of cat. *J Neurophysiol* 22:33-50.
- Conlon RA, Rossant J (1992) Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* 116:357-368.
- Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett* 105:34-40.
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992) Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res* 590:337-340.
- Cordes SP, Barsh GS (1994) The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* 79:1025-1034.
- Coutinho AP, Borday C, Gilthorpe J, Jungbluth S, Champagnat J, Lumsden A, Fortin G (2004) Induction of a parafacial rhythm generator by rhombomere 3 in the chick embryo. *J Neurosci* 24:9383-9390.
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraiou L, Droho S, Restrepo CE, Lundfald L, Endo T, Setlak J, Jessell TM, Kiehn O, Sharma K (2008) Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron* 60:70-83.
- Dai X, Noga BR, Douglas JR, Jordan LM (2005) Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. *J Neurophysiol* 93:3442-3452.
- Dasen JS, Liu JP, Jessell TM (2003) Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* 425:926-933.
- Dasen JS, Tice BC, Brenner-Morton S, Jessell TM (2005) A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* 123:477-491.
- Dasen JS, De Camilli A, Wang B, Tucker PW, Jessell TM (2008) Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell* 134:304-316.
- Dauger S, Pattyn A, Lofaso F, Gaultier C, Goridis C, Gallego J, Brunet JF (2003) Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways. *Development* 130:6635-6642.

- Davies RO, Edwards MW, Jr. (1973) Distribution of carotid body chemoreceptor afferents in the medulla of the cat. *Brain Res* 64:451-454.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL (2002a) Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* 34:821-830.
- Del Negro CA, Koshiya N, Butera RJ, Jr., Smith JC (2002b) Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *J Neurophysiol* 88:2242-2250.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* 25:446-453.
- del Toro ED, Borday V, Davenne M, Neun R, Rijli FM, Champagnat J (2001) Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J Neurosci* 21:5637-5642.
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P (2008) NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586:1059-1075.
- Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitsch BG, Briscoe J, Sasai N (2010) Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol* 8:e1000382.
- Dickson BJ, Gilestro GF (2006) Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:651-675.
- Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347:64-86.
- Dubreuil V, Hirsch MR, Pattyn A, Brunet JF, Goridis C (2000) The *Phox2b* transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development* 127:5191-5201.
- Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2008a) A human mutation in *Phox2b* causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2008b) A human mutation in *Phox2b* causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1067-1072.
- Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Rallu M, Persson K, Pattyn A, Birchmeier C, Brunet JF, Fortin G, Goridis C (2009a) Defective Respiratory Rhythmogenesis and Loss of Central Chemosensitivity in *Phox2b* Mutants Targeting Retrotrapezoid Nucleus Neurons. *J Neurosci* 29:14836-14846.
- Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Rallu M, Persson K, Pattyn A, Birchmeier C, Brunet JF, Fortin G, Goridis C (2009b) Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in *Phox2b* mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J Neurosci* 29:14836-14846.
- Dutschmann M, Menuet C, Stettner GM, Gestreau C, Borghgraef P, Devijver H, Gielis L, Hilaire G, Van Leuven F (2010) Upper airway dysfunction of Tau-P301L mice correlates with tauopathy in mid-brain and ponto-medullary brainstem nuclei. *J Neurosci* 30:1810-1821.

- Dyck J, Gosgnach S (2009) Whole cell recordings from visualized neurons in the inner laminae of the functionally intact spinal cord. *J Neurophysiol* 102:590-597.
- Eckert DJ, Malhotra A, Jordan AS (2009) Mechanisms of apnea. *Prog Cardiovasc Dis* 51:313-323.
- Ensini M, Tsuchida TN, Belting HG, Jessell TM (1998) The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development* 125:969-982.
- Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM (1996) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 16:5361-5371.
- Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256:1555-1560.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* 90:169-180.
- Errchidi S, Monteau R, Hilaire G (1991) Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. *J Physiol* 443:477-498.
- Feldman JL, Gautier H (1976) Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J Neurophysiol* 39:31-44.
- Feldman, J. L. (1986). Neurophysiology of breathing in mammals. *Am.Physiol.Soc. Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory System in the Brain.* [sect.1, vol. IV, chapt. 9], 463-524. Washington, DC.
- Feldman JL, Smith JC (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 563:114-130.
- Flourens P (1851) Note sur le point vital de la moelle allongée. *Seances Soc Biol* 33:437-439.
- Flourens P (1858) Nouveaux détails sur le noeud vital. *C R Acad Sci, Paris* 47:803-806.
- Fortin G, Champagnat J, Lumsden A (1994a) Onset and maturation of branchio-motor activities in the chick hindbrain. *Neuroreport* 5:1149-1152.
- Fortin G, Foutz AS, Champagnat J (1994b) Respiratory rhythm generation in chick hindbrain: effects of MK-801 and vagotomy. *Neuroreport* 5:1137-1140.
- Fortin G, Jungbluth S, Lumsden A, Champagnat J (1999) Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat Neurosci* 2:873-877.
- Fortuna MG, Stornetta RL, West GH, Guyenet PG (2009) Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. *J Physiol* 587:5121-5138.
- Fukuda H, Koga T (1991) The Botzinger complex as the pattern generator for retching and vomiting in the dog. *Neurosci Res* 12:471-485.

- Fung ML, Wang W, St John WM (1994) Medullary loci critical for expression of gasping in adult rats. *J Physiol* 480 (Pt 3):597-611.
- Funk GD, Smith JC, Feldman JL (1993) Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: role of excitatory amino acids. *J Neurophysiol* 70:1497-1515.
- Galante RJ, Kubin L, Fishman AP, Pack AI (1996) Role of chloride-mediated inhibition in respiratory rhythmogenesis in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. *J Physiol* 492 (Pt 2):545-558.
- Garcia-Campmany L, Stam FJ, Goulding M (2010) From circuits to behaviour: motor networks in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 20:116-125.
- Garel S, Garcia-Dominguez M, Charnay P (2000) Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* 127:5297-5307.
- Gaultier C, Amiel J, Dager S, Trang H, Lyonnet S, Gallego J, Simonneau M (2004) Genetics and early disturbances of breathing control. *Pediatr Res* 55:729-733.
- Goodman CS, Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 Suppl:77-98.
- Goridis C, Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Fortin G, Brunet JF Phox2b, congenital central hypoventilation syndrome and the control of respiration. *Semin Cell Dev Biol*.
- Goridis C, Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Fortin G, Brunet JF (2010) Phox2b, congenital central hypoventilation syndrome and the control of respiration. *Semin Cell Dev Biol*.
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O, Goulding M (2006) V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440:215-219.
- Gould A, Morrison A, Sproat G, White RA, Krumlauf R (1997) Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* 11:900-913.
- Goulding M (2009) Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci* 10:507-518.
- Goulding M, Pfaff SL (2005) Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 15:14-20.
- Goulding M, Lanuza G, Sapir T, Narayan S (2002) The formation of sensorimotor circuits. *Curr Opin Neurobiol* 12:508-515.
- Grass D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S (2004) Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci* 24:1358-1365.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* 286:1566-1568.
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4:927-930.

- Griveau A, Borello U, Causeret F, Tissir F, Boggetto N, Karaz S, Pierani A (2010) A novel role for Dbx1-derived cajal-retzius cells in early regionalization of the cerebral cortical neuroepithelium. *PLoS Biol* 8:e1000440.
- Guo H, Hellard DT, Huang L, Katz DM (2005) Development of pontine noradrenergic A5 neurons requires brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 21:2019-2023.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7:335-346.
- Guyenet PG (2008) The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO₂ homeostasis, and breathing automaticity. *J Appl Physiol* 105:404-416. Epub 2008 Jun 2005.
- Guyenet PG, Wang H (2001) Pre-Botzinger neurons with preinspiratory discharges "in vivo" express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol* 86:438-446.
- Guyenet PG, Mulkey DK (2010) Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir Physiol Neurobiol*.
- Guyenet PG, Sevigny CP, Weston MC, Stornetta RL (2002a) Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci* 22:3806-3816.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Schreihofer AM, Pelaez NM, Hayar A, Aicher S, Llewellyn-Smith IJ (2002b) Opioid signalling in the rat rostral ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:238-242.
- Hagglund M, Borgius L, Dougherty KJ, Kiehn O (2010) Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat Neurosci* 13:246-253.
- Haller S, Wetzel SG, Lutschg J (2008) Functional MRI, DTI and neurophysiology in horizontal gaze palsy with progressive scoliosis. *Neuroradiology* 50:453-459.
- Hayes JA, Del Negro CA (2007) Neurokinin receptor-expressing pre-botzinger complex neurons in neonatal mice studied in vitro. *J Neurophysiol* 97:4215-4224.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293:540-580.
- Higashijima S, Masino MA, Mandel G, Fetcho JR (2004) Engrailed-1 expression marks a primitive class of inhibitory spinal interneuron. *J Neurosci* 24:5827-5839.
- Hilaire G, Monteau R, Errchidi S (1989) Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res* 485:325-332.
- Howitt JA, Clout NJ, Hohenester E (2004) Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *Embo J* 23:4406-4412.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Hulsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW (2000) Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci* 12:856-862.

- Hunt CE, Brouillette RT (1987) Sudden infant death syndrome: 1987 perspective. *J Pediatr* 110:669-678.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk GD (2009) Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. *J Neurosci* 29:14713-14725.
- Ireland MF, Lenal FC, Lorier AR, Loomes DE, Adachi T, Alvares TS, Greer JJ, Funk GD (2008) Distinct receptors underlie glutamatergic signalling in inspiratory rhythm-generating networks and motor output pathways in neonatal rat. *J Physiol* 586:2357-2370.
- Jacob J, Ferri AL, Milton C, Prin F, Pla P, Lin W, Gavalas A, Ang SL, Briscoe J (2007) Transcriptional repression coordinates the temporal switch from motor to serotonergic neurogenesis. *Nat Neurosci* 10:1433-1439.
- Jacquin TD, Borday V, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Ghilini G, Kato F, Charnay P, Champagnat J (1996) Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox-20* knockout mice. *Neuron* 17:747-758.
- Janczewski WA, Feldman JL (2006) Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". *J Neurophysiol* 96:1-2.
- Jean A (2001) Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 81:929-969.
- Jen JC, Chan WM, Bosley TM, Wan J, Carr JR, Rub U, Shattuck D, Salamon G, Kudo LC, Ou J, Lin DD, Salih MA, Kansu T, Al Dhalaan H, Al Zayed Z, MacDonald DB, Stigsby B, Plaitakis A, Dretakis EK, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Wang Q, Wang L, Andrews C, Yamada K, Demer JL, Karim S, Alger JR, Geschwind DH, Deller T, Sicotte NL, Nelson SF, Baloh RW, Engle EC (2004) Mutations in a human *ROBO* gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304:1509-1513.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Johnson SM, Koshiya N, Smith JC (2001) Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island". *J Neurophysiol* 85:1772-1776.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72:2598-2608.
- Jordan D, Spyer KM (1977) Studies on the termination of sinus nerve afferents. *Pflugers Arch* 369:65-73.
- Joshi K, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2009) LMO4 controls the balance between excitatory and inhibitory spinal V2 interneurons. *Neuron* 61:839-851.
- Kalia M, Mesulam MM (1980a) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol* 193:435-465.
- Kalia M, Mesulam MM (1980b) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol* 193:467-508.

- Keller C, Hansen MS, Coffin CM, Capecchi MR (2004a) Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes Dev* 18:2608-2613.
- Keller C, Arenkiel BR, Coffin CM, El-Bardeesy N, DePinho RA, Capecchi MR (2004b) Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. *Genes Dev* 18:2614-2626.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
- Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306.
- Kiehn O, Kullander K (2004) Central pattern generators deciphered by molecular genetics. *Neuron* 41:317-321.
- Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE (2009) The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* 4:517-550.
- Kobayashi K, Lemke RP, Greer JJ (2001) Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. *J Appl Physiol* 91:316-320.
- Koizumi H, Wilson CG, Wong S, Yamanishi T, Koshiya N, Smith JC (2008) Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated in vitro. *J Neurosci* 28:2353-2365.
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400:360-363.
- Krause KL, Forster HV, Kiner T, Davis SE, Bonis JM, Qian B, Pan LG (2009) Normal breathing pattern and arterial blood gases in awake and sleeping goats after near total destruction of the presumed pre-Botzinger complex and the surrounding region. *J Appl Physiol* 106:605-619.
- Kullmann DM, Asztely F (1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci* 21:8-14.
- Kutejova E, Briscoe J, Kicheva A (2009) Temporal dynamics of patterning by morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* 19:315-322.
- Kuwana S, Tsunekawa N, Yanagawa Y, Okada Y, Kuribayashi J, Obata K (2006) Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Botzinger complex. *Eur J Neurosci* 23:667-674.
- Lanuza GM, Gosgnach S, Pierani A, Jessell TM, Goulding M (2004) Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42:375-386.

- Lavezzi AM, Matturri L (2008) Functional neuroanatomy of the human pre-Botzinger complex with particular reference to sudden unexplained perinatal and infant death. *Neuropathology* 28:10-16.
- Leung RS (2009) Sleep-disordered breathing: autonomic mechanisms and arrhythmias. *Prog Cardiovasc Dis* 51:324-338.
- Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317.
- Li Z, Morris KF, Baekey DM, Shannon R, Lindsey BG (1999) Responses of simultaneously recorded respiratory-related medullary neurons to stimulation of multiple sensory modalities. *J Neurophysiol* 82:176-187.
- Liem KF, Jr., Tremml G, Jessell TM (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91:127-138.
- Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969-979.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nat Neurosci* 3:600-607.
- Lipski J, McAllen RM, Spyer KM (1977) The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarius. *J Physiol* 269:797-810.
- Liu YY, Wong-Riley MT, Liu JP, Jia Y, Liu HL, Jiao XY, Ju G (2002) GABAergic and glycinergic synapses onto neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Botzinger complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur J Neurosci* 16:1058-1066.
- Liu YY, Wong-Riley MT, Liu JP, Jia Y, Liu HL, Fujiyama F, Ju G (2003a) Relationship between two types of vesicular glutamate transporters and neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Botzinger complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur J Neurosci* 17:41-48.
- Liu Z, Bunney EB, Appel SB, Brodie MS (2003b) Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *J Neurophysiol* 90:3201-3212.
- Liu Z, Patel K, Schmidt H, Andrews W, Pini A, Sundaresan V (2004) Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci* 26:232-240.
- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213-223.
- Lumsden A, Keynes R (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337:424-428.
- Lumsden A, Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Lumsden T (1923a) Observations on the respiratory centres in the cat. *J Physiol* 57:153-160.
- Lumsden T (1923b) Observations on the respiratory centres. *J Physiol* 57:354-367.

- Lundin LG (1993) Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* 16:1-19.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3:843-853.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.
- Manzke T, Preusse S, Hulsmann S, Richter DW (2008) Developmental changes of serotonin 4(a) receptor expression in the rat pre-Botzinger complex. *J Comp Neurol* 506:775-790.
- Marder E, Calabrese RL (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76:687-717.
- Marillat V, Sabatier C, Failli V, Matsunaga E, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2004) The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* 43:69-79.
- McCormick DA, Bal T (1997) Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185-215.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons. *Nat Neurosci* 8:1142-1144.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37:821-826.
- Miller JP, Selverston AI (1982) Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. II. Oscillatory properties of pyloric neurons. *J Neurophysiol* 48:1378-1391.
- Moran-Rivard L, Kagawa T, Saueressig H, Gross MK, Burrill J, Goulding M (2001) *Evx1* is a postmitotic determinant of *v0* interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* 29:385-399.
- Morgado-Valle C, Baca SM, Feldman JL (2010) Glycinergic pacemaker neurons in preBotzinger complex of neonatal mouse. *J Neurosci* 30:3634-3639.
- Morrison A, Ariza-McNaughton L, Gould A, Featherstone M, Krumlauf R (1997) *HOXD4* and regulation of the group 4 paralog genes. *Development* 124:3135-3146.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7:1360-1369.
- Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2007) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci* 27:14049-14058.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
- Muller T, Anlag K, Wildner H, Britsch S, Treier M, Birchmeier C (2005) The bHLH factor *Olig3* coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord. *Genes Dev* 19:733-743.

- Nakamura Y, Katakura N, Nakajima M (1999) Generation of rhythmical ingestive activities of the trigeminal, facial, and hypoglossal motoneurons in in vitro CNS preparations isolated from rats and mice. *J Med Dent Sci* 46:63-73.
- Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 347:249-274.
- Nattie E (2009) Sudden infant death syndrome and serotonin: animal models. *Bioessays* 31:130-133.
- Nattie EE, Li A (2002) Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. *J Physiol* 544:603-616.
- Nogues MA, Benarroch E (2008) Abnormalities of respiratory control and the respiratory motor unit. *Neurologist* 14:273-288.
- Nonchev S, Vesque C, Maconochie M, Seitanidou T, Ariza-McNaughton L, Frain M, Marshall H, Sham MH, Krumlauf R, Charnay P (1996) Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development* 122:543-554.
- Norgren R (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3:207-218.
- O'Donovan MJ (1999) The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:94-104.
- Ogier M, Katz DM (2008) Breathing dysfunction in Rett syndrome: understanding epigenetic regulation of the respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol* 164:55-63.
- Onimaru H, Homma I (1987) Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res* 403:380-384.
- Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23:1478-1486.
- Onimaru H, Homma I (2005) Developmental changes in the spatio-temporal pattern of respiratory neuron activity in the medulla of late fetal rat. *Neuroscience* 131:969-977.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1987) Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. *Neurosci Lett* 78:151-155.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1989) Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. *Exp Brain Res* 76:530-536.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1990) Inhibitory synaptic inputs to the respiratory rhythm generator in the medulla isolated from newborn rats. *Pflugers Arch* 417:425-432.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1995) Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Exp Brain Res* 106:57-68.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2008) CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci* 28:12845-12850.
- Orem J, Trotter RH (1993) Medullary respiratory neuronal activity during augmented breaths in intact unanesthetized cats. *J Appl Physiol* 74:761-769.

