



HAL
open science

Bases neuronales de la réponse respiratoire au CO₂: Dissection génétique du noyau Rétro-trapézoïde chez la souris

Pierre-Louis Ruffault

► **To cite this version:**

Pierre-Louis Ruffault. Bases neuronales de la réponse respiratoire au CO₂: Dissection génétique du noyau Rétro-trapézoïde chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT: 2015PA11T009. tel-01726933

HAL Id: tel-01726933

<https://theses.hal.science/tel-01726933>

Submitted on 8 Mar 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE 419 :BIOSIGNE

Laboratoire :
Neurobiologie et Développement

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité :
Neuroscience

par
Pierre-Louis RUFFAULT

**Bases neuronales de la réponse respiratoire au CO₂ :
Dissection génétique du noyau Rétro-trapézoïde chez
la souris**

Date de soutenance : 19/02/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Dr. Gilles FORTIN

Rapporteurs :

Pr. Pascal BRANCHEREAU

Dr. Christian STRAUS

Examineurs :

Pr. Christopher A. DEL NEGRO

Dr. Muriel THOBY-BRISSON

Président du Jury:

Pr. Hervé DANIEL

*« Maman m'a appris que l'argent n'est pas une fin en soi
Que vieillir est obligatoire mais que grandir est un choix »*

Youssoupha

« La vérité dépend de celui qui écoute et peu importe ce qu'on dit le temps révèle tout »

Oxmo Puccino

« La Science est une chose merveilleuse tant qu'il ne faut pas en vivre ! »

Albert Einstein

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. En premier lieu je remercie chaleureusement les rapporteurs, le Pr. Pascal Branchereau et le Dr. Christian Straus, qui ont accepté de consacrer du temps à la lecture attentive de ce manuscrit. Je remercie les examinateurs, le Dr. Muriel Thoby-Brisson et le Pr. Christopher DelNegro pour leurs expertises scientifiques et le vif intérêt qu'ils ont porté à mes travaux. Je tiens enfin à remercier le Pr. Hervé Daniel pour m'avoir suivi durant mes années d'études et avoir accepté de présider ce jury aujourd'hui.

Au cours de ces années au sein du laboratoire, j'ai été amené à rencontrer des personnes d'exception qui m'ont permis d'avancer, d'acquérir les connaissances scientifiques et ont veillé à mon épanouissement professionnel et personnel.

Je tiens à remercier le Dr. Philippe Vernier pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Neurobiologie et Développement de l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard. Je lui suis très reconnaissant pour toute l'aide qu'il m'a apporté, de son soutien indéfectible et de son engagement scientifique. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère amitié. Je lui souhaite de tout cœur une grande réussite pour la réalisation du projet Neuro-PSI qui offrira, j'en suis sûr, une nouvelle structure scientifique à l'environnement particulièrement excitant.

A mes mentors, mes remerciements les plus sincères,

Le Dr. Gilles Fortin qui a assuré ma formation scientifique pendant ces quatre années (et quelques mois) de thèse. Il a su me convaincre de l'importance des approches pluridisciplinaires et m'a appris la rigueur. Malgré les obstacles et les coups durs, il a su rebondir, conserver son enthousiasme et avancer. Je te dois beaucoup et j'admire le scientifique et l'homme que tu es. Merci d'avoir été là et de m'avoir accordé du temps.

Le Dr. Muriel Thoby-Brisson qui m'a initié aux neurosciences expérimentales. Bien que notre collaboration fut brève, j'ai eu un immense plaisir à travailler avec toi durant mon stage de master 2, je te remercie d'être présente aujourd'hui et t'exprime à travers ces quelques lignes le plus profond respect. Merci pour tout.

Le Dr. Jean Champagnat, pour son soutien, sa bonne humeur et ses nombreux conseils. J'ai eu la chance de travailler à tes côtés et je te remercie pour toute l'attention que tu as portée à mes travaux ainsi que pour nos nombreuses discussions passionnantes.

Aux autres chercheurs et ex-membres de l'équipe que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de ces nombreuses années : Dr. J-F Brunet et Goridis, Dr. Marie-Pierre Morin-Surun, Monique Denavit-Saubié, John Hayes, Christopher DelNegro, Jack Feldman et enfin Valérie Mezières. Ce fut un énorme plaisir de vous côtoyer. Je vous remercie d'avoir partagé vos expériences et précieux conseils.

A toi, Sandra, pour avoir été ma camarade de bureau. Tu as accepté de me faire une petite place sur le bureau (grâce à un sens du ménage et du tri peu commun) et une grande place dans ta vie. Tu m'as accordé un soutien moral (oui, oui c'est important) et financier (c'est de ma faute si j'ai jamais de liquide sur moi ?) non négligeable. Merci pour toutes ces discussions (sérieuses ou pas), ces moments de confidences, ces faux et usage de faux pour aller manger à la cantine, ces moments culinaires, toutes «ses quorections de phautes d'ortografe» sans oublier le «vendredi blagues pourries» et autres délires passagers. Je suis heureux de t'avoir rencontré et suis fier de te considérer comme une amie.

Aux «petites nouvelles» du labo, Laure et Séverine. Je vous remercie pour vos conseils/relectures/bonne humeur. Bien que nous ne nous soyons pas beaucoup côtoyé (en même temps, vous n'aviez qu'à arriver plus tôt) j'espère que vous vous plairez au labo et que vous pourrez vous y épanouir pleinement.

A Julien qui m'a à maintes reprises promulgué de précieux conseils. Ton exigence et tes qualités scientifiques me font dire que Gilles t'a bien formé. J'ai apprécié ces commentaires parfois cinglants mais toujours justifiés. Merci pour les bons moments passés en ta compagnie (thèse, Washington) et je compte sur toi pour tout casser. Avec des personnes de ta trempe, je pense que notre recherche gauloise a encore quelques belles années devant elle.

To Jinjin, thank you for your friendship. We spent a lot of good time and I'm sure that you will make a wonderful work. Have fun and enjoy.

A Valérie, sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible.

C'est à l'enseignement et aux encouragements de l'ensemble de l'équipe du Master Neurosciences et Signalisation cellulaire que je dois d'avoir fait mes débuts en Neurosciences.

Une partie de cette équipe m'a fait l'honneur d'être présente aujourd'hui et de juger ce travail de thèse. Je t'en remercie chaleureusement. Ce fut une joie de travailler pour puis avec vous. Heather, Michaela, Laurence, Sylvie, nous vous devons beaucoup et je tenais ici à vous remercier de vos engagements et d'avoir toujours su garder le moral même dans les moments les plus noirs. Ce fut un véritable plaisir que d'encadrer tous ces étudiants avec vous et je vous remercie pour tout le temps que vous nous (et leur) avez consacré.

A tous mes amis et ceux dont j'ai pu croiser la route : Steeve, Amel, Kevin, Quentin, Anne-Clémence, Amina, Alex et Alexandra, Yannick, Romain, Marianne, Gus, Pierre, Faredin, Abisheck, Elodie, Anne, Marie, Cécile, Brigitte et Jean-Claude, Maud, Yoann, Nicolas, Coralie, Fred, Sophie, et Serge, Valérie et les autres ! . Merci pour tous ces moments passés à vos côtés. Les souvenirs ne manquent pas (sorties, week-end, cours, monitorats, douches au ringer, plage...). Je vous remercie d'avoir toujours répondu présents et d'avoir fait de cette expérience une aventure collective. Une énorme pensée à Pauline, je ne te dirais pas que la fin est proche (soyons sérieux !) mais je sais que tu vas y arriver. Tu es brillante, ne t'oublie jamais.

A te principessa. Sei stata la luce alla fine del tunnel e la più bella ragione di restare saldo. Spero che tu possa andare alla fine dei tuoi sogni, come ho avuto la fortuna di fare standoti accanto. Sei meravigliosa e sono fiero di te. Ti voglio tanto bene. Bacino grande. Tuo

A mes parents, je profite de ces quelques lignes pour m'excuser de ne pas avoir été plus présent, j'aurais tellement voulu faire plus. Je vous remercie pour toute la bienveillance dont vous avez fait preuve et le soutien que vous m'avez apporté. J'ai aussi fait un peu pour vous. J'espère que vous êtes fiers. A mes frères, je sais ne pas toujours avoir été parfait mais d'un côté tant mieux, nous aurons toute la vie pour rattraper cela. A mes neveux et nièce, je vous embrasse affectueusement. A mes belles sœurs, merci d'avoir été là. Au oncles/tantes/cousins/cousines gros poutoux. Prenez soin de vous et soyez heureux.