- Otake K, Sasaki H, Mannen H, Ezure K (1987) Morphology of expiratory neurons of the Botzinger complex: an HRP study in the cat. *J Comp Neurol* 258:565-579.
- Otake K, Sasaki H, Ezure K, Manabe M (1989) Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. *J Comp Neurol* 286:218-230.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-6423.
- Pagliardini S, Ren J, Greer JJ (2003) Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. *J Neurosci* 23:9575-9584.
- Pagliardini S, Adachi T, Ren J, Funk GD, Greer JJ (2005) Fluorescent tagging of rhythmically active respiratory neurons within the pre-Botzinger complex of rat medullary slice preparations. *J Neurosci* 25:2591-2596.
- Pagliardini S, Ren J, Gray PA, Vandunk C, Gross M, Goulding M, Greer JJ (2008) Central respiratory rhythmogenesis is abnormal in *lhx1*-deficient mice. *J Neurosci* 28:11030-11041.
- Pape HC, McCormick DA (1989) Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340:715-718.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
- Paton JF (1996a) The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J Physiol* 493 (Pt 3):819-831.
- Paton JF (1996b) A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* 65:63-68.
- Patten I, Placzek M (2000) The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* 57:1695-1708.
- Pattyn A, Hirsch M, Goridis C, Brunet JF (2000) Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene *Phox2b*. *Development* 127:1349-1358.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes *Phox2a* and *Phox2b* during neurogenesis. *Development* 124:4065-4075.
- Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Sander M, Ericson J (2003a) Complementary roles for *Nkx6* and *Nkx2* class proteins in the establishment of motoneuron identity in the hindbrain. *Development* 130:4149-4159.
- Pattyn A, Simplicio N, van Doorninck JH, Goridis C, Guillemot F, Brunet JF (2004) *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 7:589-595.
- Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Samad OA, Krumlauf R, Rijli FM, Brunet JF, Ericson J (2003b) Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev* 17:729-737.

- Peever JH, Tian GF, Duffin J (1998) Bilaterally independent respiratory rhythms in the decerebrate rat. *Neurosci Lett* 247:41-44.
- Pena F, Ramirez JM (2004) Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J Neurosci* 24:7549-7556.
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell TM (1999) A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97:903-915.
- Pierani A, Moran-Rivard L, Sunshine MJ, Littman DR, Goulding M, Jessell TM (2001) Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* 29:367-384.
- Ptak K, Hunt SP, Monteau R (2000) Substance P and central respiratory activity: a comparative in vitro study in NK1 receptor knockout and wild-type mice. *Pflugers Arch* 440:446-451.
- Ptak K, Burnet H, Blanchi B, Sieweke M, De Felipe C, Hunt SP, Monteau R, Hilaire G (2002) The murine neurokinin NK1 receptor gene contributes to the adult hypoxic facilitation of ventilation. *Eur J Neurosci* 16:2245-2252.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW (1996) Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J Physiol* 491 (Pt 3):799-812.
- Ramirez JM, Schwarzacher SW, Pierrefiche O, Olivera BM, Richter DW (1998) Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J Physiol* 507 (Pt 3):895-907.
- Rekling JC, Feldman JL (1998) PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* 60:385-405.
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubie M (1996a) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) depolarizes a subset of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* 75:811-819.
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubie M (1996b) Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* 75:795-810.
- Ren J, Greer JJ (2006) Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J Neurosci* 26:3721-3730.
- Renier N, Schonewille M, Giraudet F, Badura A, Tessier-Lavigne M, Avan P, De Zeeuw CI, Chedotal A (2010) Genetic dissection of the function of hindbrain axonal commissures. *PLoS Biol* 8:e1000325.
- Ribes V, Balaskas N, Sasai N, Cruz C, Dessaud E, Cayuso J, Tozer S, Yang LL, Novitsch B, Marti E, Briscoe J (2010) Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev* 24:1186-1200.
- Richter DW (1982) Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J Exp Biol* 100:93-107.
- Richter DW, Ballantyne D, Remmers JE (1987) The differential organization of medullary post-inspiratory activities. *Pflugers Arch* 410:420-427.

- Ritter B, Zhang W (2000) Early postnatal maturation of GABAA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur J Neurosci* 12:2975-2984.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- Rohrbough J, Spitzer NC (1996) Regulation of intracellular Cl⁻ levels by Na⁽⁺⁾-dependent Cl⁻ cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABAA receptor-mediated responses in spinal neurons. *J Neurosci* 16:82-91.
- Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A (2004) From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays* 26:1185-1194.
- Rose MF, Ren J, Ahmad KA, Chao HT, Klisch TJ, Flora A, Greer JJ, Zoghbi HY (2009) Math1 is essential for the development of hindbrain neurons critical for perinatal breathing. *Neuron* 64:341-354.
- Ross CA, Ruggiero DA, Reis DJ (1985) Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 242:511-534.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S (1990) slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4:2169-2187.
- Ruangkittisakul A, Okada Y, Oku Y, Koshiya N, Ballanyi K (2009) Fluorescence imaging of active respiratory networks. *Respir Physiol Neurobiol*.
- Rusakov DA, Kullmann DM (1998) Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci* 18:3158-3170.
- Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M (2004) The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117:157-169.
- Sapir T, Geiman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshihara Y, Frank E, Alvarez FJ, Goulding M (2004) Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of renshaw cell development. *J Neurosci* 24:1255-1264.
- Sato M, Severinghaus JW, Basbaum AI (1992) Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. *J Appl Physiol* 73:96-100.
- Scain AL, Le Corrionc H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* 30:390-403.
- Scain AL, Le Corrionc H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P (2010) Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* 30:390-403.
- Schneider-Maunoury S, Seitanidou T, Charnay P, Lumsden A (1997) Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* 124:1215-1226.

- Schneider-Maunoury S, Topilko P, Seitandou T, Levi G, Cohen-Tannoudji M, Pournin S, Babinet C, Charnay P (1993) Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75:1199-1214.
- Schweisguth F (2004) Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol* 14:R129-138.
- Schweitzer P, Madamba SG, Siggins GR (2003) The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:10884-10891.
- Scott MP (1992) Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71:551-553.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409-426.
- Selverston AI, Miller JP (1980) Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. I. Pyloric system. *J Neurophysiol* 44:1102-1121.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Sham MH, Vesque C, Nonchev S, Marshall H, Frain M, Gupta RD, Whiting J, Wilkinson D, Charnay P, Krumlauf R (1993) The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* 72:183-196.
- Sieber MA, Storm R, Martinez-de-la-Torre M, Muller T, Wende H, Reuter K, Vasyutina E, Birchmeier C (2007) Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci* 27:4902-4909.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707-712.
- Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN (2004) Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci* 27:415-421.
- Stella G (1938) On the mechanism of production, and the physiological significance of "apneusis". *J Physiol* 93:10-23.
- Stil A, Liabeuf S, Jean-Xavier C, Brocard C, Viemari JC, Vinay L (2009) Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 164:809-821.
- Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG (2003a) Inspiratory augmenting bulbospinal neurons express both glutamatergic and enkephalinergic phenotypes. *J Comp Neurol* 455:113-124.
- Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG (2003b) A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex. *J Comp Neurol* 455:499-512.
- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG (2006) Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci* 26:10305-10314.

- Suzue T (1994) Mouse fetuses in late gestation maintained in vitro by a transplacental perfusion method and their physiological activities. *Neurosci Res* 21:173-176.
- Swiatek PJ, Gridley T (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev* 7:2071-2084.
- Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G (1999) Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol* 216:282-296.
- Takahashi M, Osumi N (2002) *Pax6* regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129:1327-1338.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572:503-523.
- Takeda S, Eriksson LI, Yamamoto Y, Joensen H, Onimaru H, Lindahl SG (2001) Opioid action on respiratory neuron activity of the isolated respiratory network in newborn rats. *Anesthesiology* 95:740-749.
- Tan EM, Yamaguchi Y, Horwitz GD, Gosgnach S, Lein ES, Goulding M, Albright TD, Callaway EM (2006) Selective and quickly reversible inactivation of mammalian neurons in vivo using the *Drosophila* allatostatin receptor. *Neuron* 51:157-170.
- Tan W, Pagliardini S, Yang P, Janczewski WA, Feldman JL (2009) Projections of preBotzinger Complex neurons in adult rats. *J Comp Neurol* 518:1862-1878.
- Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci* 11:538-540.
- Tanabe Y, William C, Jessell TM (1998) Specification of motor neuron identity by the *MNR2* homeo-domain protein. *Cell* 95:67-80.
- Tarras-Wahlberg S, Rekling JC (2009) Hypoglossal motoneurons in newborn mice receive respiratory drive from both sides of the medulla. *Neuroscience*.
- Teissier A, Griveau A, Vigier L, Piolot T, Borello U, Pierani A (2010) A novel transient glutamatergic population migrating from the pallial-subpallial boundary contributes to neocortical development. *J Neurosci* 30:10563-10574.
- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A *Phaseolus vulgaris* lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31:785-797.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2000) Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *J Neurosci* 20:5858-5866.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol* 86:104-112.
- Thoby-Brisson M, Autran S, Fortin G, Champagnat J (2004) BDNF preferentially targets membrane properties of rhythmically active neurons in the pre-Botzinger complex in neonatal mice. *Adv Exp Med Biol* 551:115-120.

- Thoby-Brisson M, Trinh JB, Champagnat J, Fortin G (2005) Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J Neurosci* 25:4307-4318.
- Thoby-Brisson M, Cauli B, Champagnat J, Fortin G, Katz DM (2003) Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *J Neurosci* 23:7685-7689.
- Thoby-Brisson M, Karlen M, Wu N, Charnay P, Champagnat J, Fortin G (2009) Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex. *Nat Neurosci* 12:1028-1035.
- Tian GF, Duffin J (1996) Spinal connections of ventral-group bulbospinal inspiratory neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Exp Brain Res* 111:178-186.
- Tian GF, Duffin J (1997) Synchronization of ventral-group, bulbospinal inspiratory neurons in the decerebrate rat. *Exp Brain Res* 117:479-487.
- Tiveron MC, Pattyn A, Hirsch MR, Brunet JF (2003) Role of *Phox2b* and *Mash1* in the generation of the vestibular efferent nucleus. *Dev Biol* 260:46-57.
- Tresch MC, Kiehn O (2000) Motor coordination without action potentials in the mammalian spinal cord. *Nat Neurosci* 3:593-599.
- Vasilakos K, Wilson RJ, Kimura N, Remmers JE (2005) Ancient gill and lung oscillators may generate the respiratory rhythm of frogs and rats. *J Neurobiol* 62:369-385.
- Viemari JC, Burnet H, Bevingut M, Hilaire G (2003) Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur J Neurosci* 17:1233-1244.
- Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Pena F, Zanella S, Bevingut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L, Hilaire G (2005) *Mecp2* deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* 25:11521-11530.
- von Euler C, Marttila I, Remmers JE, Trippenbach T (1976) Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta Physiol Scand* 96:324-337.
- Von Euler US, Pernow B (1956) Neurotropic effects of substance P. *Acta Physiol Scand* 36:265-275.
- Wallen-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, Nygard A, Enjin A, Fujiyama F, Fortin G, Kullander K (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J Neurosci* 26:12294-12307.
- Wallen P, Grillner S (1987) N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J Neurosci* 7:2745-2755.
- Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG (2001) Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J Comp Neurol* 434:128-146.
- Wang W, Fung ML, Darnall RA, St John WM (1996) Characterizations and comparisons of eupnoea and gasping in neonatal rats. *J Physiol* 490 (Pt 1):277-292.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Marazita ML (2005) In pursuit (and discovery) of a genetic basis for congenital central hypoventilation syndrome. *Respir Physiol Neurobiol*.

- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Rand CM (2008) Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and sudden infant death syndrome (SIDS): kindred disorders of autonomic regulation. *Respir Physiol Neurobiol* 164:38-48.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah T, Davis S, Forster HV (2004a) Small reduction of neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the pre-Botzinger complex area induces abnormal breathing periods in awake goats. *J Appl Physiol* 97:1620-1628.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S, Forster HV (2004b) Large lesions in the pre-Botzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol* 97:1629-1636.
- Westberg KG, Scott G, Olsson KA, Lund JP (2001) Discharge patterns of neurons in the medial pontobulbar reticular formation during fictive mastication in the rabbit. *Eur J Neurosci* 14:1709-1718.
- Wilkinson DG, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, Charnay P (1989) Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337:461-464.
- Wilson RJ, Vasilakos K, Remmers JE (2006) Phylogeny of vertebrate respiratory rhythm generators: the Oscillator Homology Hypothesis. *Respir Physiol Neurobiol* 154:47-60.
- Winter SM, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Hulsmann S (2007) Transgenic expression of fluorescent proteins in respiratory neurons. *Respir Physiol Neurobiol* 159:108-114.
- Winter SM, Fresemann J, Schnell C, Oku Y, Hirrlinger J, Hulsmann S (2009) Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Arch*.
- Wrobel LJ, Ogier M, Chatonnet F, Autran S, Mezieres V, Thoby-Brisson M, McLean H, Taeron C, Champagnat J (2007) Abnormal inspiratory depth in *Phox2a* haploinsufficient mice. *Neuroscience* 145:384-392.
- Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM (1991) Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64:635-647.
- Yuan SS, Cox LA, Dasika GK, Lee EY (1999) Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. *Dev Biol* 207:62-75.
- Zagoraïou L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB (2009) A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* 64:645-662.
- Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1207-1214.
- Zhang Y, Narayan S, Geiman E, Lanuza GM, Velasquez T, Shanks B, Akay T, Dyck J, Pearson K, Gosgnach S, Fan CM, Goulding M (2008) V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron* 60:84-96.
- Zheng Y, Riche D, Rekling JC, Foutz AS, Denavit-Saubie M (1998) Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res* 782:113-125.
- Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363-375.

Annexe I

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Physiology - Paris 100 (2006) 290–296

 Journal of
Physiology
 Paris

www.elsevier.com/locate/jphysparis

Acute role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the respiratory neural network activity in mice in vitro

Julien Bouvier, Sandra Autran, Gilles Fortin, Jean Champagnat, Muriel Thoby-Brisson *

Laboratoire de Neurobiologie Génétique et Intégrative Institut Alfred Fessard, CNRS UPR2216, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France

Abstract

In humans, several pathologies are associated with disturbances of the respiratory control, some of them including alteration in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signalling pathway. BDNF has long been known as a neurotrophic factor involved in survival, differentiation and maintenance of neuronal populations in the peripheral and central nervous system. More recently BDNF has also been discovered to be a potent neuromodulator with acute effects on neuronal excitability and synaptic plasticity. Animals deleted for the gene encoding BDNF exhibit respiratory alteration suggesting an important but yet undefined role of the neurotrophin in respiratory rhythmogenesis either by a trophic and/or an acute action. The possibility that BDNF might exert an acute regulatory role on the rhythmic activity of the respiratory generator of the pre-Bötzinger complex has been recently examined in newborn mice in vitro. Results obtained, reviewed in the present paper, will help getting insights in respiratory rhythm regulatory mechanisms that involve BDNF signalling.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Respiratory rhythm; Pre-Bötzinger complex (preBötC); Rhythmic respiratory neurons; Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

1. Introduction

Several pathologies, such as the Rett syndrome, the sudden infant death syndrome and the congenital central hypoventilation syndrome, are associated with respiratory deficiencies (for review see Gaultier et al., 2004). Data suggesting a genetic origin have been recently obtained (Amir et al., 1999; Chen et al., 2001; Amiel et al., 2003; Gaultier et al., 2004; Weaving et al., 2005; Bienvenu and Chelly, 2006). Alterations in neurotrophic signalling have been suspected in several of those syndromes, with an important contribution of the dysfunction of the Brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) signalling pathway (Weese-Mayer et al., 2002; Chen et al., 2003; Martinowich et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Chiaretti et al., 2005). Clinical

observations therefore suggest a link between BDNF and respiratory control, a link that physiologists start to elucidate.

Generation of the respiratory rhythm requires the neural generator of the pre-Bötzinger complex (preBötC; Gray et al., 1999; McKay et al., 2005). This network is located in the reticular formation of the ventrolateral medulla in the hindbrain and contains all the elements necessary for inspiratory activity generation (Smith et al., 1991; Lieske et al., 2000; Feldman and Del Negro, 2006). It is composed of interconnected glutamatergic rhythmic neurons, some of them expressing pacemaker properties (Johnson et al., 1994; Koshiya and Smith, 1999; Thoby-Brisson et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2001; Pena et al., 2004). This network being localized in a restricted area in the hindbrain is amenable for in vitro examination after its isolation in reduced preparations (Suzue, 1984; Smith et al., 1991).