A Christine

Table des matières

<i>Résumé</i>	1
<i>Avant-Propos</i>	3
<i>Liste des Figures</i>	9
<i>Abréviations</i>	11
INTRODUCTION	13
I. Le réseau neuronal respiratoire	15
1. <i>La respiration, un comportement robuste, inné, capable de s'adapter rapidement</i>	15
2. <i>Le réseau neuronal respiratoire</i>	16
2.1 - Les neurones respiratoires	16
2.1.1 - <i>Etude et classification</i>	16
2.1.2 - <i>Fonction des neurones respiratoires</i>	17
3. <i>Les groupes respiratoires</i>	19
3.1- Les régions respiratoires pontiques	19
3.1.1- <i>Le groupe respiratoire pontique</i>	19
3.1.2 - <i>Le groupe A5</i>	19
3.2 - Les régions bulbaires	20
3.2.1 - <i>Le groupe respiratoire dorsal (DRG) et les afférences sensorielles</i>	20
3.2.2 - <i>Le groupe respiratoire ventral</i>	21
3.3 - <i>Problèmes posés par l'organisation neuronale dans les centres respiratoires</i>	22
4. <i>Le générateur central de rythme respiratoire</i>	23
4.1 - <i>L'oscillateur respiratoire du complexe pré-Bötzinger</i>	23
4.2 - <i>Groupe respiratoire para-facial et noyau rétro-trapézoïde</i>	26
4.2.1 <i>ó Découverte</i>	26
4.2.2 - <i>Le pFRG est composé de neurones pré-Inspiratoire couplés au preBötC</i>	27
II Chémoception centrale au CO₂	32
1. <i>Principes de régulation ventilatoire</i>	32
2. <i>Chémoception centrale</i>	33
3. <i>La chémoception centrale par les neurones sérotoninergiques</i>	36
3.1 - <i>Les neurones sérotoninergiques sont intrinsèquement chémosensibles</i>	37
3.2 - <i>Les neurones sérotoninergiques sont connectés au CPG respiratoire</i>	39
3.2.1 - <i>Evidences anatomiques</i>	39
3.2.2 - <i>Evidences fonctionnelles</i>	39
3.3 - <i>Critique et modèle actuel</i>	41
4. <i>Chémoception centrale par les neurones du RTN</i>	42

4.1 - Les neurones du RTN possèdent des propriétés chémosensibles	42
4.2 - Mécanismes moléculaires	43
4.3 - Implication des canaux TASK2 dans la chémosensibilité des neurones du RTN	44
4.4 - Autres mécanismes moléculaires sous-tendant la chémoception intrinsèque au CO ₂	45
4.5 - Chémoception du RTN et mécanismes paracrines impliquant les astrocytes	47
5. <i>RTN et pathologies respiratoires</i>	49
5.1- Etude du syndrome d' Ondine	49
5.2- Le facteur de transcription Phox2b, un déterminant du système nerveux autonome	51
5.3- Phox2b et fonction respiratoire	53
5.4- Phénotype des mutants Phox2b	54
5.5- Le CCHS est provoqué par une mutation au locus PHOX2B	55
III. Développement du tronc cérébral	56
1. <i>Régionalisation dorso-ventrale</i>	56
2. <i>Régionalisation antéro-postérieure</i>	58
2.1- Gènes Hox	59
2.2- Krox20	60
2.3 - Données fonctionnelles des mutants Krox20 et Hoxa1	61
2.4- Percées conceptuelles et scientifiques	63
3. <i>Ontogénèse des oscillateurs centraux</i>	64
3.1- Ontogénèse du preBötC	64
3.2 - Ontogénèse du pFRG/RTN	66
3.2 - Propriétés fonctionnelles de l'e-pF	67
3.3 - Couplage fonctionnel des oscillateurs e-pF et preBötC chez l'embryon	68
3.4 - e-pF / pFRG / RTN trois stades de développement d'une même structure	69
IV. Rôle du RTN dans la chémoception centrale : approches de génétique conditionnelle chez l'embryon	72
1. <i>Etude des effets d'une perte de fonction du gène Phox2b au sein des progéniteurs neuronaux</i>	72
2. <i>La co-expression des facteurs de transcription Phox2b et Atoh1 comme outil de ciblage du RTN</i>	75
2.1 - Atoh1, un facteur de transcription impliqué dans les processus neurogéniques, prolifératifs et la spécification des neurones du SCN et SNP	75
2.1.1- Action périphérique	75
2.1.2- Action centrale	75
2.2 - Atoh1 est exprimé de novo par les neurones du RTN	76
3. <i>Problématique du travail de thèse</i>	78
MATÉRIELS & MÉTHODES	79
I. Présentation des lignées murines	81
1. <i>Généralités</i>	81

2. Les lignées de souris Knock-Out/Knock-In.....	83
2.1- Lignée Vglut2::ChR2-YFP	83
2.2- Lignée Dbx1 ^{LacZ}	84
3. Les lignées conditionnelles.....	85
3.1- Le système Cre/lox.....	86
3.2- Les lignées Cre.....	88
3.2.1- Lignée Atoh1CreERT2	88
3.2.2- Lignée Atoh1 ^{ΔFRT:Cre}	89
3.2.3- Lignée Phox2b::CreBAC1.....	90
3.2.4- Lignée double conditionnelle Atoh1 ^{FRTCre} ;Phox2b::FLPo	90
3.2.4- Lignée Dbx1::Cre.....	91
3.3. Les lignées floxées.....	91
3.3.1- Lignée Atoh1 ^{lox/lox}	91
3.3.2- Lignée Dbx1 ^{DTA}	93
3.3.3- Lignée Phox2b ^{27AlaCKI}	93
3.3.4- Lignée Phox2b ^{lox/lox}	94
3.3.5- Lignée R26 ^{Tdtomato-lox/lox}	94
3.3.6- Lignées Ai32 ^{ChR2-lox/lox} et Ai35 ^{Arch-lox/lox}	94
4. Génotypage des animaux	95
II. Investigations anatomiques.....	97
1. Prélèvement des embryons et préparation des troncs cérébraux.....	97
2. Enregistrement des activités neuronales.....	98
2.1- Approches par imagerie calcique	98
2.2- Approches électrophysiologiques	99
2.2.1- Enregistrement des nerfs	100
2.2.2- Enregistrement des populations neuronales	100
2.2.3 Enregistrement de cellule unitaire	100
3. Expériences de sections	101
III. Investigations anatomiques	101
3.1- Préparation des tissus.....	102
3.2- Protocole d'immunomarquage.....	102
3.3- Protocole de marquage par hybridation <i>in situ</i>	105
IV. Investigation fonctionnelle <i>in vivo</i>	106
4.1- Enregistrement des nouveau-nés.....	106
4.2- Enregistrement des animaux adultes.....	107
RÉSULTATS.....	109
Publication 1: Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditionnal Phox2b mutants.....	111
Publication 2: The retrotrapezoid nucleus is essential for the respiratory response to CO₂	123

Publication 3: A new Lbx1 mutation disturbs RTN development and abrogate CO₂ chemosensitivity	167
---	------------

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 181

Discussion 183

1. *Le RTN, acteur central du chémoréflexe au CO₂* 184
2. *Ruptures scientifiques* 188
 - 2.1- *Rupture avec l'étude de Huang et al. 2012.....* 188
 - 2.2- *Rupture avec un dogme de la physiologie respiratoire* 189
3. *Perte du chémoréflexe : compensation et récupération.....* 190
4. *Le periV : un homologue segmentaire, non-chémoceptif (?), requis pour la survie ?* 192
5. *Pathologies respiratoires et traitements.....* 194

Perspectives 197

1. *La souris Atoh1FRTcre ;Phox2b::FLPo un nouvel outil pour des questions en suspens* 197
2. *Place du RTN dans le chémoréflexe* 197
3. *Caractérisation du rôle du periV.....* 198

Conclusions..... 199

BIBLIOGRAPHIE 201

Résumé

Le maintien de la PCO₂ et du pH du sang artériel est vital. Le principal mécanisme de cette régulation, chez les mammifères, est le chémoréflexe respiratoire central au CO₂, une hyperventilation en réponse à l'hypercapnie, dont les bases neurales sont l'enjeu d'un débat persistant. Notre travail s'intéresse aux rôles supposés d'un groupe d'interneurones du niveau facial du tronc cérébral, le « noyau rétrotrapezoïde », dans le chémoréflexe au CO₂ et l'accélération du rythme respiratoire autour de la naissance. Notre approche est inspirée par la symptomatologie respiratoire du syndrome d'Ondine ou CCHS (apnées et abrogation du chémoréflexe) et son gène causal, codant le facteur de transcription Phox2b, exprimé par les neurones du RTN. Nous avons disséqué le rôle du RTN dans le chémoréflexe central en étudiant les propriétés anatomiques et fonctionnelles *in vitro* chez l'embryon, et *in vivo* chez l'animal postnatal, de modèles murins - perte et gain de fonction ciblant le RTN de la manière la plus sélective possible par génétique intersectionnelle. Ces modèles sont basés (i) sur l'historique d'expression des facteurs de transcription Phox2b, Lbx1, Atoh1 spécifiant les neurones du RTN au cours du développement et (ii) sur la transposition, chez la souris, de mutations humaines, *Phox2b*^{27Ala/+} et *Lbx1*^{fs/fs} affectant ces facteurs, et qui sont respectivement, diagnostique, et proposée comme tel, du CCHS. L'ensemble des mutants étudiés récapitulent chez la souris, des traits phénotypiques exclusifs chez l'embryon et à la naissance: l'abrogation anatomique du RTN, le ralentissement du rythme respiratoire et la perte complète du chémoréflexe. Nos travaux montrent donc que le RTN est un composant obligatoire du circuit chémoréflexe. Nous montrons de plus, que le chémoréflexe n'est pas requis pour la survie des souriceaux à la naissance, cette dernière pourrait être liée au déficit conjoint d'une autre structure de même identité que le RTN, son homologue segmentaire au niveau trigéminal du tronc cérébral: le groupe péri-trigéminal.