Neurotrophins are a family of structurally related proteins that play a major role in regulating the survival, differentiation and maintenance of function of different

* Corresponding author. Tel.: +33(1) 01 69 82 34 33; fax: +33(1) 01 69 82 41 78.

E-mail address: muriel.thoby-brisson@inaf.cnrs-gif.fr (M. Thoby-Brisson).

populations of peripheral and central neurons. Among these trophic factors, the brain-derived neurotrophic factor has drawn considerable interest because in addition to its classical long lasting neurotrophic effects, which are evident within hours or days and which usually result from changes in gene expression, BDNF has been shown to also exert acute effects visible after minutes (for review see Huang and Reichardt, 2001; Kovalchuk et al., 2004). These acute actions have been demonstrated both on synaptic transmission possibly involved in the induction of long-term potentiation (Lu, 2003) and on membrane conductances influencing neuronal excitability (Desai et al., 1999; Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002). Both trophic and rapid effects of BDNF are mediated following TrkB-mediated activation of intracellular second messenger cascades and protein phosphorylation (Patapoutian and Reichardt, 2001; Huang and Reichardt, 2003).

Mice carrying a targeted deletion in the gene encoding BDNF exhibit abnormal breathing pattern with both peripheral and central deficits (Conover et al., 1995; Erickson et al., 1996; Balkowiec and Katz, 1998). Whether these defects reflect the lack of trophic and/or acute actions of BDNF on the respiratory neural network remains undefined. In order to get insights on a regulatory role that BDNF might exert on the preBötC network we sought for a possible acute action of BDNF on respiratory rhythmogenesis *in vitro*. In the present paper we propose to review data obtained in mice.

2. BDNF gene deletion leads to abnormal ventilation and death *in vivo*

The contribution of BDNF in the proper development and maintenance of adapted respiration has been demonstrated after examination of ventilatory behaviour of mice deleted for its encoding gene. Mutant mice exhibit severe respiratory disturbances (Erickson et al., 1996) and die by three weeks of age (Ernfors et al., 1994; Jones et al., 1994; Conover et al., 1995; Liu et al., 1995). Plethysmographic recordings of ventilation in BDNF-deficient animals revealed a reduced respiratory frequency, an abnormally small tidal volume and an increased number of apneas leading to depressed and irregular ventilation at rest (Erickson et al., 1996). This permanent hypoventilation probably contributes to the lethality occurring shortly after birth. Moreover *bdnf*^{-/-} animals exhibit a reduced chemosensory drive. While responses to hypercapnia are intact, ventilatory responses to hyperoxia and hypoxia are depressed in the mutant mice resulting in an inability to adapt to environmental changes (Erickson et al., 1996). This phenotype is due to alterations in both peripheral and central respiration-related structures. The peripheral chemoafferent pathway is affected in *bdnf*-deficient mice. Indeed BDNF has been shown to be required for survival of chemoafferent sensory neurons in the petrosal and nodose ganglia that innervate the chemoreceptors in the carotid body that in turns gives chemosensory inputs on

central respiratory circuits in the hindbrain (Conover et al., 1995; Erickson et al., 1996; Katz, 2003, 2005). In addition, a central origin of respiratory deficits observed in *bdnf*^{-/-} mice has been demonstrated *in vitro* with electrophysiological recordings of spontaneous rhythmic activity present on cervical ventral roots in isolated brainstem preparations obtained from *bdnf*^{-/-} animals (Balkowiec and Katz, 1998). Deletion of the gene encoding BDNF results in a significant reduction of the central respiratory frequency and an increase in the respiratory cycle variability, mimicking the abnormalities in ventilation observed *in vivo*. Moreover, it remains also possible that respiratory deficits resulting from the BDNF gene mutation might reveal defects in neuromodulatory structures present in the pons that are known to play an important role in the development and the regulation of the respiratory generator activity (Viemari et al., 2004; Hilaire et al., 2004; St John and Paton, 2004). For example, it has been recently shown that deficiencies in noradrenergic and serotonergic modulation of the respiratory network could result in dramatic breathing disturbances (Burnet et al., 2001; Viemari et al., 2005). Altogether these results argue in favour of a crucial role for BDNF in the development of normal breathing behaviour and survival after birth, with a possible contribution of both long-term and acute effects of the neurotrophin on respiration-related structures both at the peripheral and central levels.

3. BDNF modulates respiratory rhythmic activity *in vitro*

Central deficits of respiratory activity observed in *bdnf*^{-/-} mice might result from a deficiency in the trophic support during development or/and a lack of an acute action of the neurotrophin on respiratory central circuits after birth. Such a rapid role of BDNF on neuronal activity, already observed in different neuronal types in the central nervous system (Kovalchuk et al., 2004), was so far undescribed on respiratory neurons. To address this issue we sought for rapid (minutes) modifications of respiratory rhythm induced in the presence of the neurotrophin. Respiratory rhythm was recorded *in vitro* in transverse brainstem slices, a reduced preparation obtained from newborn mice (P0-P4) and that contains the preBötC neural network. Extracellular recordings of the respiratory activity were performed using a macroelectrode positioned at the surface of the slice preparations on top of the preBötC area (Smith et al., 1991; Lieske et al., 2000). Exogenous application of BDNF (100 ng/ml during 30 min) induced a significant decrease in respiratory frequency from 12.6 ± 0.6 burst/min in control conditions to 9.6 ± 0.6 burst/min in the presence of BDNF (Thoby-Brisson et al., 2003, 2004). This effect, observed in all the preparations tested ($n = 12$), was only partially reversible, probably due to the fact that BDNF activates complex cascades of intracellular events (Huang and Reichardt, 2003). The specificity of the BDNF action was tested by (1) applying other neurotrophins and (2) inactivating the BDNF high-affinity binding site. (1)

Application of the Nerve Growth Factor (100 ng/ml, 30 min), that presents a high degree of sequence homology with BDNF but binds to a distinct tyrosine-kinase receptor, the tyrosine kinase A receptor (TrkA), had no significant effect on the respiratory frequency recorded *in vitro*. Similarly, application of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), another trophic factor known to be required for normal ventilation and respiratory control (Erickson et al., 2001; Huang et al., 2005) induced no detectable changes in respiratory frequency (Thoby-Brisson, unpublished data). (2) Pre-incubation with the TrkB inhibitor K252a (200 nM during 1 h) prevented the reduction of the respiratory rhythm frequency normally induced by BDNF application, indicating that BDNF-mediated effects require activation of a tyrosine kinase activity. These data demonstrated for the first time a modulatory action of the BDNF on the activity of the respiratory neural network of the preBötC, probably involving the activation of TrkB receptors.

4. Cellular basis for BDNF modulation of respiratory rhythm

Respiratory rhythmogenesis results from the interplay between cellular membrane properties of individual neurons and synaptic interactions between respiratory neurons. Therefore modulation of the respiratory rhythm can occur at either or both sites. The reduction of the respiratory frequency observed in the presence of BDNF could reflect a general decrease in the excitability of neurons constituting the rhythm generator. However patch clamp recordings of individual respiratory neurons failed to reveal any significant modification in the resting membrane potential values for respiratory neurons after BDNF exposure or changes in the frequency of action potential generation during each burst of activity (Thoby-Brisson et al., 2003 and unpublished data). We therefore sought for other targets for BDNF in the properties of the neuronal elements of the preBötC network.

4.1. BDNF modulates the hyperpolarization-activated current in respiratory neurons

Intrinsic membrane properties specifying the respiratory neuronal phenotype remain largely unknown and the combinatorial organization of distinct membrane conductances characterizing a respiratory neuron is still under scrutiny. Among the few conductances examined, the hyperpolarization-activated current (I_h) has been shown to be expressed by a significant proportion of respiratory neurons, including those exhibiting pacemaker properties, and to play an important role in modulating respiratory frequency in newborn mice (Mironov et al., 2000; Thoby-Brisson et al., 2000). We therefore hypothesized that BDNF might modulate the respiratory frequency in part via a regulation of the I_h current. Using patch clamp recordings of functionally identified respiratory neurons, the I_h current was evoked by a series of hyperpolarizing voltage steps. Several

properties of the conductance were changed after exposure to the neurotrophin. First, the presence of BDNF induced a significant decrease in the I_h current amplitude for the entire voltage range at which I_h was evoked (from -70 to -120 mV). Second, the I_h activation curve was shifted toward more hyperpolarized voltage values with a voltage value at which the I_h first activates shifted by 20 mV (from $-60/-70$ to around $-80/-90$ mV range) and a mean voltage for half-activation hyperpolarized by 17 mV (from -93 to -110 mV). Taken together these data indicate that the I_h current might contribute to a less extent to respiratory rhythmogenesis in the presence of BDNF because the neurotrophin displaces the I_h current activation threshold at more hyperpolarized membrane potential values. These experiments were the first to identify the I_h current as a target for BDNF. Associating a reduction of the I_h current with a reduction of the frequency of a rhythmic activity is in contrast to what has been proposed for the role of the I_h current in the respiratory rhythmogenesis (Thoby-Brisson et al., 2000; but see discussion in Thoby-Brisson et al., 2003), but is consistent with the role known for the I_h current in other neural network that is to recover from hyperpolarization (McCormick and Pape, 1990). Thus diminishing the I_h current leads to a longer period necessary for the neuron to depolarize and therefore to a decrease in the frequency, as observed in other parts of the CNS (Bal and McCormick, 1997; Luthi and McCormick, 1998; Fortin et al., 1999).

4.2. BDNF enhances glutamatergic synaptic strength between respiratory neurons

Generation of the respiratory rhythm mainly relies on excitatory glutamatergic connections (Funk et al., 1993), the contribution of chloride-mediated inhibitory connections being insignificant in newborn mice (Feldman and Smith, 1989; Ritter and Zhang, 2000). In order to test whether BDNF modulates glutamatergic currents within the respiratory neural network we examined BDNF-induced changes of spontaneous glutamatergic excitatory synaptic drives underlying each rhythmic burst discharge in inspiratory neurons and of glutamate-evoked synaptic currents in individual preBötC neurons. The amplitude and duration of synaptic currents underlying burst discharges were significantly increased in the presence of the neurotrophin, by 65% and 35%, respectively. This result does not allow discriminating between a pre- or a post-synaptic action of BDNF and rather informs on a network response. When glutamate was locally applied onto individual neurons with puff applications the amplitude of the evoked excitatory current was also significantly increased by $\sim 30\%$ in the presence of BDNF. This set of data indicates that BDNF acts at least at the post-synaptic site, although a pre-synaptic action remains possible. Altogether our experiments showed that BDNF enhances the strength of excitatory glutamatergic currents in preBötC neurons. Reinforcing the intra-network coupling certainly

participates in inducing the overall reduction of respiratory rhythm frequency. Indeed previous work performed on mathematical models of the respiratory network and on *in vitro* experiments revealed that synaptic strength and respiratory frequency are inversely related, and that the mean burst duration increases with the coupling (Johnson et al., 1994; Butera et al., 1999; Del Negro et al., 2001). A possible explanation for this counterintuitive finding is that when synaptic coupling is enhanced, depolarizing conductances involved in burst generation will have to be more strongly inactivated in order to terminate a burst. This will prolong the time necessary for the depolarizing currents to re-activate and therefore will increase the duration of the period between two consecutive bursts. This will then lead to a decrease in the frequency of synchronous bursting within the respiratory network. Our data demonstrating an action of BDNF on glutamatergic coupling are consistent with numerous studies performed on other systems in which BDNF has been shown to modulate synapses either at the pre- or the post-synaptic site and to actively participate to synaptic plasticity processes (Thoenen, 2000; Huang and Reichardt, 2001; McAllister et al., 1999; Lu, 2003).

5. Molecular basis for BDNF action on respiratory neurons

5.1. Expression of *TrkB* in the *preBötC* network

The main binding site for BDNF has been identified as the tyrosine-kinase receptor *TrkB* (Huang and Reichardt, 2003). Two forms of the *TrkB* receptor exist, the full-length, active 145kDa protein and a truncated, non-signaling 95kDa protein (Klein et al., 1990; Rose et al., 2003). The truncated isoform lacks the cytoplasmic tyrosine kinase catalytic region and therefore does not signal in response to BDNF, but might have other important functions (Fryer et al., 1997; Rose et al., 2004). Involvement of the *TrkB* receptors in the action of BDNF on respiratory rhythm was initially suggested by experiments with pharmacological treatments. We completed these data with a more specific examination of the expression of *TrkB* receptor in the respiratory neural network with immunostaining and single cell RT-PCR experiments.

On transverse brainstem slices immunoreactivity for the full-length *TrkB* receptors was present at the level of the hypoglossal nucleus, the ambiguous nucleus and in the *preBötC* region (Thoby-Brisson et al., 2003; Borday et al., 2004). This region can be anatomically identified by a high degree of expression for the substance P neurokinin 1 receptor *NK1R* (Gray et al., 1999). Neuronal populations expressing *NK1R* and *TrkB* largely overlapped, indicating that the distribution of *TrkB* expression indeed includes the *preBötC*. Second we performed single cell RT-PCR experiments in which expression of mRNA encoding *TrkB* was sought in functionally identified respiratory neurons. Consistent with a direct action of BDNF on respiratory neurons we found that half of the tested respiratory cells

expressed *TrkB* mRNA. The lower affinity BDNF receptor *p75* was also found in the *preBötC* but only in 25% of the respiratory neurons. In keeping with the electrophysiological results identifying the I_h current as a target for BDNF, 100% of the *preBötC* neurons expressing *TrkB* mRNA also expressed the mRNA for at least one of the 4 sub-units constituting the I_h channel. Moreover, in accordance with our immunostaining data, RT-PCR experiments performed on individual neurons revealed that one third of the *TrkB* expressing neurons co-expressed *NK1R* mRNA. This is an important finding because *NK1R* expressing neurons have been shown to be required for normal breathing (Gray et al., 2001; McKay et al., 2005) and might constitute one of the targets at which BDNF acts to modulate respiratory rhythm *in vitro*.

5.2. Expression of BDNF in *preBötC* neurons

Interestingly we also observed that the neurotrophin itself was expressed by a significant number of respiratory neurons. Single cell RT-PCR experiments revealed that almost one third of respiratory neurons examined expressed BDNF mRNA, supporting the hypothesis that respiratory neurons might themselves be a source of BDNF, other sources being so far not clearly identified. This observation is important because the release of BDNF has been shown to be activity-dependent (Lindholm et al., 1994; Marini et al., 1998; Balkowiec and Katz, 2000, 2002), with high-frequency stimulation being more effective at releasing large amounts of BDNF. Respiratory neurons are known to discharge intensely during each respiratory cycle, with a possible modulation of this discharge in response to changes of environmental conditions (for example see Thoby-Brisson and Ramirez, 2000). *In vitro* it appears that, in the context of a rapid action, BDNF is not spontaneously released because blockade of tyrosine-kinase activities induced no significant changes in respiratory frequency (Thoby-Brisson et al., 2003). It is however conceivable that conditions in which the excitability of respiratory neurons is increased might lead to a higher neuronal discharge, then possibly triggering release of BDNF by respiratory neurons. Furthermore, nothing is known so far on the possible spontaneous release of BDNF by respiratory neurons *in vivo*. Further experiments examining conditions in which BDNF could be released in the respiratory neurons are needed.

6. BDNF does not affect properties of non-rhythmic neurons in the *preBötC* network

The *preBötC* contains not only respiratory rhythmically active neurons, but also non-rhythmic cells whose specific role remains unknown (Elsen and Ramirez, 1998, 2005; Thoby-Brisson et al., 2004). The non-rhythmic cells that co-localized with the respiratory rhythmic neurons displayed a tonic discharge pattern unrelated to the rhythmic population activity recorded from the entire *preBötC*

network. In order to test the specificity of BDNF modulation on rhythmic cells we examined whether or not the neurotrophin regulates membrane properties of non-rhythmic cells. Patch-clamp recordings were obtained for neurons located at least three cell layers caudal from the surface of the slice, thus avoiding cells likely damaged during the slicing procedure. None of the membrane properties (resting membrane potential, $I-V$ curve and I_h current) of the non-rhythmic neurons were affected in the presence of BDNF.

However single cell RT-PCR experiments revealed that one third of the non-rhythmic neurons tested expressed the mRNA for TrkB receptors and one fourth expressed BDNF mRNA. These results indicate that TrkB expression does not constitute a specific marker for respiratory rhythmic neurons. Moreover, basic membrane properties being unaffected in the presence of BDNF one possible explanation would be that non-rhythmically active neurons might express the truncated TrkB receptors devoid of the tyrosine kinase activity. In addition, expression of the truncated isoform of TrkB receptor might inhibit in the non-rhythmic neurons the activation of tyrosine kinases by forming non-productive heterodimers (Eide et al., 1996). On the other hand, the presence of truncated receptors might participate in restricting BDNF action to the preBötC region by limiting the diffusion of the neurotrophin to other sites. Interestingly, we also observed that none of the non-rhythmic neurons tested expressed p75 receptor. It is known that expression of p75 enhances the specificity of TrkB for its primary ligand BDNF (Bibel et al., 1999). We therefore hypothesized that BDNF links to non-rhythmic neurons with a lower affinity, rendering BDNF action on rhythmic neurons more specific.