Summary: The maintenance of PCO₂ and pH in arterial blood is vital. The principal mechanism through which this is achieved in mammals is the respiratory chemoreflex, a hyperventilation response to hypercapnia, whose circuitry is still elusive and the matter of a persistent debate. Our work deals with the putative roles of a group of interneurons at facial level of the brainstem, the *retrotrapezoid nucleus*, in the CO₂ chemoreflex and in the acceleration of breathing around birth. Our approach is inspired by the respiratory symptoms of Ondine's curse or CCHS (apneas and abrogation of the chemoreflex) and its causal gene, encoding the transcription factor Phox2b, expressed in RTN neurons. We have dissected the role of the RTN by studying the anatomical and functional properties *in vitro* in embryos and *in vivo* at birth and postnatally, of gain and loss of function mutant mouse models, as selective as possible towards the RTN through intersectional strategies. Our models are based (i) on the history of expression of the transcription factors Phox2b, Lbx1, Atoh1 that specify RTN neurons during development and (ii) on the transfer into the mouse of the human mutations *Phox2b*^{27Ala/+} and *Lbx1*^{fs/fs} that target these factors and are respectively diagnostic and candidate diagnostic for CCHS. Compoundly, the mutants recapitulate exclusive phenotypic traits in the embryo and at birth: anatomical abrogation of the RTN, a slowed down respiratory rhythm and the complete loss of chemoreflex. Our work demonstrates that the RTN is an obligatory component of the chemoreflex circuit. Furthermore, we show that the chemoreflex is not required for survival at birth and that the latter may be put at risk by the joint deficiency of another structure sharing the same molecular identity with the RTN, in fact its segmental homologue at trigeminal level of the brainstem: the peri-trigeminal group.

Avant-Propos

Les travaux réalisés dans cette thèse ont pour but de préciser les bases neurales de la chémoréception centrale qui ajuste de façon réflexe la ventilation à la pression partielle de CO₂ dans le sang artériel.

La ventilation pulmonaire est une activité motrice rythmique vitale à la naissance. Elle assure les échanges gazeux au niveau des poumons et participe au maintien de l'homéostasie. L'appareil ventilatoire est activé par la contraction rythmique des muscles respiratoires. Le diaphragme, les muscles intercostaux internes, externes et les muscles abdominaux sont les principaux effecteurs de la pompe respiratoire et sont innervés par des motoneurones spinaux. D'autres muscles respiratoires participent à la régulation du débit respiratoire en contrôlant la résistance des voies aériennes supérieures et sont innervés par des motoneurones crâniens.

La commande respiratoire est contrôlée par un générateur central de rythme ou *central pattern generator* (CPG) localisé dans le tronc cérébral qui maintient son activité en l'absence d'entrée sensorielle périphérique. Au sein du CPG, les neurones responsables de la genèse du rythme proprement dite, l'horloge respiratoire, semblent reposer sur deux réseaux oscillateurs distincts mais couplés fonctionnellement : le complexe pré-Bötzinger (preBötC) au voisinage du noyau ambigu et des neurones dit *parafaciaux* localisés ventralement au noyau moteur facial. Le réseau respiratoire comporte aussi de nombreux systèmes de contrôle périphériques et centraux qui ajustent continuellement la commande respiratoire aux différentes situations comportementales ou environnementales.

L'anatomie et la physiologie des circuits neuronaux de la respiration sont encore très mal comprises, comparativement à celles de la moelle épinière, du cortex ou du cervelet par exemple. Les raisons de ce retard sont multiples. Tout d'abord, la taille et la position du bulbe le rendent difficilement accessible, pour le moment, à l'imagerie fonctionnelle chez l'homme. Ensuite, même chez l'animal, le bulbe est une sorte de *terra incognita*, sa prépondérante partie « ventro-latérale » encore souvent appelée « formation réticulée », suggérant une organisation confuse et camouflant le flou de nos connaissances sur une extraordinaire variété de types neuronaux (la plus grande par volume de substance grise de tout le système nerveux) et de circuits. Même les entités les mieux connues, comme le principal oscillateur de la respiration, le complexe pré-Bötzinger n'en sont qu'au début d'une définition cellulaire. Cette

situation est en train de changer grâce à de nouveaux outils génétiques (permettant de manipuler l'expression de gènes dans des neurones pré-définis) et de nouvelles préparations électrophysiologiques (permettant d'analyser les comportements respiratoires *ex-vivo* à des âges périnataux).

Des travaux dans notre laboratoire ont, depuis quelques années, imposé le réseau central respiratoire comme un modèle pour l'étude de l'émergence des réseaux neuronaux au cours du développement. Actif chez l'embryon à deux tiers de la gestation, il est un des premiers réseaux générant une activité rythmique organisée permettant de lier les acteurs moléculaires des régulations développementales à l'apparition de populations neuronales fonctionnellement identifiées et à leur contribution dans son fonctionnement intégré. Dans ce contexte, ce travail vise à élucider le rôle d'une population d'interneurones bulbaires, dont la pertinence dans la genèse du rythme respiratoire et le chémoréflexe chez la souris nouveau-née, ainsi que dans le syndrome d'Ondine, est rendue probable par nos travaux antérieurs et semble possible dans de nombreuses autres maladies.

La structure ciblée est un groupe d'interneurones bulbaires, le « noyau rétrotrapezoïde » (ou Retro-Trapezoid Nucleus (RTN) en anglais, cette nomenclature sera employée dans la suite de ce manuscrit), impliqué dans le chémoréflexe et l'accélération du rythme respiratoire autour de la naissance. Le RTN a émergé comme candidat pour ces deux rôles grâce à de nombreux travaux récents, dont les nôtres, inspirés par la symptomatologie respiratoire du syndrome d'Ondine (apnées et abrogation du chémoréflexe) et son gène causal, le facteur de transcription *Phox2b*, exprimé dans le RTN. Une confirmation de l'implication du RTN dans le chémoréflexe en ferait également une cible thérapeutique de choix dans les désordres respiratoires liés au sommeil. Cependant, les propriétés exactes du RTN sont encore controversées. Notamment, si plusieurs lésions génétiques chez la souris (étudiées par notre laboratoire) tendent toutes à confirmer ses rôles supposés, aucune n'est spécifique de ce noyau. Ainsi elles ne peuvent exclure des théories dites de « chémosensibilité distribuée » qui attribuent le chémoréflexe à de nombreux ensembles neuronaux en parallèle. Dans cette thèse, nous cherchons à analyser une nouvelle série de modèles génétiques pour clore le débat sur le RTN et, si ses rôles sont confirmés, légitimer la recherche de moyens de le manipuler chez l'homme dans une visée thérapeutique.

Il y a une dizaine d'années, la cause génétique du syndrome d'Ondine ou Syndrome Congénital d'Hypoventilation Centrale (CCHS en anglais), une dysautonomie complexe

associant, avec des pénétrances variables, le défaut respiratoire qui définit la condition, et maladie de Hirschprung, neuroblastomes, troubles de la déglutition ou de la motricité oculaire intrinsèque, diminution de la variabilité du rythme cardiaque, etc. fut découverte par test de gènes candidats. Parmi ceux-ci, *Phox2b*, un déterminant attiré de la majorité des neurones du système nerveux autonome (SNA). Des mutations *de novo* dominantes dans *PHOX2B* (expansions d'une série d'alanines ou délétions) se sont avérées expliquer la quasi-totalité des cas d' Ondine. Parmi les sites d'expression de *Phox2b* connus à cette époque figuraient de nombreux neurones impliqués dans la respiration (glomus carotidien qui mesure l'oxygène et le CO₂ sanguin, noyau du tractus solitaire qui relaie plusieurs modalités sensorielles vers l'oscillateur respiratoire, centres noradrénergiques, modulateurs du rythme), dont aucun cependant n'expliquait les symptômes cardinaux du CCHS. Pour chercher les lésions neuronales expliquant le déficit respiratoire, mon laboratoire a collaboré avec celui de Jean-François Brunet à l'ENS qui avait initialement introduit, par knock-in chez la souris, la mutation la plus fréquente du syndrome humain (allèle *Phox2b*^{27Ala}, un allongement par 7 résidus d'une série de 20 alanines). Leurs premiers travaux avaient montré que la descendance des chimères de ce knock-in est dépourvue de chémoréflexe et meurt à la naissance par irrégularité du rythme respiratoire, fournissant donc une excellente phénocopie de la mutation humaine. Sur le plan histologique, avait été diagnostiquée l'atrophie d'un petit groupe de neurones *Phox2b*⁺ sous le noyau moteur du nerf facial, le noyau rétrotrapézoïde (RTN), objet depuis quelques années de travaux physiologiques sur le réflexe chémosensible.

Ainsi, ces travaux génétiques et d'autres, physiologiques, attribuaient au RTN plusieurs rôles clefs dans le contrôle respiratoire, d'une pertinence médicale certaine pour le CCHS et probablement au-delà : ces neurones perçoivent le CO₂ *in vivo*, et peuvent accélérer le rythme respiratoire, également *in vivo*, ce qui les met dans une position idéale pour relancer la respiration au cours des apnées centrales. Cette propriété pourrait être au cœur de tous les troubles respiratoires du sommeil. De plus, le RTN est rythmique à la naissance et probablement rythmogénique au sens où il augmente le rythme spontané du principal oscillateur respiratoire, le preBötC. Cette seconde propriété pourrait être pertinente pour les apnées du prématuré. Cependant, malgré ce corpus de données physiologiques et nos propres travaux, des preuves définitives des rôles du RTN manquaient, faute de délétions spécifiques. Le enjeu d'attribuer ou non au RTN les propriétés de chémosensibilité et de rythmogénèse, et particulièrement un rôle essentiel dans le chémoréflexe, est crucial : une confirmation

éliminerait les nombreux autres sites candidats qui sont encore explorés par la communauté comme siège de chémosensibilité et légitimerait une focalisation de la recherche thérapeutique sur ce groupe de neurones.