7. BDNF and embryonic respiratory rhythmic activity

In rodents respiratory-like movements are detectable before birth (Suzue and Shinoda, 1999; Kobayashi et al., 2001; Viemari et al., 2003), suggesting that the respiratory neural network is active at prenatal stages. Indeed, it has recently been shown that the respiratory activity emerges in the preBötC during embryonic development at embryonic day (E) 15 in mice (Thoby-Brisson et al., 2005) and the corresponding stage E17 in rats (Pagliardini et al., 2003). At the time of its onset the respiratory generator expresses several properties described after birth. The embryonic respiratory generator (1) is composed of two bilaterally distributed and interconnected glutamatergic networks, (2) contains neurons expressing the I_h current and some exhibiting pacemaker properties, (3) expresses the Neurokinin 1 receptor, (4) is sensitive to neuromodulators known to influence respiration such as Substance P and opioid agonists. Interestingly at the same period of embryonic development BDNF and its receptor start to be expressed in respiration-related structures (Brady et al., 1999; Erickson et al., 2001; Ip et al., 2001) and can be released by brainstem structures in an activity-depen-

dent manner (Ba et al., 2005). The respiratory phenotype observed in animals deleted for BDNF (see Section 2) might reflect the lack of modulatory action of BDNF on the embryonic respiratory network in addition to the absence of trophic action of the neurotrophin.

In preliminary experiments we decided to test whether the neurotrophin already exerts a modulatory action on the respiratory rhythm at embryonic stages. Exogenous application of BDNF on in vitro preparations obtained from E16 embryos revealed that the embryonic respiratory neural network is sensitive to the neurotrophin. However, in contrast to what has been described at post-natal stages, in the embryo application of BDNF induces an increase in respiratory frequency (Bouvier, unpublished data). Additional experiments are required to define the network properties targeted by the neurotrophin in the mouse embryo. Understanding the bases of the switch in BDNF effects might help to unravel important maturation steps necessary for the respiratory neural network to develop properly.

8. Conclusions

The data presented here provide the first demonstration that BDNF is able to acutely modulate respiratory frequency by a regulation of both intrinsic membrane properties and synaptic coupling connecting neurons constitutive of the preBötC respiratory network in mice in vitro. The identification of the preBötC, the respiratory rhythm generator, as a new target for BDNF is an important contribution towards a better understanding of how neurotrophic factors can regulate the functional maturation and maintenance of brainstem neurons and circuits that control breathing. This is especially relevant in the contexts of unravelling mechanisms underlying pathologies and of adapting therapeutic approaches to treat respiratory anomalies observed in several syndromes in humans.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Fondation pour la Recherche Médicale. We would like to thank Dr David Katz who initiated and participated to this work, and Arthur Foutz for carefully reading the manuscript.

References

- Amiel, J., Laudier, B., Attie-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Ray, P., Simmoneau, M., Vekemans, M., Munnich, A., Gaultier, C., Lyonnet, S., 2003. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat. Genet.* 33, 459–461.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked

- MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.
- Ba, F., Ren, J., Greer, J.J., 2005. Brain-derived neurotrophic factor release with neuronal activity in fetal rats. *Neuroreport* 16, 141–143.
- Bal, T., McCormick, D.M., 1997. Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I(h). *J. Neurophysiol.* 77, 3145–3156.
- Balkowiec, A., Katz, D.M., 1998. Brain-derived neurotrophic factor is required for normal development of the central respiratory rhythm in mice. *J. Physiol.* 510, 527–533.
- Balkowiec, A., Katz, D.M., 2000. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J. Neurosci.* 20, 7417–7423.
- Balkowiec, A., Katz, D.M., 2002. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 10399–10407.
- Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y.A., 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors TrkB and p75NTR. *EMBO J.* 18, 616–622.
- Bivenu, T., Chelly, J., 2006. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat. Rev. Genet.* 7, 415–426.
- Blum, R., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2002. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419, 687–693.
- Borday, C., Wrobel, L., Fortin, G., Champagnat, J., Thaëron-Antônio, C., Thoby-Brisson, M., 2004. Developmental gene control of brainstem function: views from the embryo. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 84, 89–106.
- Brady, R., Zaidi, S.I., Mayer, C., Katz, D.M., 1999. BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 19, 2131–2142.
- Burnet, H., Bevengut, M., Chakri, F., Bou-Flores, C., Coulon, P., Gaytan, S., Pasaro, R., Hilaire, G., 2001. Altered respiratory activity and respiratory regulations in adult monoamine oxidase A-deficient mice. *J. Neurosci.* 21, 5212–5221.
- Butera Jr., R.J., Rinzel, J., Smith, J.C., 1999. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. II. Populations of coupled pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 82, 398–415.
- Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., Jaenisch, R., 2001. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* 27, 327–331.
- Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E., 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885–889.
- Chiaretti, A., Zorzi, G., Di Rocco, C., Genovese, O., Antonelli, A., Piastra, M., Polidori, G., Aloe, L., 2005. Neurotrophic factor expression in three infants with Ondine's course. *Pediatr. Neurol.* 33, 331–336.
- Conover, J.C., Erickson, J.T., Katz, D.M., Bianchi, L.M., Poueymirou, W.T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N.Y., Boland, P., et al., 1995. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* 375, 235–238.
- Del Negro, C.A., Johnson, S.M., Butera, R.J., Smith, J.C., 2001. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *J. Neurophysiol.* 86, 59–74.
- Desai, N.S., Rutherford, L.C., Turrigiano, G.G., 1999. BDNF regulates the intrinsic excitability of cortical neurons. *Learn. Mem.* 6, 284–291.
- Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wand, X.Y., Reichardt, L.F., 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibiting effects on brain-derived neurotrophic factor signalling. *J. Neurosci.* 16, 3123–3129.
- Elsen, F.P., Ramirez, J.M., 1998. Calcium currents of rhythmic neurons recorded in the isolated respiratory network of neonatal mice. *J. Neurosci.* 18, 10652–10662.
- Elsen, F.P., Ramirez, J.M., 2005. Postnatal development differentially affects voltage-activated calcium currents in respiratory rhythmic versus nonrhythmic neurons of the pre-Bötzinger complex. *J. Neurophysiol.* 94, 1423–1431.
- Erickson, J.T., Conover, J.C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G., Katz, D.M., 1996. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 band display a severe developmental deficit in control of breathing. *J. Neurosci.* 16, 5361–5371.
- Erickson, J.T., Brosenitsch, T.A., Katz, D.M., 2001. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J. Neurosci.* 21, 581–589.
- Ernfors, P., Lee, K.F., Jaenisch, R., 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 370, 147–150.
- Feldman, J.L., Smith, J.C., 1989. Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann. NY Acad. Sci.* 563, 114–130.
- Feldman, J.L., Del Negro, C.A., 2006. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 232–242.
- Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A., Champagnat, J., 1999. Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hind-brain neural networks. *Nat. Neurosci.* 2, 873–877.
- Fryer, R.H., Kaplan, D.R., Kromer, L.F., 1997. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 148, 616–627.
- Funk, G.D., Smith, J.C., Feldman, J.L., 1993. Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: role of excitatory amino acids. *J. Neurophysiol.* 70, 1497–1515.
- Gaultier, C., Amiel, J., Dager, S., Trang, H., Lyonnet, S., Gallego, J., Simmoneau, M., 2004. Genetics and early disturbances of breathing control. *Pediatr. Res.* 55, 729–733.
- Gray, P.A., Reikling, J.C., Bocchiaro, C.M., Feldman, J.L., 1999. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the pre-Bötzinger complex. *Science* 286, 1566–1568.
- Gray, P.A., Janczewski, W.A., Mellen, N., McCrimmon, D.R., Feldman, J.L., 2001. Normal breathing requires pre-Bötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 927–930.
- Hilaire, G., Viemari, J.C., Coulon, P., Simmoneau, M., Bévençut, M., 2004. Modulation of the medullary respiratory rhythm generator by pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodent. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 143, 187–197.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: role in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.
- Huang, L., Guo, H., Hellard, D.T., Katz, D.M., 2005. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is required for differentiation of pontine noradrenergic neurons and patterning of central respiratory output. *Neuroscience* 130, 95–105.
- Ip, F.C.F., Cheung, J., Ip, N.Y., 2001. The expression profiles of neurotrophins and their receptors in rat and chicken tissues during development. *Neurosci. Lett.* 301, 107–110.
- Johnson, S.M., Smith, J.C., Funk, G.D., Feldman, J.L., 1994. Pacemaker behaviour of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 72, 2598–2608.
- Jones, K.R., Farinas, I., Backus, C., Reichardt, L.F., 1994. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 76, 989–999.
- Kafitz, K.W., Rose, C.R., Thoenen, H., Konnerth, A., 1999. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401, 918–921.
- Katz, D.M., 2003. Neuronal growth factors and development of respiratory control. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 135, 155–165.
- Katz, D.M., 2005. Regulation of respiratory neuron development by neurotrophic and transcriptional signalling mechanisms. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 149, 99–109.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L.F., Barbacid, M., 1990. The TrkB tyrosine kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647–656.

- Kobayashi, K., Lemke, R.P., Greer, J.J., 2001. Ultrasound measurements of the fetal breathing movements in the rat. *J. Appl. Physiol.* 91, 316–320.
- Koshiya, N., Smith, J.C., 1999. Neuronal pacemaker for breathing in vitro. *Nature* 400, 360–363.
- Kovalchuk, Y., Holthoff, K., Konnerth, A., 2004. Neurotrophin action on a rapid timescale. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 558–563.
- Lindholm, D., Castren, E., Berzaghi, M., Blochl, A., Thoenen, H., 1994. Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain – implications for neuronal plasticity. *J. Neurobiol.* 25, 1362–1372.
- Lieske, S.P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M., 2000. Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat. Neurosci.* 3, 600–607.
- Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., Jaenisch, R., 1995. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375, 238–241.
- Lu, B., 2003. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 10, 86–98.
- Luthi, A., McCormick, D.M., 1998. Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of Ih. *J. Neurophysiol.* 79, 3284–3289.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C., 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318.
- McCormick, D.A., Pape, H.C., 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431, 291–318.
- McKay, L.C., Janczewski, W.A., Feldman, J.L., 2005. Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBöttinger complex neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 1142–1144.
- Marini, A.M., Rabin, S.J., Lipsky, R.H., Mochetti, I., 1998. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-Methyl-D-aspartate. *J. Biol. Chem.* 273, 29394–29399.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890–893.
- Mironov, S.L., Langohr, K., Richter, D.W., 2000. Hyperpolarization-activated current, Ih in inspiratory brainstem neurons and its inhibition by hypoxia. *Eur. J. Neurosci.* 12, 520–526.
- Pagliardini, S., Ren, J., Greer, J.J., 2003. Ontogeny of the pre-Böttinger complex in perinatal rats. *J. Neurosci.* 23, 9575–9584.
- Patapoutian, A., Reichardt, L.F., 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280.
- Pena, F., Parkis, M.A., Tryba, A.K., Ramirez, J.M., 2004. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43, 105–117.
- Ritter, B., Zhang, W., 2000. Early postnatal maturation of GABA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2975–2984.
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74–78.
- Rose, C.R., Blum, R., Kafitz, K.W., Kovalchuk, Y., Konnerth, A., 2004. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays* 26, 1185–1194.
- Sasaki, A., Kanai, M., Kijima, K., Akaba, K., Hashimoto, M., Hasegawa, H., Otaki, S., Koisumi, T., Kusada, S., Ogawa, Y., Tuchiya, K., Yamamoto, Nakamura, T., Hayasaka, K., 2003. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum. Genet.* 114, 22–26.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., Feldman, J.L., 1991. Pre-Böttinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726–729.
- St John, W.M., Paton, J.F., 2004. Role of pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 143, 321–332.
- Suzue, T., 1984. Mouse fetuses in late gestation maintained in vitro by a transplacental perfusion method and their physiological activities. *Neurosci. Res.* 21, 173–176.
- Suzue, T., Shinoda, Y., 1999. Highly reproducible spatiotemporal patterns of mammalian embryonic movements at the developmental stage of the earliest spontaneous motility. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2697–2710.
- Thoby-Brisson, M., Ramirez, J.M., 2000. Role of inspiratory neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *J. Neurosci.* 20, 5858–5866.
- Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M., 2000. The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network in mice. *J. Neurosci.* 20, 2994–3005.
- Thoby-Brisson, M., Ramirez, J.M., 2001. Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J. Neurophysiol.* 86, 104–112.
- Thoby-Brisson, M., Cauli, B., Champagnat, J., Fortin, G., Katz, D.M., 2003. Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Böttinger complex of neonatal mice. *J. Neurosci.* 23, 7685–7689.
- Thoby-Brisson, M., Autran, S., Fortin, G., Champagnat, J., 2004. BDNF preferentially targets membrane properties of rhythmically active neurons in the pre-Böttinger complex in neonatal mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 551, 115–120.
- Thoby-Brisson, M., Trinh, J.B., Champagnat, J., Fortin, G., 2005. Emergence of the pre-Böttinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J. Neurosci.* 25, 4307–4318.
- Thoenen, H., 2000. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog. Brain. Res.* 128, 183–191.
- Viemari, J.C., Beventut, M., Coulon, P., Hilaire, G., 2003. Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. *J. Neurophysiol.* 91, 746–758.
- Viemari, J.C., Béventut, M., Burnet, H., Coulon, P., Pequignot, J.M., Tiveron, M.C., Hilaire, G., 2004. Phox2A gene, A6 neurons and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J. Neurosci.* 24, 928–937.
- Viemari, J.C., Roux, J.C., Tryba, A.K., Saywell, V., Burnet, H., Pena, F., Zanella, S., Beventut, M., Barthelemy-Requin, M., Herzing, L.B.K., Moncla, A., Mancini, J., Ramirez, J.M., Villard, C., Hilaire, G., 2005. MeCP2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J. Neurosci.* 25, 11521–11530.
- Weaving, L.S., Ellaway, C.J., Gecz, J., Christodoulou, J., 2005. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J. Med. Genet.* 42, 1–7.
- Weese-Mayer, D.E., Bolk, S., Silvestri, J.M., Chakravarti, A., 2002. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: evaluation of brain-derived neurotrophic factor genomic DNA sequence variation. *Am. J. Med. Genet.* 107, 306–310.

Annexe II



Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex *in vitro*

Julien Bouvier,¹ Sandra Autran,¹ Nathalie Dehorter,^{1,*} David M. Katz,² Jean Champagnat,¹ Gilles Fortin¹ and Muriel Thoby-Brisson¹

¹Laboratoire de Neurobiologie Génétique et Intégrative (NGI), Institut Alfred Fessard, Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif sur Yvette, France

²Department of Neurosciences, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

Keywords: embryo, endogenous burster neuron, mouse, respiratory neurons, rhythm

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required during the prenatal period for normal development of the respiratory central command; however, the underlying mechanisms remain unknown. To approach this issue, the present study examined BDNF regulation of fetal respiratory rhythm generation in the preBötzing complex (preBötC) of the mouse, using transverse brainstem slices obtained from prenatal day 16.5 animals. BDNF application (100 ng/mL, 15 min) increased the frequency of rhythmic population activity in the preBötC by 43%. This effect was not observed when preparations were exposed to nerve growth factor (100 ng/mL, 30 min) or pretreated with the tyrosine kinase inhibitor K252a (1 h, 200 nM), suggesting that BDNF regulation of preBötC activity requires activation of its cognate tyrosine receptor kinase, TrkB. Consistent with this finding, single-cell reverse transcription-polymerase chain reaction experiments showed that one third of the rhythmically active preBötC neurons analysed expressed TrkB mRNA. Moreover, 20% expressed BDNF mRNA, suggesting that the preBötC is both a target and a source of BDNF. At the network level, BDNF augmented activity of preBötC glutamatergic neurons and potentiated glutamatergic synaptic drives in respiratory neurons by 34%. At the cellular level, BDNF increased the activity frequency of endogenously bursting neurons by 53.3% but had no effect on basal membrane properties of respiratory follower neurons, including the Ih current. Our data indicate that BDNF signalling through TrkB can acutely modulate fetal respiratory rhythm in association with increased glutamatergic drive and bursting activity in the preBötC.

Introduction

Neurotrophins regulate nervous system development by controlling the survival and differentiation of specific populations of peripheral and central neurons, particularly in the embryo, fetus and neonate. In addition, some neurotrophins play acute roles in regulating neuronal function throughout life. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is of particular interest in this regard because it is expressed by many neurons, its synthesis and release are activity dependent (Balkowiec & Katz, 2000, 2002; Lou *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006) and it can act on a short time scale to regulate neuronal function (Kovalchuk *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2004; Blum & Konnerth, 2005). For example, BDNF has been shown to regulate neuronal membrane properties and to play important roles in coupling presynaptic neuronal activity to postsynaptic changes in synaptic strength and efficacy (Li *et al.*, 1998; Kafitz *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2004; Blum & Konnerth, 2005; Henneberger *et al.*, 2005). However, relatively little is known about the role of BDNF in the development of complex neural network function.

Previous studies demonstrated that BDNF is required for functional maturation of central respiratory drive (Erickson *et al.*, 1996;

Balkowiec & Katz, 1998). One component of the brainstem respiratory network that is known to be a target of BDNF signalling after birth is the preBötzing complex (preBötC; Thoby-Brisson *et al.*, 2003). The preBötC is required for pacing inspiratory activity (Smith *et al.*, 1991; Feldman & Del Negro, 2006) and is anatomically defined as a group of type 2 vesicular glutamate transporter (VGLUT2)-positive interneurons also expressing high levels of neurokinin receptor (NK1R) and somatostatin (Stornetta *et al.*, 2003). Within the preBötC, inspiratory rhythm and pattern generation rely on recurrent glutamate synaptic excitation within the network in combination with activation of intrinsic bursting properties of individual cells (Koshiya & Smith, 1999; Thoby-Brisson *et al.*, 2000; Thoby-Brisson & Ramirez, 2001; Pena *et al.*, 2004). Endogenous bursting neurons, constituting a subset of inspiratory neurons, are capable of generating ectopic bursts of activity between two inspiratory bursts occurring in phase with the population activity (Feldman & Del Negro, 2006) and remain rhythmically active after blockade of excitatory glutamatergic synchronization (Koshiya & Smith, 1999; Thoby-Brisson *et al.*, 2005; Wallen-Mackenzie *et al.*, 2006). Moreover, some respiratory bursting neurons express the Ih current, a conductance known to play an important role in respiratory rhythm modulation (Thoby-Brisson *et al.*, 2000).

Deletion of the BDNF gene leads to disturbances of respiratory rhythmogenesis in newborn mice (Erickson *et al.*, 1996; Balkowiec & Katz, 1998). These findings indicate that BDNF is required before birth for proper development of neuronal circuits controlling breath-

Correspondence: Dr M. Thoby-Brisson, as above.
E-mail: muriel.thoby-brisson@inaf.cnrs-gif.fr

*Present address: Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U29, 13273 Marseille cedex 09, France.

Received 5 December 2007, revised 28 May 2008, accepted 2 June 2008

ing, possibly by regulating maturation during fetal development. However, prenatal targets of BDNF signalling in the respiratory network are unknown. The present study was therefore undertaken to test the hypothesis that the preBötC respiratory network is a target of BDNF signalling before birth. In particular, we examined the possibility that BDNF and TrkB play a role in regulating respiratory neuron function during fetal breathing at prenatal day 16.5 in the mouse (Thoby-Brisson *et al.*, 2005), with specific attention towards effects on glutamatergic intra-network communication, endogenous bursting properties and membrane conductances such as the Ih current, all key elements for the respiratory rhythm and pattern generation, some of them being in addition already described as targets for BDNF at postnatal stages (Thoby-Brisson *et al.*, 2003, 2004).

Materials and methods

Experiments were performed in keeping with European and French agricultural ministry guidelines for the care and use of laboratory animals (Council directives 2889 and 86/609/EEC).

In-vitro fetal slice preparation

Brainstem transverse slices were obtained from embryos at embryonic day (E)16.5, E0.5 being the morning after detection of the vaginal plug. Pregnant OF1 mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were killed by cervical dislocation and embryos were excised from the uterus and kept at room temperature (24°C) in artificial cerebrospinal fluid bubbled with carbogen (95% O₂/5% CO₂). The artificial

cerebrospinal fluid contained (in mM): 120 NaCl, 8 KCl, 1.26 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 21 NaHCO₃, 0.58 Na₂HPO₄, 30 glucose, pH 7.4. Fetal brainstem transverse slices were obtained using the technique previously described by Thoby-Brisson *et al.* (2005). In brief, the brainstem was isolated from the embryo, embedded in an agar block, mounted onto a vibratome and serially sliced in the transverse plane from rostral to caudal until the posterior limit of the facial nucleus was reached. At 200 µm more caudal from this limit we isolated a 450-µm-thick slice known to contain rhythmically active respiratory neurons of the preBötC at its rostral surface. Slices were then transferred in the recording chamber, continuously perfused with oxygenated artificial cerebrospinal fluid and maintained at 30°C.

Recordings

Population activity recordings were obtained with a glass pipette used as a suction electrode positioned onto the surface of the slice in the preBötC area (see Figs 1A and 3A). The signal was amplified through a high-gain amplifier (7P511; Grass Instruments, Quincy, MA, USA), filtered (low-pass 3 kHz, high-pass 30 Hz), rectified and integrated using an electronic filter (time constant 100 ms; Neurolog system, Digitimer, Hertfordshire, UK), and stored on a computer using the Pclamp9 software (digitizing interface DigiData 1322A; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Intracellular patch-clamp recordings were obtained from rhythmically active neurons located within 70–100 µm of the macroelectrode in the ventral respiratory group. Patch-clamp recordings were performed under visual control using differential contrast

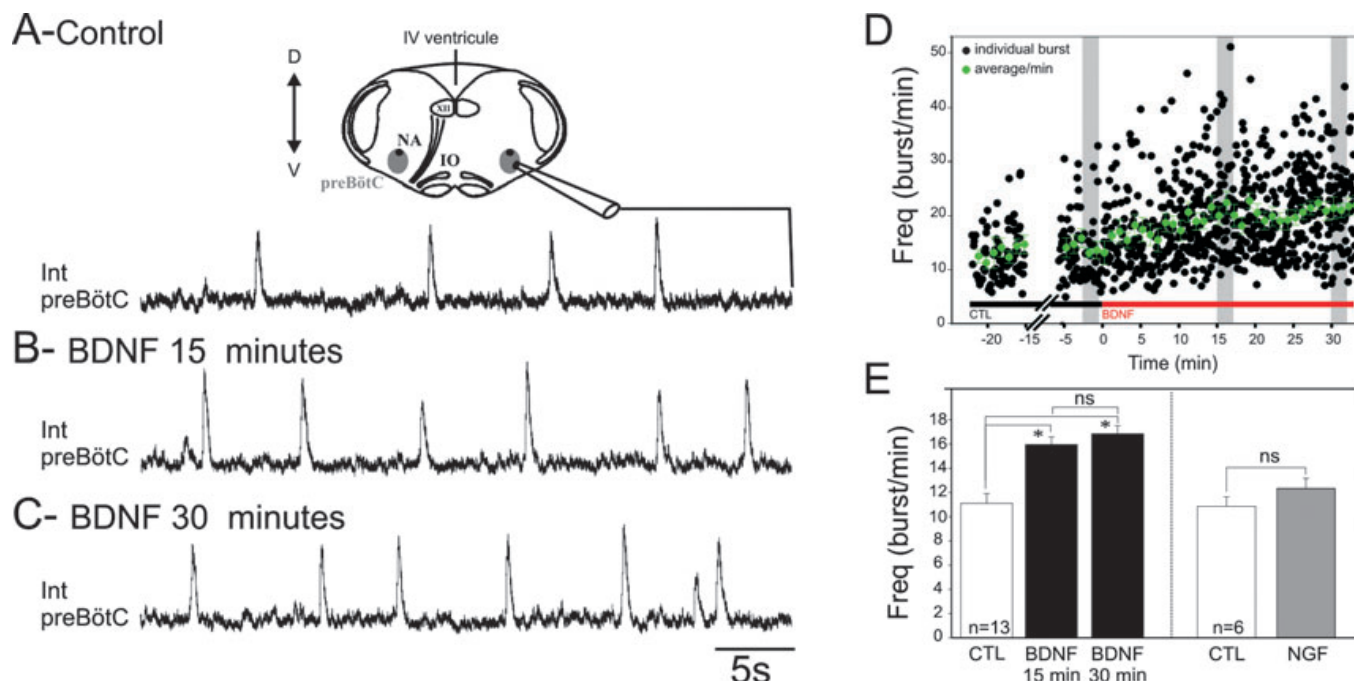


FIG. 1. BDNF increases respiratory frequency in the fetal mouse transverse brainstem slice preparation. Integrated population activity recorded from the preBötC respiratory network in control conditions (A) and after 15 min (B) and 30 min (C) exposure to 100 ng/mL BDNF. (A) Top: Schematic diagram of a transverse brainstem slice containing the preBötC from which population activity was recorded (see the integrated trace below). (D) Graph representing the kinetics of BDNF effects on individual burst frequency (black dots) and on frequency average/min (green dots) recorded from a single preparation. Grey rectangles indicate the time window during which measurements were performed for every experiment. (E) Bar histogram depicting the mean frequency of the preBötC rhythmic activity obtained from 13 preparations; control (CTL) (white bar), BDNF (15 and 30 min; two black bars) and nerve growth factor (NGF) (100 ng/mL; grey bar; $n = 6$). BDNF induced a significant increase in the frequency of the preBötC population activity, whereas NGF had no effect ($*P < 0.05$). IO, inferior olive; XII, hypoglossal nucleus; NA, nucleus ambiguus; D, dorsal; Int, integrated; IV, fourth (ventral); V, ventral; ns, not significant.

512 J. Bouvier *et al.*

microscopy, an Axoclamp2A amplifier (Molecular Devices) and Pclamp9 software. Patch electrodes were obtained from filamented borosilicate glass tubes (GC 150F; Clark, Pangbourn, UK), filled with a solution containing (in mM): 140 K-gluconic acid, 1 CaCl₂·6H₂O, 10 EGTA, 2 MgCl₂·6H₂O, 4Na₂ATP, 10 HEPES, pH 7.2. When filled with this solution the pipette resistance was 5–6 MΩ. With this solution chloride-mediated synaptic currents appear outward and glutamatergic-mediated synaptic currents appear inward at a holding potential of –50 mV (see Fig. 2B and C). The

inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) and excitatory postsynaptic currents (EPSCs) can also be distinguished by their decay time (>20 and <2 ms, respectively) and pharmacology; IPSCs are blocked by 10 μM bicuculline and 5 μM strychnine (Wallen-Mackenzie *et al.*, 2006), and EPSCs are blocked by 20 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 50 μM DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5).

Endogenous bursting properties were tested in either current-clamp mode by the capability of the recorded neurons to generate ectopic

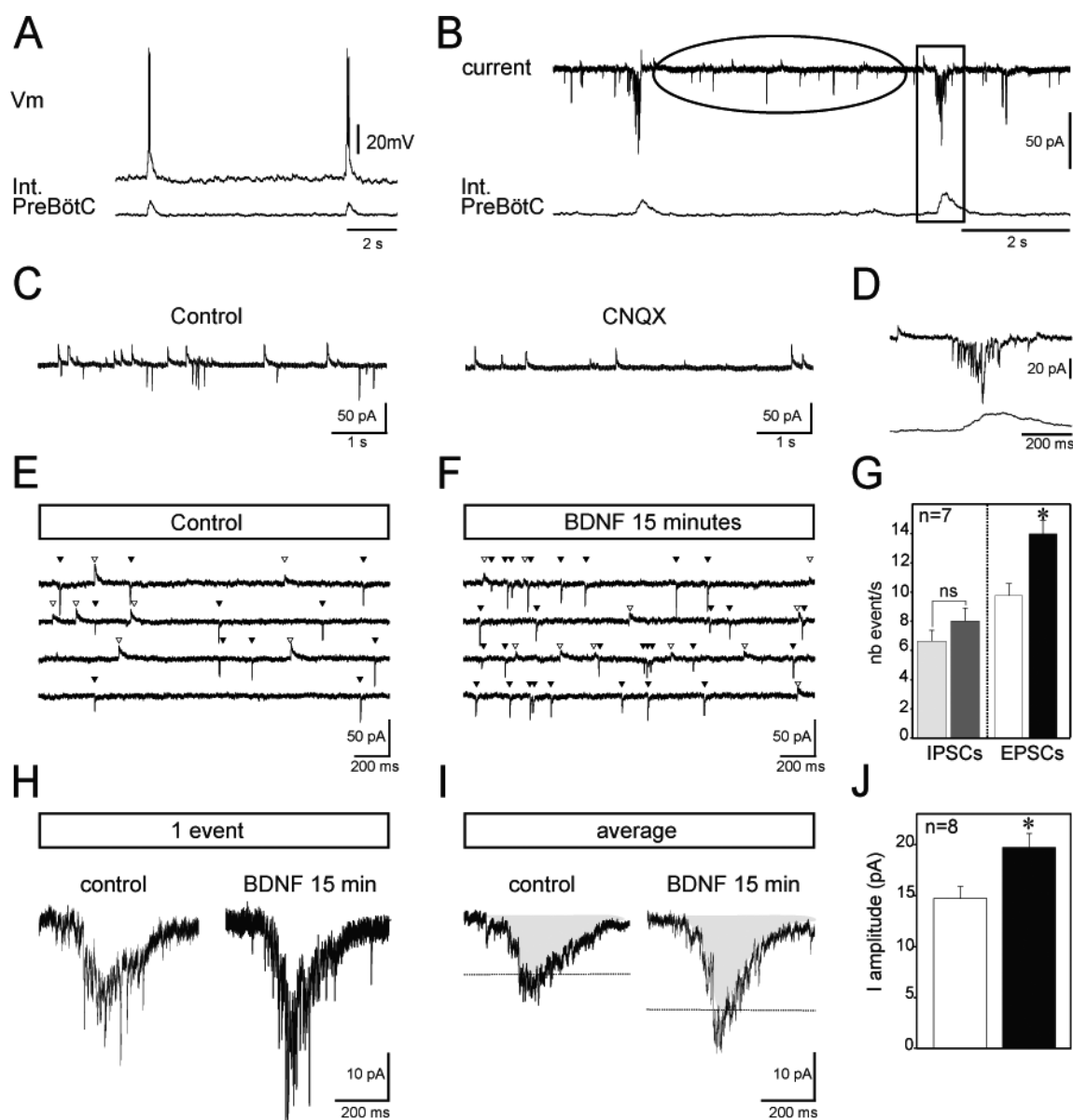


FIG. 2. BDNF enhances the activity of glutamatergic neurons in the fetal preBötC network. Intracellular recordings (top traces) from a rhythmic preBötC neuron in current-clamp (A) and voltage-clamp (B) mode recorded simultaneously with integrated population activity (bottom traces) under control conditions. The ellipse in B indicates the period between inspiratory bursts, represented at an extended time scale for a different neuron in C. Note that the application of CNQX blocks all excitatory glutamatergic events (right panel in C). The rectangle in B highlights one inspiratory burst, represented at an extended time scale in (D). Current traces recorded between inspiratory bursts at a holding potential of –50 mV are shown in control (E) and in the presence of BDNF (F). The four traces illustrated correspond to four samples obtained from the same neuron before and after BDNF application. White triangles indicate outward chloride-mediated synaptic currents and black triangles indicate inward glutamate-mediated synaptic currents. (G) Graph representing the mean number of inhibitory (IPSCs) and excitatory (EPSCs) events/s obtained from seven neurons in control conditions (light grey and white bars, respectively) and after BDNF treatment (dark grey and black bars, respectively). Synaptic glutamatergic drive (single event in H and average of 10 events in I) recorded from a fetal rhythmic neuron during a burst of population activity in control conditions (left panels in H and I) and after 15 min exposure to 100 ng/mL BDNF (right panels in H and I). Dashed lines indicating amplitude of the mean in the two conditions illustrate the potentiation of synaptic drive observed in the presence of BDNF. (J) Graph depicting the mean amplitude of the synaptic envelope obtained from eight neurons in control conditions (white bar) and after BDNF treatment (black bar). Int, integrated; nb, number; Vm, voltage. * $P < 0.05$.

bursts when compared with population activity in response to depolarizing current injection (Feldman & Del Negro, 2006) or by the persistence of asynchronous rhythmic activity in the presence of 20 μM CNQX alone (Koshiya & Smith, 1999; Thoby-Brisson & Ramirez, 2001) or in a cocktail (see below) containing 20 μM CNQX, 50 μM AP5, 10 μM bicuculline, 5 μM strychnine and 50 μM carbenoxolone (Thoby-Brisson *et al.*, 2000). Even if we did not further examine voltage-dependent pacemaker currents, neurons that fulfilled either of these criteria were categorized as endogenous bursters and the others were considered as follower inspiratory neurons.

Membrane resistance was obtained in voltage-clamp mode. The cells were hyperpolarized with an 80 ms voltage step of -10 mV from a holding voltage of -50 mV. The instantaneous current was measured 30 ms after the onset of the pulse. The Ih current was evoked by applying a series of 2 s hyperpolarizing voltage pulses increasing in 10 mV from a holding potential of -50 to -110 mV. The Ih current amplitude was measured by subtracting the current amplitude obtained at the end of the voltage step (steady-state current containing the Ih and the instantaneous current) from the current amplitude measured at the beginning of the pulse (containing only the instantaneous current).

Pharmacological agents were dissolved in artificial cerebrospinal fluid and bath applied at final concentrations of: 20 μM for CNQX (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 μM for AP5 (Sigma), 5 μM for strychnine (Sigma), 10 μM for bicuculline (Sigma), 50 μM for carbenoxolone (a gap junction blocker, Sigma), 100 ng/mL for BDNF (Sigma) for 15–30 min, 100 ng/mL for nerve growth factor (Promega, Madison, WI, USA) for 30 min and 200 nM for K252a (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) for 1 h. The durations of treatment were chosen in order to allow comparison with previous studies performed at postnatal stages (Thoby-Brisson *et al.*, 2003) and to be compatible with stable patch-clamp recording conditions.

Activity frequency was measured during a 2 min period in the different pharmacological conditions and during 3 min for endogenous burster neurons examined in calcium imaging experiments. Values are given as means \pm SEM. Statistical significance was tested using paired difference Student's *t*-test or one-way ANOVA test when appropriate. Values were considered as statistically different when $P < 0.05$.