Objectifs de la thèse

Nous avons utilisé de nouveaux outils pour altérer génétiquement les neurones du RTN avec plus de sélectivité que la mutation *Phox2b*^{27Ala} (qui affecte potentiellement tous les neurones *Phox2b*⁺).

Notre première étude a exploité le fait que les neurones du RTN expriment transitoirement deux autres facteurs de transcription : *Lbx1* et *Krox20*, pour produire plusieurs mutants chez lesquels une mutation nulle de *Phox2b* ou une mutation 27Ala (*Phox2b*^{27AlaCKI}) est, non plus constitutive, mais déclenchée par une recombinaise Cre sous le contrôle des promoteurs de *Krox20* ou *Lbx1*. En combinant ces deux critères moléculaires et une mutation de *Phox2b* et une historique d'expression de *Krox20* ou de *Lbx1* les mutations ciblent des sous-ensembles de neurones *Phox2b*⁺ différents, mais incluant tous le RTN (Publication 1 - Journal of Neuroscience 2011).

Notre seconde étude a exploité l'expression par le RTN d'un quatrième facteur de transcription : *Atoh1* dont la co-expression avec *Phox2b* caractérise le mieux les cellules du RTN, pour produire des mutants *Atoh1* nuls constitutifs ou conditionnels à l'expression d'une *Phox2b::Cre*, des mutants *Phox2b* nuls conditionnels à l'expression d'une *Atoh1::Cre* ainsi qu'une lignée double conditionnelle *Atoh1*^{FRTCre}; *Phox2b::FLPo* dans laquelle l'expression de la Cre recombinaise sous le contrôle de *Atoh1* est assujétie à l'excision d'un Stop par une flip recombinaise sous le contrôle de *Phox2b* donnant accès aux seules cellules ayant une double histoire d'expression de *Atoh1* et de *Phox2b*. Cette combinaison est de loin la plus spécifique: la co-expression de *Atoh1* et *Phox2b* est spécifique du RTN et seulement d'une autre petite population de neurones autour du noyau moteur du trijumeau (Publication 2 - eLife en révision).

Notre troisième étude encore en cours, a examiné une autre mutation humaine diagnostique du CCHS: une mutation frameshift dans le gène *Lbx1* introduite chez la souris par le laboratoire berlinois de Carmen Birchmeier (Publication 3 en préparation).

Ces fonds génétique, nous ont permis de marquer, de pratiquer des enregistrements électrophysiologiques ou optiques, d'invalider, d'activer par photostimulation (optogénétique), de mettre au silence (par invalidation du transporteur vésiculaire du glutamate) les neurones du RTN pour en préciser les rôles fonctionnels et le développement anatomique à différents stades de développement correspondant à divers états de maturation du réseau central respiratoire: *in vitro* à E14.5 date d'apparition du RTN et à E16.5 lorsque celui-ci est à même d'entraîner de façon chémo-dépendante le rythme respiratoire, *in vivo*, à la naissance et à différents stades post-nataux, lorsque le chémoréflexe est fonctionnel.

L'ensemble de nos résultats démontre que le RTN est un composant obligatoire du circuit chémoréflexe.

Liste des Figures

Figure 1 : Enregistrement simultané d'un neurone inspiratoire et de l'activité de décharge du nerf phrénique chez le chat *in-vivo*

Figure 2 : Classification des six types de neurones bulbares respiratoires définis d'après leur phase d'activité au cours du cycle respiratoire *in vivo*

Figure 3 : Représentation schématique des groupes respiratoires et de leurs interactions au sein du tronc cérébral

Figure 4 : Le preBötC est à l'origine du rythme respiratoire

Figure 5 : Le RTN : un réseau neuronal pré-inspiratoire fonctionnellement couplé au preBötC

Figure 6 : Mise en évidence du RTN par l'expérience de « Quantal Slowing »

Figure 7 : Les neurones sérotoninergiques du Raphé Obscurus présentent des propriétés de chémosensibilité intrinsèque

Figure 8 : Les neurones sérotoninergiques ont un rôle modulateur sur l'activité respiratoire

Figure 9 : Implication des canaux TASK-2 dans le mécanisme de chémosensibilité intrinsèque des neurones du RTN

Figure 10 : Les astrocytes participent au contrôle du comportement respiratoire par une libération d'ATP dépendante du pH

Figure 11 : Diversité génétique des neurones du tronc cérébral

Figure 12 : Le RTN dérive de progéniteurs neuronaux issus des territoires rhombomériques 3/5

Figure 13 : Les neurones du preBötC dérivent de progéniteurs issus du domaine V0_v

Figure 14 : Mise en place fonctionnelle du RTN au cours de l'embryogénèse

Figure 15 : Principes fonctionnels sous-tendant l'activité rythmique du RTN

Figure 16 : Le couplage fonctionnel entre RTN et preBötC s'effectue au cours des phases précoces de l'embryogénèse

Figure 17 : Caractérisation développementale des neurones du RTN : implication de *Phox2b* dans la mise en place anatomo-fonctionnelle de l'oscillateur

Figure 18 : La combinaison d'expression de *Phox2b* et *Atoh1* peut être utilisée comme marqueur anatomique spécifique du RTN

Figure 19 : Principe de mutagenèse conditionnelle utilisant le système Cre/lox

Figure 20 : Ciblage génétique des neurones du RTN grâce à l'utilisation de la lignée double conditionnelle *Atoh1^{FRTCre};Phox2b::FLPo*

Figure 21 : Représentation schématique de la construction conditionnelle *Phox2b27^{AlaCKI}*

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes

Tableau 2 : Liste des principaux anticorps primaires utilisés

Tableau 3 : Liste des principaux anticorps secondaires utilisés

Abréviations

5HT : Sérotonine

AAV : Adéno Associated Virus

ADN: acide désoxyribonucléique

AP5 : (2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid; (2*R*)-amino-5-phosphonopentanoate

ARNm : acide ribonucléique messenger

AtEAM : motif de liaison à l'ADN du facteur de transcription Atoh1

BötC : Complexe Bötzinger

CCHS : abréviation anglaise de « Syndrome Congénital d'Hypoventilation Central »

ChAT : Choline Acétyl Transférase

ChR2 : Channel Rhodopsine 2

CNO : Clozapine-Z-Oxide

CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPG : Central Pattern Generator (an) ou Générateur Centrale de Rythme (fr)

CSAS : Syndrome Central d'Apnée du Sommeil

dA1¹ dA4 : neurones dorsaux de Classe A

DAMGO : [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin

dB1¹ dB4 : neurones dorsaux de Classe B

DIG : Digoxygénine

DREADD : Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs

DRG : Dorsal Respiratory Group (an) ou Groupe Respiratoire Dorsal (fr)

EA : Phase d'Expiration Active

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

e-pF : abréviation anglaise de « groupe respiratoire para-Facial embryonnaire »

GABA : Acide γ -AminoButirique

GFP : Green Fluorescent Protein

GDNF : Glial Derived Neurotrophic Factor

HIS. : Hybridation *In Situ*

MNv : Motoneurones ventraux

NBT : 4-nitrobleu tetrazolium chloride

NKR1 : Récepteur à la Neurokinine 1

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

PFA : Paraformaldéhyde

pFRG : groupe respiratoire para-Facial

pO₂/pCO₂ : pression partielle sanguine d'O₂/CO₂

preBötC : Complexe pre-Bötzinger

PRG : Groupe Respiratoire Pontique

r7 : territoire rhombomérique 7

RO : Raphé Obscurus

RRG : Respiratory Rhythm Generator (an) ou Générateur de Rythme Respiratoire (fr)

RTN : Retro-Trapezoide Nucleus (an) ou Noyau Rétro-Trapézoide (fr)

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SNA : Système Nerveux Autonome

SNP : Système Nerveux Principal

Sub-P : Substance P

TH : Tyrosine Hydroxidase

TS : Tractus Solitaire

TTX : Tétrodotoxine

Vglut2 : transporteur vésiculaire du glutamate de type 2

VRG : Ventral Respiratory Group (an) ou Groupe Respiratoire Ventral (fr)

INTRODUCTION

I. Le réseau neuronal respiratoire

1. La respiration, un comportement robuste, inné, capable de s'adapter rapidement

Nous respirons en toutes circonstances et, le plus souvent, de manière inconsciente. Ce comportement rythmique vital, régulier et spontané assure en interaction avec le système cardiovasculaire un apport continu en oxygène (O₂) aux cellules de l'organisme et l'évacuation du dioxyde de carbone (CO₂) produit par le métabolisme cellulaire. Cette fonction repose sur la présence au sein du cerveau d'une horloge respiratoire composée de petits contingents de neurones, spontanément actifs, capables de déclencher de manière rythmique et alternée les cycles inspiratoires et expiratoires.

Les réseaux de neurones sous-tendant l'activité respiratoire doivent être actifs dès la naissance afin de répondre efficacement aux variations de pression partielle en O₂ (PaO₂), de CO₂ (PaCO₂) et de pH. Ce comportement est mis en place chez le fœtus. Bien que les échanges gazeux soient assurés par la circulation placentaire, des mouvements respiratoires sont présents chez le fœtus de nombreuses espèces de mammifères (*Pronin et al., 1966 ; Merlet et al., 1970*) et sont essentiels au développement des différents muscles et organes respiratoires, en particulier, le poumon (*Milles et al., 1950*). Lors de la parturition, la section du cordon ombilical provoque un effondrement rapide de la PaO₂ et une augmentation de la PaCO₂ provoquant une importante baisse du pH sanguin (voir équation 1). L'arrivée de ces stimuli en provenance des chémorécepteurs centraux et périphériques active fortement le système respiratoire central et provoque les premières inspirations de forte amplitude permettant notamment de vaincre les facteurs de résistance et de vider les alvéoles pulmonaires du liquide qu'elles contiennent et d'établir la capacité pulmonaire résiduelle (*Poets et al., 1997 ; Ramanathan R., 2008*). Rapidement, le nouveau-né adopte des mouvements respiratoires réguliers afin d'assurer une ventilation pulmonaire efficace.