Calcium imaging

Slices were loaded with the cell-permeant calcium indicator dye Calcium Green 1-AM (10 μM ; Molecular Probes) during a 45 min

incubation period. The preparation was then placed in the recording chamber where the excess dye was washed out during a 30 min period before image acquisition was performed. Using an E-600-FN upright microscope equipped with a fluorescein filter (Nikon, Tokyo, Japan) and a cooled CCD camera (Coolsnap HQ; Photometrics, Tucson, AZ, USA), fluorescent images were captured in the overlapping mode (simultaneous exposure and readout) with a 100 ms exposure time. Images were analysed using MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA). The changes in fluorescence were normalized to their initial value by expression as the ratio of changes in fluorescence to background fluorescence ($\Delta F/F$).

Single cell multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction

Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) experiments were performed following the procedure described previously (Cauli *et al.*, 1997; Thoby-Brisson *et al.*, 2003). Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from preBötC respiratory neurons defined as being active in phase with the population activity. After 5 min of recording the cytoplasm was aspirated into the recording pipette by application of a gentle negative pressure under visual and electrophysiological controls verifying that the seal was not lost and the holding current remained stable. The content of the pipette were then expelled into a tube containing the elements necessary for reverse transcription and kept at 38°C overnight (Lambolez *et al.*, 1992). We simultaneously detected expression of TrkB, p75, NK1R (substance P receptor neurokinin 1), μ receptor, VGlut2, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated non-selective cation channel (HCN)1–4 and BDNF mRNAs. Genomic DNA amplification, which occurred when the nucleus was inadvertently harvested, was assessed for each neuron using a somatostatin gene intron (as a genomic control). After the reverse transcription reaction, the cDNAs were amplified by 20 PCR cycles (30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 35 s at 75°C) using 2.5 U of *Taq* polymerase (Qiagen) added with 10 pmol of the primers specified in Table 1. Then, using 2 μL of the first PCR products as a template, 35 cycles of a second PCR were performed with the primers specified in Table 2. PCR fragments of 344, 185, 158, 339, 252, 435, 294, 115, 221 and 151 bp were expected for TrkB, HCN1, HCN2, HCN3, HCN4, VGlut2, NK1R, μ receptor, p75 and BDNF, respectively. A volume of 10 μL of each individual second-step PCR product was then run on a

TABLE 1. Sequence of the primers used for the first PCR in the single-cell multiplex reverse transcription-PCR protocol

Gene	First primer pair		Position	Sequence	PCR product
	Sense PCR primers	Antisense PCR primers			
	Position	Sequence	Position	Sequence	
TrkB	916–935	ACTGTGAGAGGCAACCCCAA	1327–1346	ATCACCAGCAGGCAGAATCC	431
p75	151–170	GGAGCCAACCAGACCGTGTG	410–431	TCTGGGCACTCTTCACACTG	280
BDNF	370–389	ATGTCTATGAGGGTTCCGGCG	606–625	GCGAGTCCAGTGCCTTTTG	256
VGlut2	316–335	CGCGGAGGCAAAGTTATCAA	805–828	TCTGTAATGGTAGGATGCTTTGC	513
NK1R	34–53	TTCCCAACACCTCCACCAA	455–474	AGCCAGGACCCAGATGACAA	441
Mu-R	75–94	ACCTGGCTCCTGGCTCAACT	290–310	TGGTGGCAGTCTTCATTTGG	236
HCN1	1642–1663	TGTCGTCTTTACTCCCTTTCCGG	1956–1975	CGGTGTAGACTGGCGGAGAT	334
HCN2	1698–1718	CAAGGGCAACAAGGAGATGAA	2056–2073	TGGCGTGGTGGGAAGAG	376
HCN3	1530–1549	TTGTCGCCTCTACTCGTCA	1902–1921	GGAGGGTGGCTGGAGAATCA	392
HCN4	24–43	CCGCTATCAAAGTGGAGGGA	265–284	TCAGCAACAGCATCGTCAGG	261
Intron	8–27	CTGTCCCTTACGAATCCC	228–247	CCAGCACCAGGGATAGAGCC	220

The primers are designed from 5' to 3'. Position 1 corresponds to the ATG codon.

TABLE 2. Sequence of the primers used for the second PCR in the single-cell multiplex reverse transcription-PCR protocol

Gene	Second primer pair		Position	Sequence	PCR product		
	Sense PCR primers					Antisense PCR primers	
	Position	Sequence				Position	Sequence
TrkB	941–962	CGCTTCAGTGGTTCTACAATGG	1265–1284	CTCCCGATTGCTTTGGTCAG	344		
p75	161–180	AGACCGTGTGTGAACCCTGC	364–381	GAGTCCTGAGCCCACCCC	221		
BDNF	445–464	TGGGTACACGGCCAGATAA	575–595	TGCAGCCTTCCTTGGTGTAAC	151		
VGlut2	362–379	CCGAGACCGTGGGGATGA	773–796	CATAAGACACCAAGAAGCCAGAACA	435		
NK1R	123–142	CATCGTGGTGACTTCCGTGG	397–416	TGAAGAGGGTGGATGATGGC	294		
Mu-R	196–216	GTCACAGCCATCACCATCATG	287–310	TGGTGGCAGTCTTCATTTGGTAT	115		
HCN1	1711–1734	GCCTTTGAGACAGTTGCTATTGAC	1872–1895	TGAGGATAGTTGATTGGAGGGATA	185		
HCN2	1830–1849	TTTCAACGAGGTGCTGGAGG	1968–1987	TGGCATTCTCCTGGTTGTTG	158		
HCN3	1564–1583	AATGCGGTGCTTGAGGAGTT	1885–1902	AGGGGAGAGGGGCAGAGG	339		
HCN4	24–43	CCGCTATCAAAGTGAGGGA	254–275	GCATCGTCAGTCCCAGTAAAA	252		
Intron	16–35	CTTACGAATCCCCAGCCTT	178–197	TTGAAAGCCAGGGAGGAAC	182		

The primers are designed from 5' to 3'. Position 1 corresponds to the ATG codon.

1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. We used Φ x174 cut by *Hae*III with bands at 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 and 118 bp, and pBR322 cut by *Msp*I with band at 67, 76, 90, 110, 123, 147, 160, 180, 190, 201, 238–242, 307, 404, 527 and 622 bp as molecular weight markers. As long-lasting patch recordings are incompatible with reverse transcription-PCR analysis, neither endogenous bursting properties nor BDNF effects could be tested for the neurons sampled.

Results

BDNF, but not nerve growth factor, increases the frequency of rhythmic activity in the fetal preBötC network

In 13 slice preparations obtained from E16.5 embryos, exhibiting stable rhythmic activity frequency in control conditions, exogenous application of 100 ng/mL BDNF induced a 43% increase in the frequency of population bursts recorded from the preBötC network after 15 min and a 51% increase after 30 min (Fig. 1A–D). Mean frequency values changed from 11.1 ± 0.8 bursts/min in control conditions to 15.9 ± 0.6 bursts/min after 15 min of BDNF treatment and to 16.8 ± 0.7 bursts/min after 30 min (*t*-test, $P < 0.0005$; Fig. 1E). Values obtained after 15 and 30 min were not statistically different (*t*-test, $P = 0.35$), suggesting that application of BDNF reached its maximum effect within 15 min (see Fig. 1D), a delay compatible with a non-genomic effect of the neurotrophin on neuronal excitability.

In six additional preparations, a 30 min application of 100 ng/mL nerve growth factor, another neurotrophin sharing a high degree of sequence homology with BDNF but acting through a distinct signalling pathway via activation of a different tyrosine kinase receptor type (TrkA; Ultsch *et al.*, 1999; Patapoutian & Reichardt, 2001), had no significant effect on the rhythmic activity frequency (11 ± 0.8 bursts/min in control conditions vs. 12.5 ± 0.8 bursts/min in the presence of nerve growth factor; *t*-test, $P = 0.72$; Fig. 1E). These experiments show that the respiratory network activity can be specifically modulated by BDNF at prenatal stages, with a delay of action similar to that known for classical neuromodulators in the same preparation.

BDNF increases glutamatergic synaptic inputs in the fetal preBötC network

As respiratory pattern and rhythm generation in the preBötC network relies in part on glutamatergic synaptic connections, we aimed at

examining the effect of BDNF on excitatory glutamatergic neurotransmission in rhythmically active neurons within the fetal preBötC (Fig. 2A). Voltage-clamp recordings revealed that fetal inspiratory neurons receive both chloride-mediated synaptic currents (blocked by 10 μ M bicuculline and 5 μ M strychnine) and glutamate-mediated synaptic currents (blocked by 20 μ M CNQX, Fig. 2C) in between two inspiratory bursts (Fig. 2B, ellipse and Fig. 2C), whereas the synaptic drive underlying inspiratory bursts is glutamate mediated (Fig. 2D). We performed synaptic current analysis on seven preBötC neurons exhibiting no evidence of endogenous bursting properties from seven slice preparations, for which we analysed an average of 150 glutamatergic events and 150 chloride-mediated events in periods between inspiratory bursts. First, we characterized the effect of the neurotrophin on glutamatergic currents spontaneously generated between individual rhythmic inspiratory bursts. The amplitude (27 ± 5 pA in control vs. 23 ± 6 pA in BDNF for 15 min; *t*-test, $P = 0.25$) and decay time (1.77 ± 0.2 ms in control vs. 1.91 ± 0.2 ms in BDNF for 15 min; *t*-test, $P = 0.29$) of the EPSC were unaffected by BDNF application. In contrast, BDNF exposure induced a significant increase in the frequency of spontaneous EPSCs (compare Fig. 2E with F). The mean frequency augmented from 9.75 ± 0.7 events/s in control to 13.9 ± 0.9 events/s in the presence of BDNF (*t*-test, $P < 0.0005$; Fig. 2G). Second, we analysed the effect of BDNF on chloride-mediated currents between inspiratory bursts. The amplitude (10.06 ± 2.7 pA in control vs. 8.21 ± 0.86 pA in BDNF for 15 min; *t*-test, $P = 0.5$), decay time (23.02 ± 3.4 ms in control vs. 27.27 ± 3.01 ms in BDNF for 15 min; *t*-test, $P = 0.4$) and frequency (6.61 ± 0.75 events/s in control vs. 8 ± 0.88 events/s in the presence of BDNF; *t*-test, $P > 0.05$; Fig. 2E–G) of IPSCs were not significantly affected by BDNF application. Thus, BDNF increases the activity of glutamatergic neurons without affecting chloride-mediated synaptic events.

Synchronization within the preBötC results from the summation of glutamatergic EPSCs forming the depolarizing drive underlying respiratory-related bursts (Fig. 2B, rectangle and Fig. 2D). We therefore examined whether the excitatory effect of BDNF on glutamatergic events resulted in changes of the respiratory drive. The amplitude of the inward synaptic drive was measured in control conditions and after 15 min exposure to BDNF in eight neurons held at -50 mV (Fig. 2H and I). The mean amplitude values obtained from 10 consecutive bursts increased significantly (*t*-test, $P = 0.006$) from 14.7 ± 1.2 pA in control to 19.7 ± 1.3 pA after treatment (Fig. 2I and J). As a consequence, the number of action potentials (APs) generated

during the burst was increased from 4.1 ± 0.3 APs/burst in control to 5.6 ± 0.4 APs/burst in the presence of BDNF (*t*-test, $P = 0.009$). Overall, these experiments revealed an excitatory action of BDNF on the activity of the glutamatergic neuronal population controlling the synchronization within the fetal preBötC network.

BDNF modulates the activity of endogenous bursting neurons in the fetal preBötC

We next investigated whether BDNF had a specific effect on the activity of respiratory neurons exhibiting endogenous bursting properties. In order to increase the probability of recording this type of cell, which represents a small proportion of preBötC neurons overall (Pena *et al.*, 2004), we used calcium imaging, which allows us to visualize calcium changes that reflect electrical activity (Thoby-Brisson *et al.*, 2005) simultaneously in a large number of cells in a single preparation (41 ± 5 rhythmic cells/slice, range 23–78 cells/slice, $n = 15$). In control conditions individual cells showed spontaneous changes in fluorescence (traces 1–10 in Fig. 3A) occurring in phase with changes observed in the preBötC area as a whole (green trace in Fig. 3A) and in phase with electrical activity recorded in the preBötC region (integrated trace in Fig. 3A).

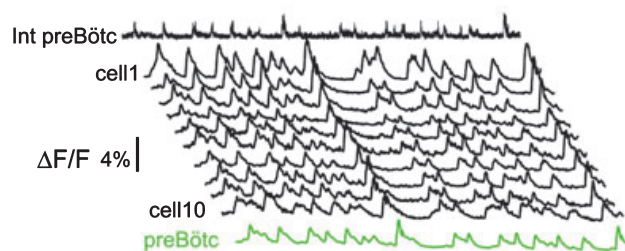
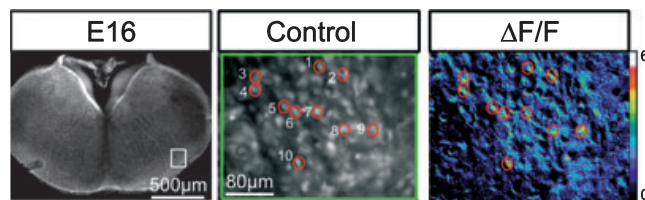
Blockade of connectivity in slice preparations with the application of $20 \mu\text{M}$ CNQX ($n = 8$) or a cocktail containing $20 \mu\text{M}$ CNQX, $50 \mu\text{M}$ AP5, $10 \mu\text{M}$ bicuculline, $5 \mu\text{M}$ strychnine and $50 \mu\text{M}$ carbenoxolone ($n = 7$) suppressed synchronized calcium events. This results in the absence of rhythmically organized calcium changes in the preBötC area (see the green and integrated traces in Fig. 3B). In these conditions, only a few cells continued to exhibit rhythmic calcium variations (cells 1 and 6 in Fig. 3B), a property assigned to endogenous bursters (Koshiya & Smith, 1999). Among 620 cells analysed from 15 preparations we found 47 bursting neurons (7.6% of the total population analysed), with 20 bursting neurons identified in the presence of CNQX and 27 bursting neurons identified in the presence of the cocktail.

Exogenous application of BDNF had a significant effect on calcium transients in these cells. Indeed, the presence of the neurotrophin induced a 53.3% increase in the frequency of rhythmically organized calcium variations in 40 of 47 isolated bursting neurons (see traces 1 and 6, Fig. 3C). The mean frequency of rhythmic calcium changes augmented from 3.1 ± 0.5 calcium transients/min in CNQX to 4.3 ± 0.6 calcium transients/min in the presence of BDNF (*t*-test, $P = 0.0004$) and from 3.01 ± 0.2 calcium transients/min in cocktail to 4.6 ± 0.3 calcium transients/min in the presence of BDNF (*t*-test, $P = 0.0002$). In contrast, for the seven remaining endogenous bursters, application of BDNF induced no significant changes in the frequency of calcium changes (3.4 ± 1.04 transients/min in cocktail and 3.1 ± 0.9 calcium transients/min in the presence of BDNF; *t*-test, $P = 0.82$). These data indicate that BDNF increases the activity of most of the respiratory bursting neurons by increasing the frequency of rhythmically organized calcium changes, thereby probably enhancing their ability to produce bursts. Altogether, we conclude that the excitatory effects of BDNF on the fetal preBötC network include an increase of activity in 85% of endogenous bursters.

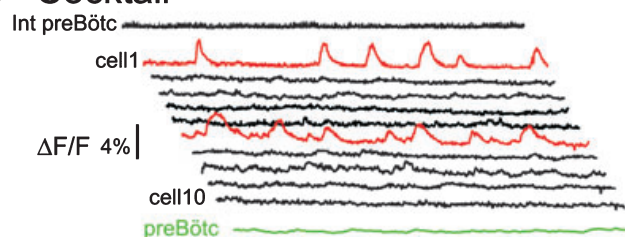
Basal membrane properties of fetal follower rhythmic neurons are not affected by BDNF

The BDNF-induced increases observed in the frequency of bursting neuron activity, the activity of glutamatergic neurons and the respiratory frequency could possibly be explained by changes in the

A- Control



B- Cocktail



C- Cocktail + BDNF 15 minutes

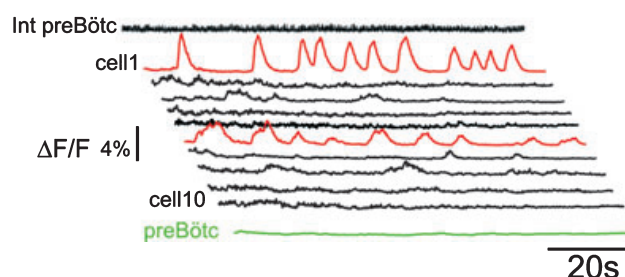


FIG. 3. BDNF modulates the frequency activity of isolated bursting neurons. (A) Top: Fluorescent images of an E16.5 transverse medullary slice taken at low (left) and high (middle) magnification following loading with the calcium indicator Calcium Green 1-AM. Note the recording electrode positioned at the surface of the slice in the preBötC region. The white rectangle delimits the area that contains rhythmic neurons and is shown at higher magnification in the middle panel with each of the cells numbered 1–10. An example of calcium transients visualized in these cells is shown in the right panel as relative changes in fluorescence ($\Delta F/F$). The traces in A–C display the calcium transients recorded from neurons 1–10 in control conditions (A), blocker cocktail ($20 \mu\text{M}$ CNQX, $50 \mu\text{M}$ AP5, $10 \mu\text{M}$ bicuculline, $5 \mu\text{M}$ strychnine and $50 \mu\text{M}$ carbenoxolone) (B) and blocker cocktail plus 100 ng/mL BDNF for 15 min (C). Calcium changes occurring in the preBötC area are shown in the green trace (preBötC) and electrical activity recorded in the contra-lateral preBötC is represented as the integrated trace (Int preBötC). In cocktail, population activity ceases (flat green trace and flat integrated recording) and synchronized calcium events disappear. The red traces highlight two neurons exhibiting endogenous bursting properties, neurons that remain rhythmically active after intra-network connectivity blockade. In the presence of BDNF the bursting frequency of these neurons increases (compare the red traces in B and C).

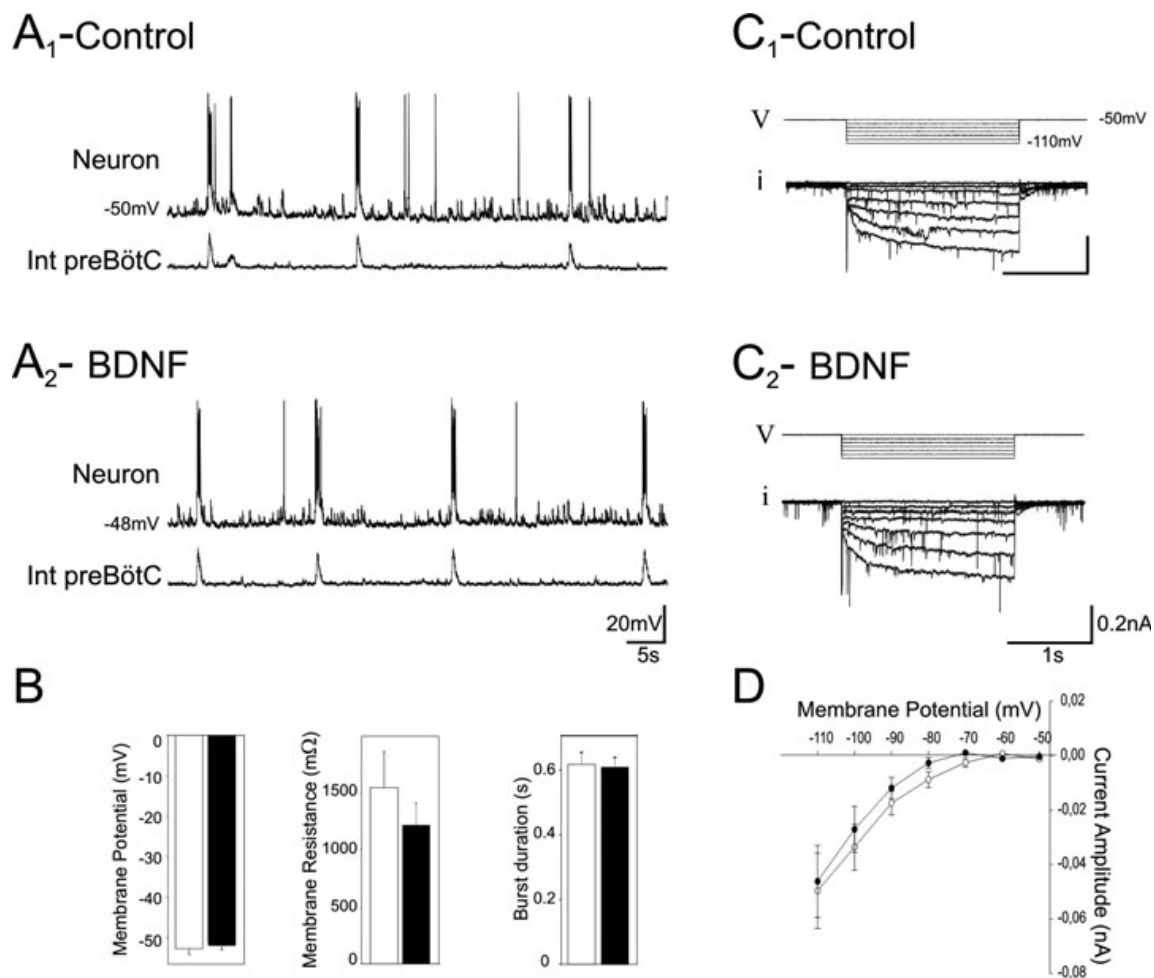
516 J. Bouvier *et al.*

FIG. 4. Membrane properties of inspiratory follower neurons are not affected by BDNF. (A) Intracellular recording from a rhythmic preBötC neuron (top traces) recorded simultaneously with integrated population activity (bottom traces) in control conditions (A₁) and after 15 min exposure to 100 ng/mL BDNF (A₂). (B) Bar histograms showing the mean values for membrane potential, membrane resistance and burst duration in control conditions (white bars) and in the presence of 100 ng/mL BDNF (black bars) obtained for eight neurons. Voltage stimulation protocol (V) used to evoke the I_h current (i) in control conditions (C₁) and after 15 min exposure to BDNF (C₂). (D) Graph of the I_h current amplitude vs. voltage. Mean curves were obtained from seven neurons and evoked currents were measured in control conditions (open circles) and after 15 min in the presence of 100 ng/mL BDNF (black circles). BDNF had no significant effect on any of the membrane properties tested. Int, integrated.

membrane properties of rhythmically active neurons. The frequency increase could simply result from a depolarization of the membrane potential of respiratory neurons. However, whole-cell patch-clamp recordings performed on eight rhythmically active neurons exhibiting no evidence of endogenous bursting properties revealed that the mean resting membrane potential value was unaffected by BDNF (mean values -52.7 ± 1.3 mV in control vs. -51.1 ± 1.8 mV in BDNF, *t*-test, $P = 0.49$; Fig. 4A and B). Similarly, membrane resistance and burst duration remained unchanged after 15 min exposure to BDNF (*t*-test, $P = 0.38$). The mean values were 1547 ± 312 MΩ in control vs. 1213 ± 197 MΩ in BDNF and 606 ± 29 ms in control vs. 616 ± 36 ms in BDNF for membrane resistance and burst duration, respectively (Fig. 4B).

We also examined the I_h current because (i) this conductance is known to play an important role in respiratory rhythm modulation (Thoby-Brisson *et al.*, 2000), (ii) the I_h current is expressed by some respiratory neurons exhibiting pacemaker properties (Thoby-Brisson *et al.*, 2000; Thoby-Brisson & Ramirez, 2001) and (iii) the I_h current is known to be a target for BDNF at postnatal stages (Thoby-Brisson *et al.*, 2003). In seven rhythmic neurons expressing the I_h current,

BDNF exposure induced no significant changes in its amplitude over a voltage range from -50 to -110 mV. One example is illustrated in Fig. 4C₁ (control) and Fig. 4C₂ (after BDNF treatment). The mean current amplitude obtained for a voltage step from -50 to -110 mV remained similar in control conditions (49 ± 13 pA) and in the presence of BDNF (46 ± 13 pA; *t*-test, $P = 0.86$; Fig. 4D). Thus, the membrane properties of the follower neurons that we tested, which may be involved in the modulation of respiratory rhythm, appear not to be affected by exogenous BDNF.

BDNF acts through activation of TrkB receptors expressed by fetal preBötC neurons

To begin to define the signalling pathway through which BDNF acts on fetal respiratory neurons we tested the requirement for activation of the tyrosine kinase receptor TrkB, a high-affinity binding site for BDNF. In a first set of experiments embryonic slices were pretreated with the tyrosine kinase inhibitor K252a (200 nM) for 1 h. The frequency of the preBötC rhythmic activity was similar (ANOVA) in control conditions (12.4 ± 1.1 bursts/min), in the presence of K252a

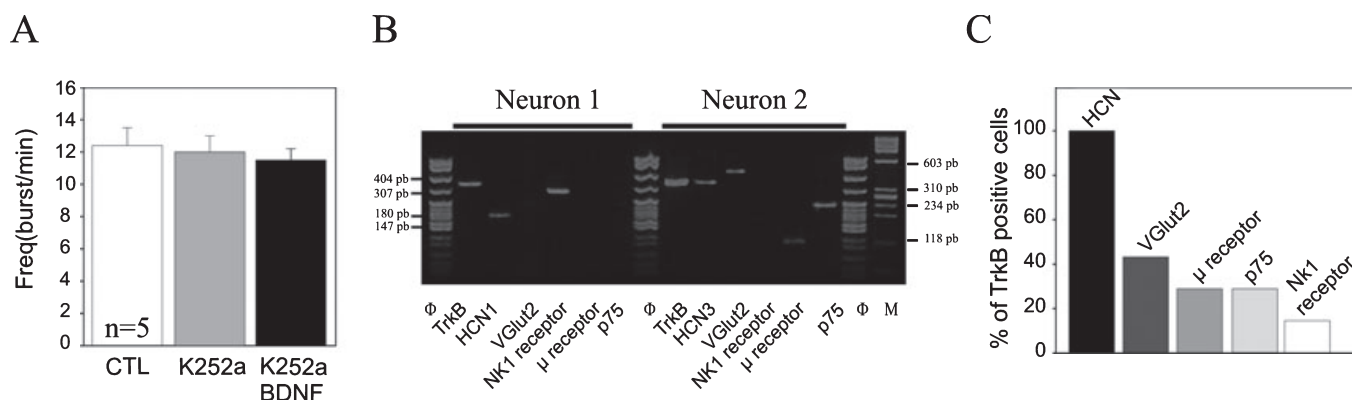


Fig. 5. Evidence that TrkB signalling mediates BDNF regulation of fetal preBötC neuron activity. (A) Bar histograms showing the mean firing frequency of preBötC neurons ($n = 5$; extracellular activity from five preparations) in control (CTL) conditions (white bars), in the presence of 200 nM K252a for 1 h (light grey bar) and in the presence of 200 nM K252a plus 100 ng/mL BDNF for 15 min (black bar) following 1 h pretreatment with the tyrosine kinase inhibitor alone. In contrast to the increase in frequency observed in response to BDNF alone (Fig. 1), BDNF had no effect in the presence of K252a, consistent with a requirement for tyrosine kinase activation. (B) Agarose gel analysis of reverse transcription-PCR products amplified from two different rhythmic neurons. Φ and M correspond to molecular weight markers (indicated on the left and right of the gel). (C) Bar graph representing the proportion of TrkB-positive neurons expressing other markers, including HCNs, VGlut2, μ receptor, p75 receptor and NK1R.

(12 ± 1 bursts/min; $P = 0.8$) and in the presence of K252a plus BDNF (11.5 ± 0.7 bursts/min; $P = 0.91$; $n = 5$; Fig. 5A). Thus, the effects of BDNF on respiratory frequency were abolished in the presence of K252a, suggesting that TrkB activation is required to mediate the effect of BDNF on respiratory frequency.

In a second set of experiments, the expression of mRNAs encoding proteins involved in BDNF signalling was examined in functionally identified respiratory neurons using single-cell multiplex reverse transcription-PCR. In 22 rhythmically active preBötC neurons (without distinction between endogenous bursters or follower neurons) we examined the expression of mRNAs encoding TrkB, the pan-neurotrophin receptor p75 and the hyperpolarization-activated non-selective cationic channel subunits of the Ih current (HCN1-4), as well as mRNAs encoding possible markers of inspiratory neurons, such as the NK1R, the μ opioid receptor and for the vesicular transporter VGlut2. It is very likely that these mRNAs give rise to functional proteins as (i) the Ih and glutamatergic currents are detectable in the fetal neurons recorded, (ii) BDNF modulates preBötC network activity and has direct effects on the bursting frequency of some respiratory neurons and (iii) the modulation by substance P and opioid agonists is already effective at the examined stage (Thoby-Brisson *et al.*, 2005). Of the 22 cells tested, seven (32%) expressed TrkB mRNA and all of these co-expressed at least one of the HCN subunit mRNAs (Fig. 5B and C); three-seventh of the TrkB-expressing neurons also expressed VGlut2 mRNA, two-seventh co-expressed the μ receptor mRNA and only one neuron co-expressed NK1R (Fig. 5C), proportions that are similar to those described in the newborn (Thoby-Brisson *et al.*, 2003). p75 mRNA was found in five neurons (23%), two of which also expressed TrkB mRNA (Fig. 5B and C). The fact that a significant subset of rhythmically active neurons expresses TrkB mRNA is consistent with fetal preBötC neurons being a direct target of BDNF. Moreover, the mRNA encoding BDNF itself was found in two out of 10 neurons tested, suggesting that some preBötC neurons could themselves be a source of BDNF within the fetal respiratory network.

Discussion

The present study demonstrates that BDNF can acutely regulate respiratory rhythmogenesis in the fetal mouse brainstem slice preparation. In particular, exogenous BDNF increases respiratory

frequency in the preBötC, a key site for respiratory pattern generation, through a potentiation of excitatory glutamatergic synaptic drives associated with a frequency increase in the activity of endogenously bursting neurons; 32% of rhythmically active neurons tested express mRNA encoding the TrkB receptor, consistent with a direct action of BDNF on a subset of preBötC neurons. Thus, in addition to long-term effects on the survival and maturation of respiratory-related neurons (Katz, 2005), BDNF signalling may also be important for acute modulation of the fetal respiratory rhythmogenic network.

Fetal respiratory rhythm regulation by BDNF is associated with modifications in glutamatergic signalling and activity of endogenous bursting neurons in the preBötC

From *in-vitro* experiments performed on preparations obtained at postnatal stages it is considered that respiratory rhythm and pattern generation rely on interplay between glutamatergic connections and bursting properties expressed in a subset of respiratory neurons (Rekling & Feldman, 1998; Del Negro *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2004; Feldman & Del Negro, 2006). The present data show that, in the embryo, BDNF modulates the activity of the preBötC by enhancing the excitatory glutamatergic synaptic drive underlying bursting discharge and the intrinsic bursting frequency of isolated endogenous bursting neurons. It is possible that increased activity of endogenous bursters may contribute to the increase in respiratory frequency of the whole network. However, the discrepancy between the proportion of TrkB-positive neurons in the preBötC on the one hand (32%) and the number of rhythmic neurons exhibiting endogenous bursting properties on the other (<10%) indicates that bursting neurons are not the only target for BDNF within the respiratory neural network. In addition, potentiation of glutamatergic synaptic drive could result from either the increase in the discharge during bursts of activity in presynaptic glutamatergic neurons, some of which are endogenous bursters, a direct effect of BDNF on glutamatergic transmission (for review see Lessmann, 1998) or both. At the same time, increased synaptic drive could augment the intra-burst discharge in postsynaptic neurons including in bursting neurons. Thus, these two effects of BDNF, on activity of endogenous bursting neurons and glutamatergic synaptic drive, respectively, could work in concert to increase the activity of the network as a whole. It has to be emphasized that the

implication of endogenous bursting neurons in respiratory rhythmogenesis and functional breathing activity is still controversial at postnatal (Roland *et al.*, 1980; Paton & St-John, 2007; Ramirez & Garcia, 2007) as well as at prenatal stages. BDNF-induced modulation mechanisms are certainly more complex when considering the fully intact fetal respiratory system.

We observed BDNF effects on endogenous bursting neuron activity after isolation of these cells from their synaptic partners in the respiratory network. This suggests that BDNF alters bursting activity by acting directly on membrane properties such as voltage-dependent conductances. One possibility is that BDNF accelerates the bursting frequency of these cells by bringing the membrane potential to values compatible with a stronger activation of pacemaker currents. Moreover, given that bursting neurons within the respiratory neural network are heterogeneous and that their activity relies on sodium-dependent conductances, calcium currents and/or the Ih current (Thoby-Brisson *et al.*, 2000; Thoby-Brisson & Ramirez, 2001; Pena *et al.*, 2004), it is possible that BDNF differentially modulates the activity of distinct pacemaker subtypes. However, analyses of BDNF effects on bursting neuron membrane properties within the preBötC will be required to address these possibilities.