Equation 1: Régulation du pH Sanguin par le système bicarbonate.

Les protons (H⁺) produits lors du métabolisme cellulaire sont captés par les molécules HCO₃⁻ afin d'être éliminés de l'organisme sous forme de CO₂. Inversement, toute augmentation de la concentration de CO₂ dans l'environnement (condition d'hypercapnie) provoque une acidification du pH sanguin.

INTRODUCTION

Par la suite cette fonction perdurant tout au long de la vie doit être finement régulée et coordonnée afin de générer des comportements plus complexes tels que la vocalisation, la toux. Lors d'efforts physiques, l'augmentation du métabolisme cellulaire provoque une forte demande en O_2 et la production de nombreux métabolites qu'il est important d'évacuer rapidement grâce à l'augmentation de l'activité ventilatoire. De même, suite à une modification du milieu extérieur (augmentation de l'altitude induisant des phases hypoxiques, phases d'hypercapnies), seule une modification rapide de la fréquence respiratoire peut permettre à l'organisme de s'adapter efficacement. De fait l'activité du générateur de rythme respiratoire, bien qu'étant autonome, est sous l'influence directe de nombreux autres groupes neuronaux. Celle-ci permet de relayer en continu les informations proprioceptives relatives aux variations de pression partielle en O_2/CO_2 ($PaO_2/PaCO_2$) sanguine en provenance des chémorécepteurs (centraux ou périphériques) ou à l'étirement des poumons (réflexe de Hering-Breuer). Dans ce premier chapitre, je présenterai les travaux ayant permis d'aboutir à la découverte du CPG respiratoire.

2. Le réseau neuronal respiratoire

2.1 - Les neurones respiratoires

2.1.1 - Etude et classification

Les travaux pionniers de Flourens (1851), Lumsden (1923) et Stella (1938) ont permis de mettre en évidence que le tronc cérébral, comprenant le pont et le bulbe rachidien, est le siège de la commande centrale respiratoire. Par la suite, de nombreuses études ont permis de décrire et localiser des groupes de neurones dits respiratoires. Ces neurones sont, à la différence de la plupart des neurones constituant le système nerveux central (SNC), directement identifiables par leur activité qui est corrélée à celle des sorties motrices respiratoires.

Ces identifications ont été réalisées en grande partie *in vivo* sur des animaux anesthésiés ou décérébrés, paralysés, vagotomisés et ventilés artificiellement. L'enregistrement de l'activité respiratoire au niveau du nerf phrénique innervant le diaphragme permet de révéler un rythme composé de trois phases distinctes. Le début de la phase inspiratoire ou « on-switch » se traduit par une augmentation transitoire de l'activité phrénique en début d'inspiration. Elle se poursuit par une phase d'activité croissante formant

la « rampe inspiratoire » brutalement interrompue par l'«off-switch» qui marque le début de l'expiration. La phase d'«off-switch» est généralement suivie d'une phase d'activité résiduelle du nerf phrénique correspondant à la phase post-inspiratoire puis le nerf devient silencieux pendant la phase expiratoire (*Richter, 1982 ; Bianchi et al, 1995*).

A la suite des travaux princeps réalisés à la fin des années 1930 (*Gessell, Bricker et Magee, 1936*) un grand nombre d'études ont permis de décrire plusieurs types de neurones respiratoires en fonction (i) de la phase privilégiée du cycle pendant laquelle ceux-ci déchargeaient (inspiratoire, post-inspiratoire, expiratoire) et (ii) de leur motif de décharge (croissante, décroissante, transitionnelle). De fait, six classes de neurones ont pu être établies : les neurones pré-inspiratoires (pre-I), les neurones inspiratoires précoces, globaux et tardifs, les neurones post-inspiratoires (post-I) et les neurones expiratoires (**Figure 2**).

2.1.2 - Fonction des neurones respiratoires

Par la suite, la fonction des neurones respiratoires a pu être déduite de leur site de projection axonale. Pour cela des expériences de stimulations électriques anti et orthodromiques ont été réalisées permettant d'isoler trois types cellulaires caractérisés par leur connectivité (*Merrill, 1970 ; Bianchi, 1971*). (i) Les motoneurones bulbaux innervent les muscles lisses des voies aériennes supérieures et sont l'objet d'activation antidromique par stimulations des nerfs vague, glossopharyngien, hypoglosse. (ii) Les interneurones bulbospinaux contiennent les neurones pré-moteurs qui projettent du bulbe vers les groupes de motoneurones spinaux et innervent les muscles respiratoires. Ces interneurones peuvent être activés par des stimulations de la moelle épinière au niveau par exemple des motoneurones phréniques, thoraciques ou abdominaux. Enfin (iii) les neurones respiratoires qui ne présentent pas de réponse antidromique à ces mêmes stimulations et qui sont qualifiés d'interneurones propriobulbaux dont les projections axonales sont confinées au tronc cérébral. Parmi ces derniers, se trouvent les neurones à l'origine du rythme respiratoire.

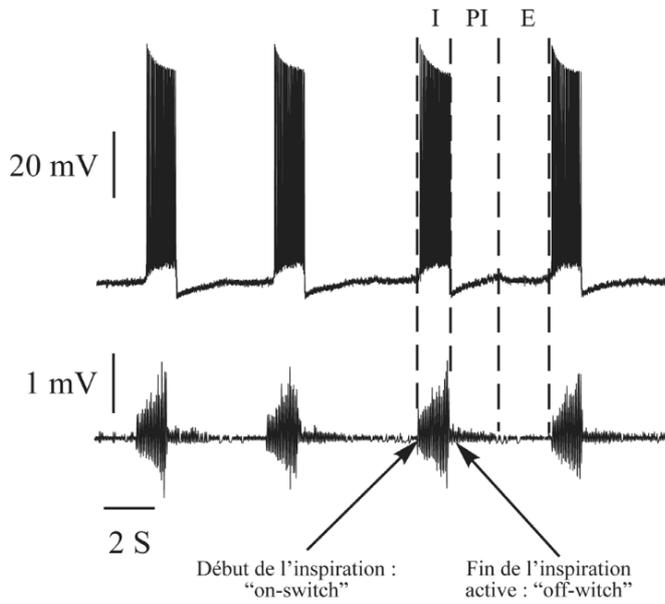


Figure 1 : Enregistrement simultané d'un neurone inspiratoire et de l'activité de décharge du nerf phrénique chez le chat *in vivo*.

La décharge du neurone inspiratoire (tracé du haut) est synchronisée avec celle du nerf phrénique (tracé du bas) qui commande la contraction du diaphragme et génère ainsi la phase inspiratoire (I). Ces enregistrements sont effectués sur un animal anesthésié, vagotomisé, paralysé et ventilé artificiellement. L'activité du nerf phrénique enregistrée ici représente donc une respiration fictive produite par le CPG respiratoire, indépendamment des afférences sensorielles. Le début de l'inspiration est appelé l'« on-switch » et la fin l'« off-switch ». Après inspiration, la décharge du nerf comporte une composante de faible activité formant la post-inspiration (PI) et précédant une phase d'inactivation correspondant à l'expiration (E).

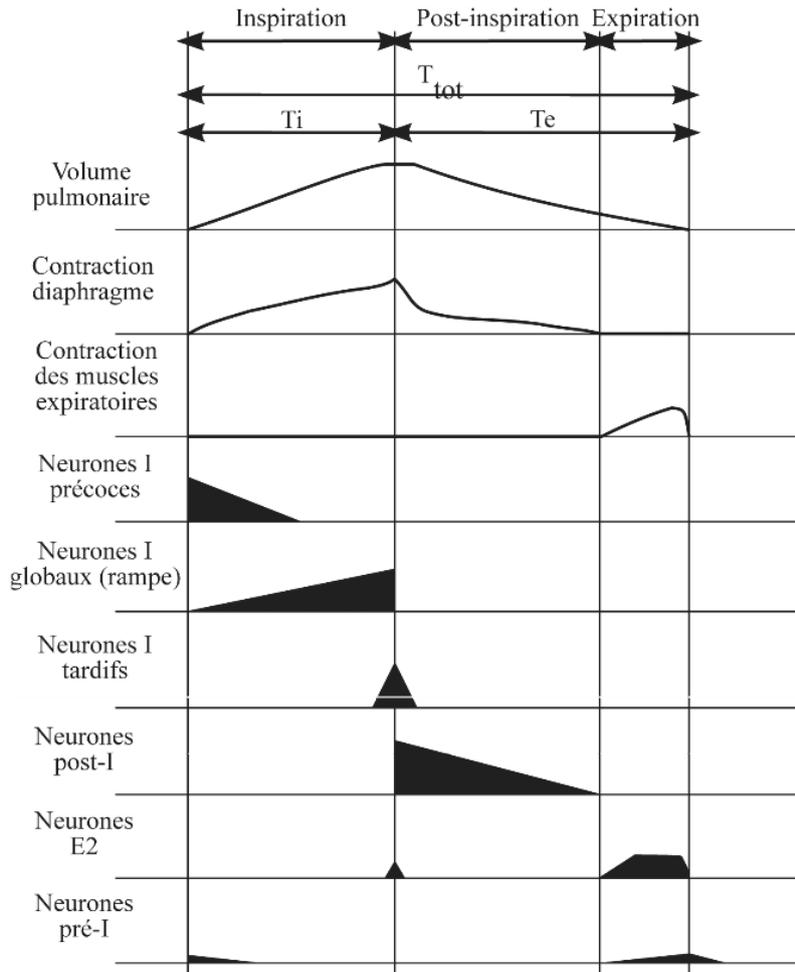


Figure 2 : Classification des six types de neurones bulbaux respiratoires définis selon leur phase d'activité au cours du cycle respiratoire *in vivo*.

Ces différents types de neurones ont été enregistrés chez des animaux non anesthésiés mais décérébrés, paralysés et ventilés artificiellement. Les neurones bulbaux respiratoires sont répartis dans différentes aires du tronc cérébral. Les enregistrements intracellulaires et l'étude pharmacologique des relations synaptiques a permis de montrer l'existence de puissantes inhibitions, par exemple entre les neurones « pré-I » et « I rampe ». Ce sont ces relations d'inhibition ainsi que les propriétés électriques membranaires qui sont requises pour la formation d'un rythme respiratoire chez l'adulte.

3. Les groupes respiratoires

A partir des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro*, il est possible de répartir les différents neurones respiratoires en groupes anatomiques selon leur position au sein du tronc cérébral. Chaque groupe respiratoire se compose de populations hétérogènes de neurones respiratoires. La contribution fonctionnelle de ces groupes a pu être déduite des modifications de l'activité respiratoire engendrée suite à leur lésion au sein du tronc cérébral. Deux types d'arguments devaient, à l'époque, être réunis afin pour démontrer l'implication d'un groupe neuronal dans le contrôle central respiratoire : (i) sa lésion devait entraîner un déficit respiratoire spécifique et (ii) sa stimulation devait induire une modification de l'activité respiratoire basale. Ces travaux ont ainsi permis de poser les bases anatomiques des différents groupes respiratoires et leurs afférences sensorielles et ainsi d'évaluer leurs contributions fonctionnelles dans la genèse et la modulation du rythme respiratoire. Dans cette partie nous nous attacherons à détailler ces principaux groupes respiratoires.

3.1- Les régions respiratoires pontiques

3.1.1- Le groupe respiratoire pontique

Le groupe respiratoire pontique (PRG en anglais, *Feldman, 1986*), comprend les noyaux parabrachiaux médians et du Kölliker-Fuse, composés de neurones déchargeant à une fréquence correspondant aux cycles respiratoires. Il est constitué de neurones inspiratoires, expiratoires et transitionnels. Le PRG reçoit des afférences en provenance du noyau du tractus solitaire (NTS, *Loewy et Burton, 1978*), de l'area postrema et de la surface ventrale du bulbe (*Loewy et al. 1981*) qui sont toutes des structures en relation avec les fonctions viscérales, cardiovasculaires, gustatives et neuroendocrines. Ces afférences peuvent moduler le comportement respiratoire. Les neurones du PRG projettent vers le thalamus et l'hypothalamus et entretiennent des connexions réciproques avec l'amygdale et le noyau paraventriculaire. L'ensemble des expériences fonctionnelles menées jusqu'à aujourd'hui semble montrer que le PRG peut influencer la terminaison des phases inspiratoires et la durée des phases du cycle.

3.1.2 - Le groupe A5

Un second mécanisme contrôlant le rythme respiratoire provient de populations neuronales localisées dans le pont latéral et ventrolatéral. Celui-ci implique les neurones

INTRODUCTION

noradrénergiques A5 (voir **Figure 3**) pouvant exercer une modulation négative sur le rythme respiratoire dans des préparations de tronc cérébral isolé. La stimulation de ces neurones entraîne une diminution de la fréquence respiratoire et devient inefficace en présence d'antagonistes noradrénergiques (*Hilaire et al. 1989*). Réciproquement, l'élimination du pont entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire, des résultats congruent avec ce qui a pu être observé chez les souris *Rnx -/-* présentant une hypoplasie des noyaux noradrénergiques du tronc cérébral (*Shirasawa et al., 2000*). Il a été démontré que ce puissant effet inhibiteur exercé par les neurones noradrénergiques A5 sur la fréquence respiratoire serait médié *via* l'activation des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques (*Hilaire et al., 2004*).

3.2 - Les régions bulbaires

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

Le groupe respiratoire dorsal (« Dorsal Respiratory Group », DRG) est une structure située dorsalement à la partie médiane du bulbe au niveau de l'obex (*Bianchi et al., 1971*). Il est constitué de la partie ventrolatérale du NTS composé de neurones presque exclusivement inspiratoires (*Baumgarten et al., 1958*, *Bianchi et al., 1971*, *Von Euler et al., 1973*). C'est au sein de cette structure que se terminent les afférences en provenance des nerfs vague et glossopharyngien. De fait, ce noyau est largement impliqué dans le contrôle des activités végétatives cardio-vasculaires, respiratoires et digestives ce qui en fait un carrefour pour l'intégration des phénomènes somatiques et végétatifs de nombreuses fonctions physiologiques.

Le NTS reçoit de nombreuses afférences glossopharyngiennes et vagues en provenance des récepteurs broncho-pulmonaires sensibles à l'étirement localisés au niveau des alvéoles pulmonaires. A chaque inspiration, ceux-ci sont stimulés par l'augmentation de la pression alvéolaire, provoquant un arrêt réflexe de l'activité inspiratoire et la transition vers la phase expiratoire (réflexe d'Hering-Breuer). En plus du réflexe d'inflation, l'existence d'un réflexe de déflation pulmonaire initié par les récepteurs à l'étirement et intégré au sein du NTS, a pu être mis en évidence. Ces deux réflexes participent à la stabilisation du rythme respiratoire chez le nouveau-né (*Bystrzycka et al., 1972, 1980*). Notons toutefois que le réflexe de déflation joue un rôle moindre dans le contrôle du comportement respiratoire chez l'homme comparativement aux autres mammifères.

Le NTS intègre les afférences en provenance 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 toux et des récepteurs à l'irritation des voies aériennes dont l'activité entraîne une constriction des voies supérieures et augmente la résistance au passage de l'air. Le NTS reçoit également l'ensemble des afférences dopaminergiques en provenance des chémoccepteurs périphériques (corps carotidiens et corps aortiques) qui détectent les variations de PaO₂ et PaCO₂. Bien qu'il ait été démontré que le chémoréflexe au CO₂ était principalement central, on estime que près de 15% de ce réflexe passe par les corps carotidiens (*Cross et al., 1990*). Ces mécanismes, absents à la naissance (*Pepper et al., 1995*) sont particulièrement importants pour l'établissement de réponses aux stress hypoxiques et hypercapniques efficaces chez l'adulte.

Enfin, en plus des afférences broncho-pulmonaires et chémocceptrices périphériques, le NTS établit de nombreuses connections avec des groupes bulbaires et supérieurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie. Il interagit avec le noyau moteur du dorsal du vague qui contient les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques impliqués dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires et digestives. Il projette également, via le PRG, vers l'hypothalamus, le thalamus et le cortex cérébral (*Ter Horst et al., 1989, Herbert et al., 1990*).

3.2.2 - Le groupe respiratoire ventral

Le groupe respiratoire ventral (« Ventral Respiratory Group », VRG) a été décrit pour la première fois par Bianchi en 1971 chez le chat. Il est composé d'un groupe bilatéral formant une colonne longitudinale dans le bulbe ventrolatéral. Cette colonne est subdivisée en trois régions : caudale (VRGc), intermédiaire (VRGi) et rostrale (VRGr). La région caudale s'étend de l'obex (limite ponto-bulbaire) jusqu'à la limite bulbo-spinale (décussation des pyramides) et comprend le noyau rétro-ambigu (*Merill, 1970*). Elle est composée de neurones expiratoires bulbosпинаux qui projettent vers la moelle épinière (*Bianchi, 1971*). Le VRGi comprend le noyau ambigu contenant les corps cellulaires des motoneurones du noyau moteur ventral des nerfs crâniens glossopharyngien et vague, actifs à la fois lors des phases d'inspiration et d'expiration. Il est également constitué du noyau para-ambigu, constitué des neurones pré-moteurs bulbaires projetant sur les motoneurones spinaux innervant les muscles respiratoires thoraciques. Le VRGi contient aussi des neurones propriobulbaires chargés de coordonner l'activité des muscles gérant la résistance des voies aériennes.

INTRODUCTION

La partie la plus rostrale du VRG (VRGr) est localisée à proximité du noyau rétrofacial (partie antérieure du noyau ambigu). Elle comprend un ensemble dense de motoneurones pharyngés inspiratoires et expiratoires ainsi que des interneurones respiratoires projetant vers le bulbe caudal et la moelle épinière (*Bystrzycka et al., 1980*). Certains d'entre eux sont caractérisés par une décharge expiratoire croissante et forment un groupe appelé le noyau Bötzing (*Feldman, 1986*). Ces neurones projettent également vers le VRGi et VRGc grâce à des collatérales d'axone (*Otake et al. 1987*).