BDNF modulation of respiratory rhythm is distinct in fetal and newborn mice

We previously identified a neuromodulatory action of BDNF on properties of the respiratory network in newborn animals. In contrast to the current findings in the fetus, exposure of the newborn mouse brainstem slice to BDNF results in a decrease in respiratory frequency (Thoby-Brisson *et al.*, 2003). This decrease is associated with increased glutamatergic drives and a significant reduction in the Ih current amplitude. First, the fact that at both developmental stages examined (pre- and postnatal) we found an increase in the glutamatergic synaptic drive but opposite effects on the frequency suggests that these two parameters are not directly linked. Second, at prenatal stages, the Ih current is unaffected by BDNF and is smaller in amplitude than after birth (Thoby-Brisson *et al.*, 2000). Thus, there is a developmental switch in the effect of BDNF on respiratory frequency between E16.5 and postnatal days 1–4 that may rely in part on the maturation of membrane properties in preBötC neurons, including the Ih current. This possibility is consistent with findings in other neuronal populations that maturation of the Ih current can contribute to the shaping of rhythmic activity (Di Pasquale *et al.*, 1996; Vasilyev & Barish, 2002). More generally, development of the Ih current is hypothesized to strongly contribute to functional maturation of neuronal circuits (Rocha *et al.*, 2006). Interestingly, we found that all fetal rhythmic neurons expressing the TrkB receptor mRNA also expressed HCN mRNAs at E16.5, despite the fact that TrkB signalling and Ih current modulation are not yet linked at this stage. We hypothesize, therefore, that the functional maturation of pathways linking TrkB receptor activation and Ih may be a critical step in the development of BDNF modulation of respiratory rhythmogenesis in the preBötC. Further experiments are required to test this hypothesis and should also be extended to other conductances known to play important roles in respiratory rhythmogenesis, such as persistent sodium current and calcium-activated non-specific cationic current (Thoby-Brisson & Ramirez, 2001; Del Negro *et al.*, 2002, 2005; Pena *et al.*, 2004; Paton *et al.*, 2006).

Age-dependent effects of BDNF-induced acute modulation have also been observed after birth in other parts of the central nervous system. For example, in the spinal cord, BDNF-induced depression of EPSCs in motoneurons was observed only during the first postnatal

week (Arvanian & Mendell, 2001). In the Kölliker–Fuse nucleus, another structure related to respiration, the strength and direction of BDNF-mediated modulation of glutamatergic synaptic activity depend on the developmental stage (Kron *et al.*, 2007a) and the depressant effect of BDNF on spontaneous IPSC amplitude was significant only during the first 10 days after birth (Kron *et al.*, 2007b). In the context of the preBötC, changes in the effect of BDNF on respiratory rhythm generated in the preBötC probably occur around birth. This earlier switch is possibly due to the fact that the Kölliker–Fuse nucleus and preBötC exhibit completely different maturational profiles and, most probably, the preBötC is more mature at birth than the Kölliker–Fuse nucleus (Dutschmann *et al.*, 2004).

Acute and trophic actions of BDNF

Deletion of the gene encoding BDNF results in severe respiratory disturbances, including depressed and irregular ventilation associated with dysfunction of the central respiratory generator and loss of peripheral chemoreceptor inputs (Erickson *et al.*, 1996; Balkowiec & Katz, 1998). These defects are due in part to developmental deficits linked to the lack of neurotrophic action of BDNF during embryonic development (Erickson *et al.*, 1996; Balkowiec & Katz, 1998). Because a rhythm is still generated in the reduced brainstem preparation obtained from BDNF^{-/-} animals it is tempting to consider that BDNF is not necessary for establishment of the rhythm generator but rather for maturation of the central respiratory controller and some of the properties of its constitutive elements (Balkowiec & Katz, 1998). Given that neural activity is itself a critical developmental cue required for normal maturation of embryonic motor circuits (Hanson & Landmesser, 2004), the present data suggest that respiratory abnormalities observed in newborn animals that are deficient in BDNF might reflect a lack of acute neuromodulatory action in the fetal respiratory network as well as neurotrophic defects. This possibility is consistent with observations that BDNF plays a critical role in activity-dependent maturation of synaptic connections (Shen *et al.*, 2006). Moreover, given the fact that (i) the preBötC itself contains neurons expressing mRNA coding for BDNF, (ii) BDNF increases activity in the preBötC network and (iii) the release of the neurotrophin is activity-dependent, it is possible that the maturation and modulation of respiratory network activity are reciprocally related by an autocrine/paracrine action of BDNF within the respiratory network.

More generally, our findings may be relevant to understanding the pathophysiology of respiratory dysfunction in Rett syndrome, a severe progressive neurological disorder caused by loss of function mutations in the gene encoding the transcription factor methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) (Van den Veyver & Zoghbi, 2000; Bienvenu & Chelly, 2006; Francke, 2006). Indeed, MeCP2 is known to regulate BDNF transcription (Chen *et al.*, 2003; Wade, 2004; Chang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006) and mouse models in which MeCP2 is deleted exhibit severely depressed levels of BDNF in the brainstem (Wang *et al.*, 2006; Ogier *et al.*, 2007), abnormal BDNF secretion (Wang *et al.*, 2006; Ogier *et al.*, 2007) and respiratory breathing phenotypes (Viemari *et al.*, 2005; Ogier *et al.*, 2007) similar to respiratory dysfunction in Rett syndrome (Elián & Rudolf, 1991; Kerr, 1992; Kerr & Julu, 1999; Julu *et al.*, 2001; Weese-Mayer *et al.*, 2006). Although the respiratory phenotype in Rett syndrome appears late in postnatal development (i.e. a few months after birth in mice and 1.5–2 years in human), there is increasing evidence for early neuronal defects (Einspieler *et al.*, 2005; Medrihan *et al.*, 2008). For example, MeCP2-deficient neurons already exhibit abnormal BDNF secretion at birth (Wang *et al.*, 2006; Ogier *et al.*, 2007). It will therefore be

important to determine whether or not prenatal disruption of BDNF signalling in the preBötC is a consequence of MeCP2 deficiency that contributes to respiratory network dysfunction in Rett syndrome.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique for NGI, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (M.T.-B.) and the U.S. National Heart, Lung and Blood Institute (D.M.K.).

Abbreviations

AP, action potential; AP5, DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; E, embryonic day; EPSC, excitatory postsynaptic current; HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated non-selective channel; IPSC, inhibitory postsynaptic current; MeCP2, methyl-CpG binding protein 2; PCR, polymerase chain reaction; preBötC, preBötzinger complex; VGlut2, type 2 vesicular glutamate transporter.

References

Arvanian, V.L. & Mendell, L.M. (2001) Acute modulation of synaptic transmission to motoneurons by BDNF in the neonatal rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1800–1808.

Balkowiec, A. & Katz, D.M. (1998) Brain-derived neurotrophic factor is required for normal development of the central respiratory rhythm in mice. *J. Physiol.*, **510** (Pt. 2), 527–533.

Balkowiec, A. & Katz, D.M. (2000) Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J. Neurosci.*, **20**, 7417–7423.

Balkowiec, A. & Katz, D.M. (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **22**, 10399–10407.

Bienvenu, T. & Chelly, J. (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat. Rev.*, **7**, 415–426.

Blum, R. & Konnerth, A. (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 70–78.

Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S. & Rossier, J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.*, **17**, 3894–3906.

Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S. & Jaenisch, R. (2006) The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*, **49**, 341–348.

Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R. & Greenberg, M.E. (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*, **302**, 885–889.

Del Negro, C.A., Morgado-Valle, C. & Feldman, J.L. (2002) Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron*, **34**, 821–830.

Del Negro, C.A., Morgado-Valle, C., Hayes, J.A., Mackay, D.D., Pace, R.W., Crowder, E.A. & Feldman, J.L. (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J. Neurosci.*, **25**, 446–453.

Di Pasquale, E., Tell, F., Monteau, R. & Hilaire, G. (1996) Perinatal developmental changes in respiratory activity of medullary and spinal neurons: an in vitro study on fetal and newborn rats. *Brain Res.*, **91**, 121–130.

Dutschmann, M., Morschel, M., Kron, M. & Herbert, H. (2004) Development of adaptive behaviour of the respiratory network: implications for the pontine Kolliker–Fuse nucleus. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **143**, 155–165.

Einspieler, C., Kerr, A.M. & Precht, H.F. (2005) Is the early development of girls with Rett disorder really normal? *Pediatr. Res.*, **57**, 696–700.

Elian, M. & Rudolf, N.D. (1991) EEG and respiration in Rett syndrome. *Acta Neurol. Scand.*, **83**, 123–128.

Erickson, J.T., Conover, J.C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G. & Katz, D.M. (1996) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J. Neurosci.*, **16**, 5361–5371.

Feldman, J.L. & Del Negro, C.A. (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev.*, **7**, 232–242.

Francke, U. (2006) Mechanisms of disease: neurogenetics of MeCP2 deficiency. *Nat. Clin. Pract.*, **2**, 212–221.

Hanson, M.G. & Landmesser, L.T. (2004) Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*, **43**, 687–701.

Henneberger, C., Juttner, R., Schmidt, S.A., Walter, J., Meier, J.C., Rothe, T. & Grantyn, R. (2005) GluR- and TrkB-mediated maturation of GABA receptor function during the period of eye opening. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 431–440.

Julu, P.O., Kerr, A.M., Apartopoulos, F., Al-Rawas, S., Engerstrom, I.W., Engerstrom, L., Jamal, G.A. & Hansen, S. (2001) Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch. Dis. Child.*, **85**, 29–37.

Kafitz, K.W., Rose, C.R., Thoenen, H. & Konnerth, A. (1999) Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature*, **401**, 918–921.

Katz, D.M. (2005) Regulation of respiratory neuron development by neurotrophic and transcriptional signaling mechanisms. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **149**, 99–109.

Kerr, A.M. (1992) A review of the respiratory disorder in the Rett syndrome. *Brain Dev.*, **14** (Suppl.), S43–S45.

Kerr, A.M. & Julu, P.O. (1999) Recent insights into hyperventilation from the study of Rett syndrome. *Arch. Dis. Child.*, **80**, 384–387.

Koshiya, N. & Smith, J.C. (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, **400**, 360–363.

Kovalchuk, Y., Holthoff, K. & Konnerth, A. (2004) Neurotrophin action on a rapid timescale. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **14**, 558–563.

Kron, M., Morschel, M., Reuter, J., Zhang, W. & Dutschmann, M. (2007a) Developmental changes in brain-derived neurotrophic factor-mediated modulations of synaptic activities in the pontine Kolliker–Fuse nucleus of the rat. *J. Physiol.*, **583**, 315–327.

Kron, M., Zhang, W. & Dutschmann, M. (2007b) Developmental changes in the BDNF-induced modulation of inhibitory synaptic transmission in the Kolliker–Fuse nucleus of rat. *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 3449–3457.

Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crepel, F. & Rossier, J. (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*, **9**, 247–258.

Lessmann, V. (1998) Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen. Pharmacol.*, **31**, 667–674.

Li, Y.X., Zhang, Y., Lester, H.A., Schuman, E.M. & Davidson, N. (1998) Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 10231–10240.

Lou, H., Kim, S.K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B. & Loh, Y.P. (2005) Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron*, **45**, 245–255.

Medrihan, L., Tantalaki, E., Aramuni, G., Sargsyan, V., Dudanova, I., Missler, M. & Zhang, W. (2008) Early defects of GABAergic synapses in the brain stem of a MeCP2 mouse model of rett syndrome. *J. Neurophysiol.*, **99**, 112–121.

Ogier, M., Wang, H., Hong, E., Wang, Q., Greenberg, M.E. & Katz, D.M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor expression and respiratory function improve after ampakine treatment in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci.*, **27**, 10912–10917.

Patapoutian, A. & Reichardt, L.F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 272–280.

Paton, J.F. & St-John, W.M. (2007) Counterpoint: medullary pacemaker neurons are essential for gasping, but not eupnea, in mammals. *J. Appl. Physiol.*, **103**, 718–720.

Paton, J.F., Abdala, A.P., Koizumi, H., Smith, J.C. & St-John, W.M. (2006) Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nat. Neurosci.*, **9**, 311–313.

Pena, F., Parkis, M.A., Tryba, A.K. & Ramirez, J.M. (2004) Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron*, **43**, 105–117.

Ramirez, J.M. & Garcia, A., III (2007) Point: medullary pacemaker neurons are essential for both eupnea and gasping in mammals. *J. Appl. Physiol.*, **103**, 717–718; Discussion 722.

Rekling, J.C. & Feldman, J.L. (1998) PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 385–405.

Rocha, N., Rolf, A. & Strauss, U. (2006) Ih is maturing: implications for neuronal development. *Neurodegener. Dis.*, **3**, 27–31.

Roland, P.E., Larsen, B., Lassen, N.A. & Skinhoj, E. (1980) Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man. *J. Neurophysiol.*, **43**, 118–136.

520 J. Bouvier *et al.*

- Rose, C.R., Blum, R., Kafitz, K.W., Kovalchuk, Y. & Konnerth, A. (2004) From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays*, **26**, 1185–1194.
- Shen, W., Wu, B., Zhang, Z., Dou, Y., Rao, Z.R., Chen, Y.R. & Duan, S. (2006) Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron*, **50**, 401–414.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W. & Feldman, J.L. (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, **254**, 726–729.
- Stornetta, R.L., Rosin, D.L., Wang, H., Sevigny, C.P., Weston, M.C. & Guyenet, P.G. (2003) A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex. *J. Comp. Neurol.*, **455**, 499–512.
- Thoby-Brisson, M. & Ramirez, J.M. (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J. Neurophysiol.*, **86**, 104–112.
- Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P. & Ramirez, J.M. (2000) The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *J. Neurosci.*, **20**, 2994–3005.
- Thoby-Brisson, M., Cauli, B., Champagnat, J., Fortin, G. & Katz, D.M. (2003) Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *J. Neurosci.*, **23**, 7685–7689.
- Thoby-Brisson, M., Autran, S., Fortin, G. & Champagnat, J. (2004) BDNF preferentially targets membrane properties of rhythmically active neurons in the pre-Botzinger complex in neonatal mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **551**, 115–120.
- Thoby-Brisson, M., Trinh, J.B., Champagnat, J. & Fortin, G. (2005) Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J. Neurosci.*, **25**, 4307–4318.
- Ultsch, M.H., Wiesmann, C., Simmons, L.C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S.H. & de Vos, A.M. (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J. Mol. Biol.*, **290**, 149–159.
- Van den Veyver, I.B. & Zoghbi, H.Y. (2000) Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 275–279.
- Vasilyev, D.V. & Barish, M.E. (2002) Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current *I_h* in mouse hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **22**, 8992–9004.
- Viemari, J.C., Maussion, G., Bevingut, M., Burnet, H., Pequignot, J.M., Nepote, V., Pachnis, V., Simonneau, M. & Hilaire, G. (2005) Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 2403–2412.
- Wade, P.A. (2004) Dynamic regulation of DNA methylation coupled transcriptional repression: BDNF regulation by MeCP2. *Bioessays*, **26**, 217–220.
- Wallen-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygard, A., Enjin, A., Fujiyama, F., Fortin, G. & Kullander, K. (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J. Neurosci.*, **26**, 12294–12307.
- Wang, H., Chan, S.A., Ogier, M., Hellard, D., Wang, Q., Smith, C. & Katz, D.M. (2006) Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *MeCP2* null mice. *J. Neurosci.*, **26**, 10911–10915.
- Weese-Mayer, D.E., Lieske, S.P., Boothby, C.M., Kenny, A.S., Bennett, H.L., Silvestri, J.M. & Ramirez, J.M. (2006) Autonomic nervous system dysregulation: breathing and heart rate perturbation during wakefulness in young girls with Rett syndrome. *Pediatr. Res.*, **60**, 443–449.
- Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., Hu, L., Steen, J.A., Weitz, C.J. & Greenberg, M.E. (2006) Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent *Bdnf* transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*, **52**, 255–269.

La respiration est une activité rythmique motrice bilatéralement synchronisée présente chez le fœtus et vitale à la naissance. Au cours du développement, des interneurones dans le tronc cérébral s'organisent en réseaux qui génèrent et modulent la commande rythmique respiratoire. Ils y forment deux oscillateurs, actifs chez l'embryon et vitaux à la naissance : l'oscillateur parafacial et le complexe preBötzinger. Les mécanismes qui gouvernent l'assemblage et contraignent la fonction de ces réseaux sont étudiés dans le laboratoire avec des outils génétiques, des techniques histologiques, électrophysiologiques et d'imagerie chez la souris.

Etudiant le développement du complexe preBötzinger, nous montrons que des progéniteurs neuronaux exprimant le gène à homéobox *Dbx1* donnent naissance aux interneurones qui constituent le cœur de l'oscillateur. Ces interneurones (i) sont glutamatergiques et nécessaires à la genèse du rythme, (ii) expriment le gène *Robo3* requis pour que leurs axones croisent la ligne médiane et conditionnent la synchronisation de l'activité. Cette étude illustre et affine les liens existant entre les schémas de régionalisation du tube neural et l'émergence de modules fonctionnels en permettant de proposer une signature transcriptionnelle des neurones rythmogènes principaux de la respiration.

Genetic dissection of the central respiratory pattern generator: rhythmogenic neurons and bilateral synchronization

Breathing is a rhythmic and bilaterally synchronous motor activity present in the fetus and vital at birth. During development hindbrain interneurons are being organized into networks that generate and modulate the rhythmic respiratory command. They form two oscillator networks, active at embryonic stages and vital at birth: the parafacial oscillator and the preBötzinger Complex. The mechanisms that govern the assembling, and constrain the function, of these networks are studied in the laboratory using developmental genetics tools combined with histological, electrophysiological and imaging techniques in mice.

Investigating the development of the preBötzinger complex, we show that neural progenitors expressing the homeobox gene *Dbx1* give rise to the interneurons that constitute core components of this oscillator network. These interneurons (i) are glutamatergic and necessary for rhythm generation, (ii) express the *Robo3* gene required for their axon to cross the midline and enforce bilateral synchronous activity. This study illustrates and further refines the existing links between neural tube regionalization and the emergence of functional modules by proposing a transcriptional signature of the principal respiratory rhythmogenic interneurons.