3.3 - Problèmes posés par l'organisation neuronale dans les centres respiratoires

Malgré l'important corpus des descriptions anatomo-fonctionnelles, l'implication des diverses structures dans la mise en forme de la séquence inspiration, post-inspiration, expiration restait dans les années 80 et demeure encore largement une question ouverte. S'agissant du problème de la genèse du rythme en soi, il semblait alors que celle-ci reposait principalement sur des mécanismes d'inhibitions réciproques entre différentes classes de neurones respiratoires et donc était une propriété émergente du réseau. Nous verrons que cette idée est de nouveau mise en avant actuellement même si les inhibitions synaptiques ne sont plus considérées comme requises pour la genèse du rythme. Des avancées significatives ont été réalisées en regard d'influences nouvelles notamment de par les recherches sur les générateurs centraux d'un certain nombre d'espèces d'invertébrés (*Delcomyn., 1980*) et l'avènement des préparations dites *in vitro* isolant des parties de cerveau dans lesquelles l'activité des réseaux neuronaux était maintenue.

La mise en évidence en 1984 du maintien d'une activité spontanée respiratoire dite « fictive » sur des préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière (*Suzue, 1984*) permit d'envisager l'existence d'un générateur central du rythme respiratoire à l'instar de ceux contrôlant des comportements rythmiques stéréotypés chez les invertébrés. Ces préparations ont pour avantage de préserver l'intégrité du tronc cérébral et de la moelle épinière permettant l'enregistrement des bouffées de décharges inspiratoires au niveau de la racine motrice du nerf phrénique C4 et la manipulation de la composition du milieu extracellulaire. Par exemple, l'application d'une solution à pH acide permettait d'accélérer la fréquence spontanée des activités en C4 tandis que l'application de bloquants pharmacologiques respiratoires (D-Alanine ou Somatostatine) mettait sous silence le réseau. Ce travail confirma

l'idée selon laquelle l'ensemble des acteurs cellulaires nécessaires et suffisants à la genèse du rythme étaient présents au sein du tronc cérébral.

Par la suite, de nombreux travaux *in vitro* ont eu pour but de définir de façon aussi précise que possible la localisation et les propriétés fonctionnelles des acteurs cellulaires requis à la genèse du rythme. (*Smith et al., 1991; Onimaru et al., 2003; Morin -Surun et al., 1992; Rekling et al., 1996*).

4. Le générateur central de rythme respiratoire

4.1 - L'oscillateur respiratoire du complexe pré-Bötzinger

L'essor des préparations *in vitro* a permis en quelque sorte de re-visiter la notion de nœud vital respiratoire (*Flourens, 1851*). En procédant à des sections transverses à différents niveaux rostro-caudaux dans le tronc cérébral de rat, Smith et al ont pu identifier au sein du VRG, une tranche transversale de la médulla oblongata suffisante au maintien d'une activité rythmique de type respiratoire enregistrable sur les racines du nerf hypoglosse (**Figure 4**; *Smith et al., 1991*). De fait cette préparation réduite apparaissait contenir l'ensemble des éléments neuronaux, suffisant pour la production du rythme respiratoire. Ces neurones sont en fait confinés au sein d'une structure unique baptisée complexe pré-Bötzinger (preBötC) qui apparaît dès lors comme le générateur central du rythme respiratoire (CPG pour Central Pattern Generator).

Depuis sa découverte, ce CPG a pu être observé chez de nombreux modèles d'études rongeurs (souris, cochon d'Inde), et mammifères (lapin, chèvre) et une localisation anatomique du preBötC humain a été proposée (*Schwarzacher et al., 2011*). Depuis sa découverte de nombreuses expériences visant à léser spécifiquement les neurones du pre-BötC ou à interférer avec leur activité ont conforté son rôle crucial dans la genèse du rythme respiratoire (*Tan et al., 2008; Gray et al., 2001; McKay et al., 2005*). Des travaux *in vitro* suggèrent qu'en plus du rythme de l'apnée, le preBötC soit aussi impliqué directement dans la genèse d'autres formes respiratoires, telles que les soupirs (« augmented breath ») ou l'activité « gasping » de suffocation (*Lieske et al., 2000; Cherniack et al., 1981; Orem and Trotter., 1993*).

INTRODUCTION

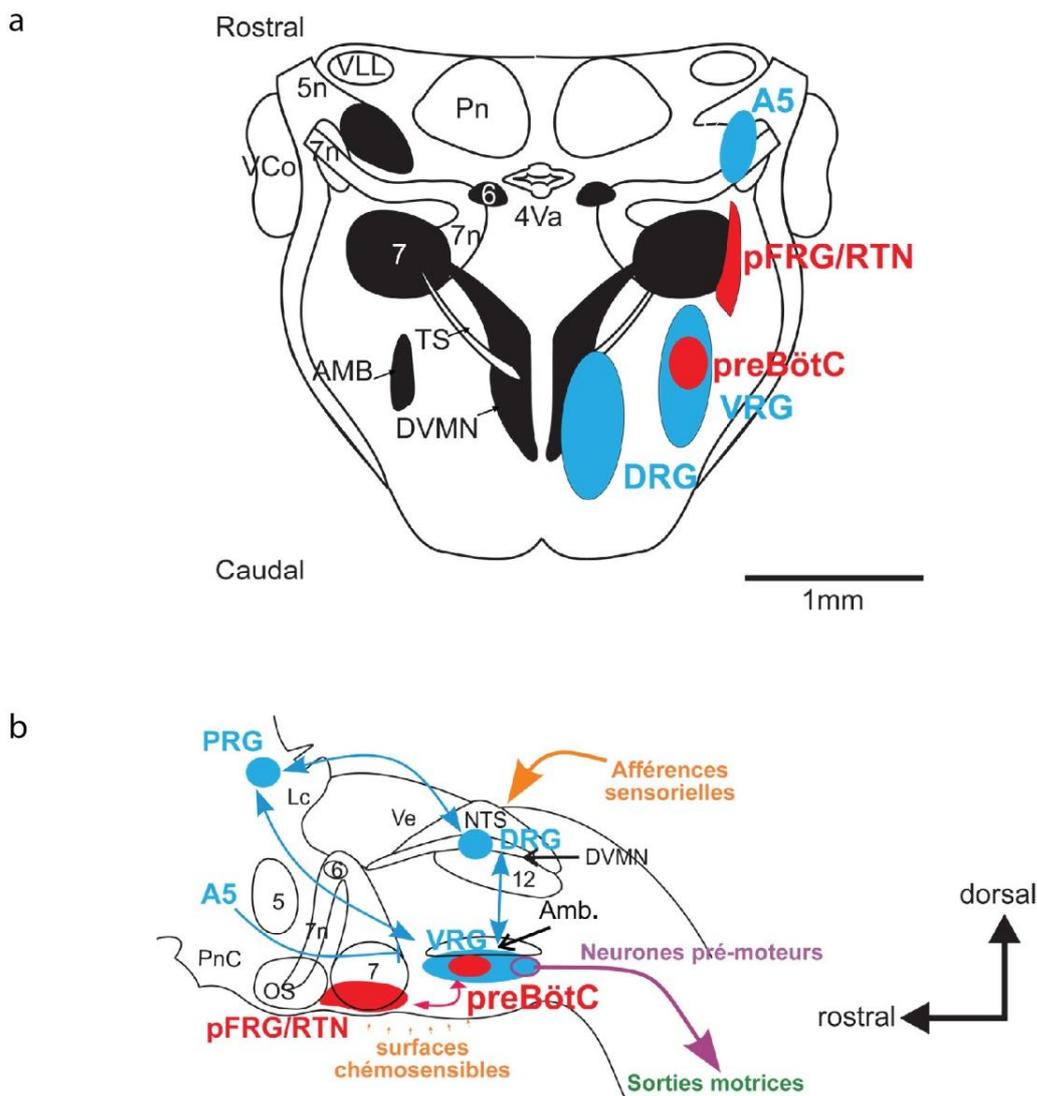


Figure 3 : Représentation schématique des groupes respiratoires et de leurs interactions au sein du tronc cérébral

Projection sur le plan horizontal (a) et sur le plan sagittal (b).

Les différents neurones respiratoires modulateurs sont répartis et organisés au sein du tronc cérébral en groupes respiratoires représentés ici 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 groupes neuronaux formant le générateur central de rythme respiratoire (CPG) sont signifiés en rouge. Le CPG se compose de deux oscillateurs respiratoires, le complexe pré-Bötzinger (preBötC) à partir duquel sont générées les bouffées d'activités inspiratoires, et le groupe respiratoire parafacial (pFRG), également appelé noyau rétrotrapézoïde (RTN). Ce dernier, localisé à la surface ventrale du noyau moteur Facial, possède des propriétés de chémoception centrale au CO₂ et présente, en fonction des stades étudiés, des activités pré-inspiratoires ou expiratoires actives.

Dénomination des différentes structures et noyaux médullaires:

4Va: Partie antérieure du 4ième ventricule, 5 : Noyau moteur du Trijumeau, 6 : Noyau de l'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, TC : Tractus Solitaire, VCo : Noyau vestibulo-cochléaire, Ve : Noyaux Vestibulaires, VLL : lemniscus ventro-latéral.

Cet oscillateur est formé de deux groupes de neurones bilatéralement synchronisés (*Smith et al., 1991*). Chez l'adulte ces groupes se composent de neurones pré-inspiratoires et inspiratoires (tous deux glutamatergiques) ainsi que d'une population de neurones inspiratoire précoce inhibitrice (glycinergique) (*Molkov et al., 2013 ; Connelly et al., 1992*).

L'activité rythmique de l'oscillateur repose sur une forte connectivité glutamatergique au sein du réseau (*Smith et al., 1991*). De fait, le blocage pharmacologique (CNQX ; *Smith et al., 1991 ; Thoby-Brisson et al., 2005*) ou génétique (délétion du gène *Vglut2* codant pour le transporteur vésiculaire du glutamate conditionnant dans l'ensemble du tronc cérébral le remplissage des vésicules pré-synaptiques, *Wallen-Mackenzie et al., 2006*) de ce type de neurotransmission entraîne une disparition du rythme respiratoire.

Il a été démontré que cette région pouvait être anatomiquement caractérisée par l'expression du récepteurs NK1 à la substance P (SubP), absent des structures adjacentes (rVRG et BötC) (*Gray et al., 1999 ; Wang et al., 2001*). Ces neurones co-expriment d'autres marqueurs anatomiques tel le neuropeptide somatostatine (Sst+, *Stornetta et al., 2003*), le récepteur à la neurotrophine BDNF (TrkB, *Thoby -Brisson et al., 2003*), les récepteurs opioïdes de type μ (μ OR ; *Gray et al., 1999*) ou certains récepteurs à l'ATP (P2Y, *Lorier et al., 2007 ; Huxtable et al., 2009*). Au cours de l'année 2010, deux études ont pu mettre en évidence que l'ensemble de ces neurones dérivent de progéniteurs neuronaux exprimant le gène à homéobox *Dbx1* et ainsi que l'expression de ce facteur de transcription permet de récapituler l'ensemble de la population constitutive de l'oscillateur (*Bouvier et al., 2010 ; Gray et al., 2010*).

Le rôle vital du preBötC pour la genèse des phases inspiratoires a pu être démontré *in vivo* grâce à différentes approches pharmacologiques (*Tan et al., 2008 ; Gray et al., 2001*), de lésion toxique (SP-SAP ; *McKay et al., 2005*), génétiques (*Bouvier et al., 2010*) ou optogénétiques (*Smith et al., en préparation*). Citons ici l'élégante étude permettant d'adresser le rôle fonctionnel des neurones Sst+ pour la production du rythme respiratoire. Grâce à des approches utilisant des vecteurs viraux, les auteurs ont pu induire l'expression d'un canal exogène potassique, le récepteur ionotropique à l'Allatostatine (AlsR), au sein des neurones Sst+ du preBötC. Chez les animaux anesthésiés, l'application iontophorétique du ligand allatostatine induit l'ouverture du canal, l'hyperpolarisation des neurones transfectés et la mise sous silence de l'activité respiratoire.

INTRODUCTION

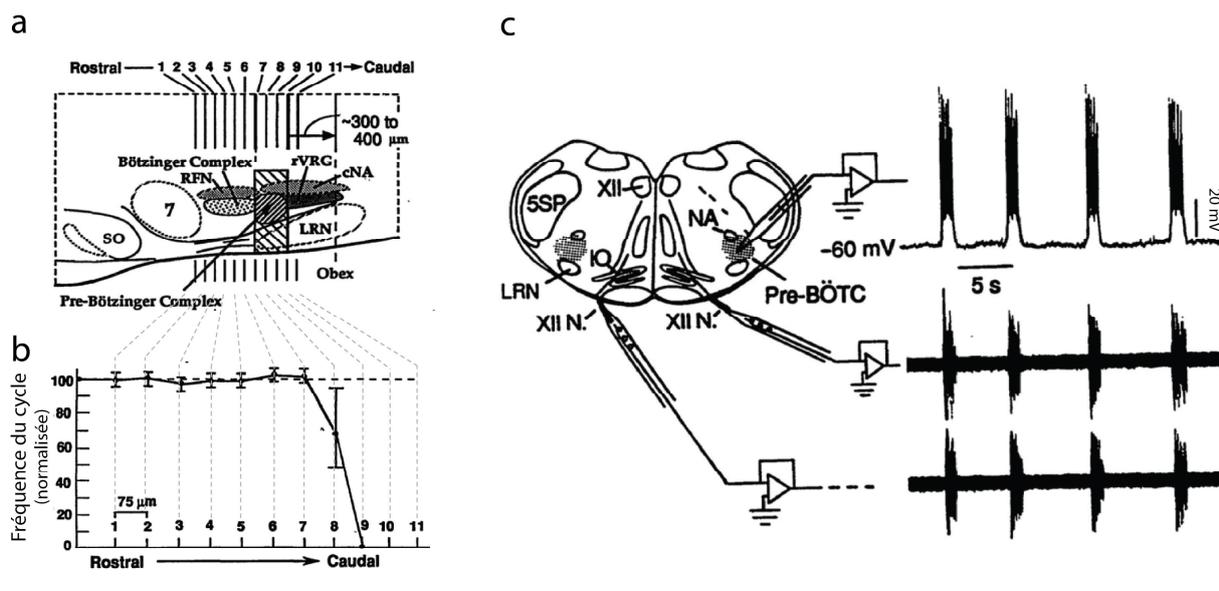


Figure 4 : Le preBötC est à l'origine du rythme respiratoire

(a) Représentation schématique du tronc cérébral en vue sagittale illustrant la position du preBötC au sein de la médulla ventrale. Les différents lignes verticales présentent les positions rostro-caudales des sections étagées réalisées sur une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée de rat adulte *in vitro*. Le rectangle hachuré indique la région nécessaire pour la production du rythme. (b) Graphique présentant l'évolution de la fréquence respiratoire (normalisé par rapport à la fréquence contrôle) enregistrée au niveau du nerf phrénique suite à la réalisation de sections transverses séparées de 75 μ m, dans le sens rostro-caudal. Nous pouvons observer que les sections rostrales au preBötC (positions 1 à 7) n'entraînent aucune modifications de l'activité respiratoire tandis que celles réalisées en son sein (8-11) abolissent l'activité motrice rythmique, démontrant le caractère nécessaire de ce réseau neuronal. (c) Le preBötC peut être isolé dans une tranche transverse. L'enregistrement des racines motrices du XII n révèle la persistance d'une activité rythmique spontanée et bilatéralement synchronisée. L'enregistrement des neurones du preBötC par des approches de patch clamp en configuration cellule entière (haut) met en évidence que les neurones constitutifs de ce réseau déchargent des bouffées de potentiel d'action en phase avec l'activité des sorties motrices démontrant qu'ils sont la sources de l'activité rythmique.

IO: Olive Inférieure, **cNA:** Noyau Ambigu caudal, **LRN:** Noyau Réticulaire Latéral, **RFN:** noyau rétro-facial, **rVRG:** Groupe Respiratoire Ventral rostral, **SO:** Olive Supérieure, **5SP:** noyau spinal du trijumeau, **7:** noyau moteur du facial, **XII:** noyau de l'Hypoglosse, **XII n:** nerf Hypoglossal

Adapté de *Smith et al., 1991*

Ces résultats suggèrent que ce petit contingent est nécessaire pour la genèse du rythme respiratoire (*Tan et al., 2008*).

4.2 - Groupe respiratoire para-facial et noyau rétro-trapézoïde

4.2.1 ó Découverte

Par une approche électrophysiologique sur des préparations de tronc cérébral moelle épinière isolées de rats nouveaux-nés (P0-P4), une seconde structure rythmique a été décrite dont le profil d'activité suggérait une implication directe dans la genèse du rythme respiratoire. Les neurones de cette structure localisée au niveau du noyau moteur du nerf

facial présentaient un pattern de décharge particulier (*Onimaru et al., 1987, Onimaru et Homma 1987, 2003*). Bien que la majorité des potentiels d'action soit émis au cours de la phase post-inspiratoire, une partie de la décharge avait lieu pendant la période pré-inspiratoire. (**Figure 5**). Localisé à la surface ventro-latérale du noyau moteur du nerf facial cette structure néonatale a été baptisée : groupe respiratoire parafacial (pFRG) (*Onimaru et al., 2003*).

Il se trouve que la localisation du pFRG correspond chez l'adulte à celle d'une structure connue comme le noyau rétrotrapézoïde (RTN).

Chez le chat adulte, par des techniques de traçage anatomique rétrograde des axones, Smith et al mettent en évidence que les neurones du RTN projettent vers l'ensemble des groupes respiratoires rostraux, dorsaux et ventraux (*Smith et al., 1989 ; Connelly et al., 1989*). Ce groupe de neurones, nommé donc noyau rétro-trapézoïde, possédait deux caractéristiques potentiellement intéressantes dans le cadre de la physiologie respiratoire. Premièrement, il était localisé à proximité du complexe Bötzing, région ventrolatérale du bulbe définissant à l'époque la partie la plus rostrale du groupe respiratoire ventral. D'autre part, ce noyau était anatomiquement localisé au même emplacement que l'aire « M » zone alors méconnue mais dont on savait qu'elle était impliquée dans les phénomènes de chémoception centrale chez le chat (*Mitchell et al., 1963*). A cause de sa localisation et de ses projections axonales vers les groupes respiratoires, Smith suggère que le RTN pourrait être composé de neurones impliqués dans la régulation respiratoire.

4.2.2 - Le pFRG est composé de neurones pré-Inspiratoire couplés au preBötC

Les études pionnières réalisées par le Dr. Onimaru permirent de mettre en évidence plusieurs propriétés particulièrement intéressantes du pFRG. (i) La réalisation d'une stimulation électrique de cette population neuronale permet de «réinitialiser» la phase du rythme respiratoire en engendrant un nouveau cycle inspiratoire. (ii) La lésion électrolytique de ces neurones provoque une diminution significative de la fréquence de décharge du nerf phrénique. Enfin, (iii) l'activité de cette structure est insensible à une stimulation du nerf vague, stimulation causant une inhibition de l'activité motrice respiratoire en C4, sous-tendant l'hypothèse de deux systèmes neuronaux distincts permettant la génèse de l'activité rythmique

INTRODUCTION

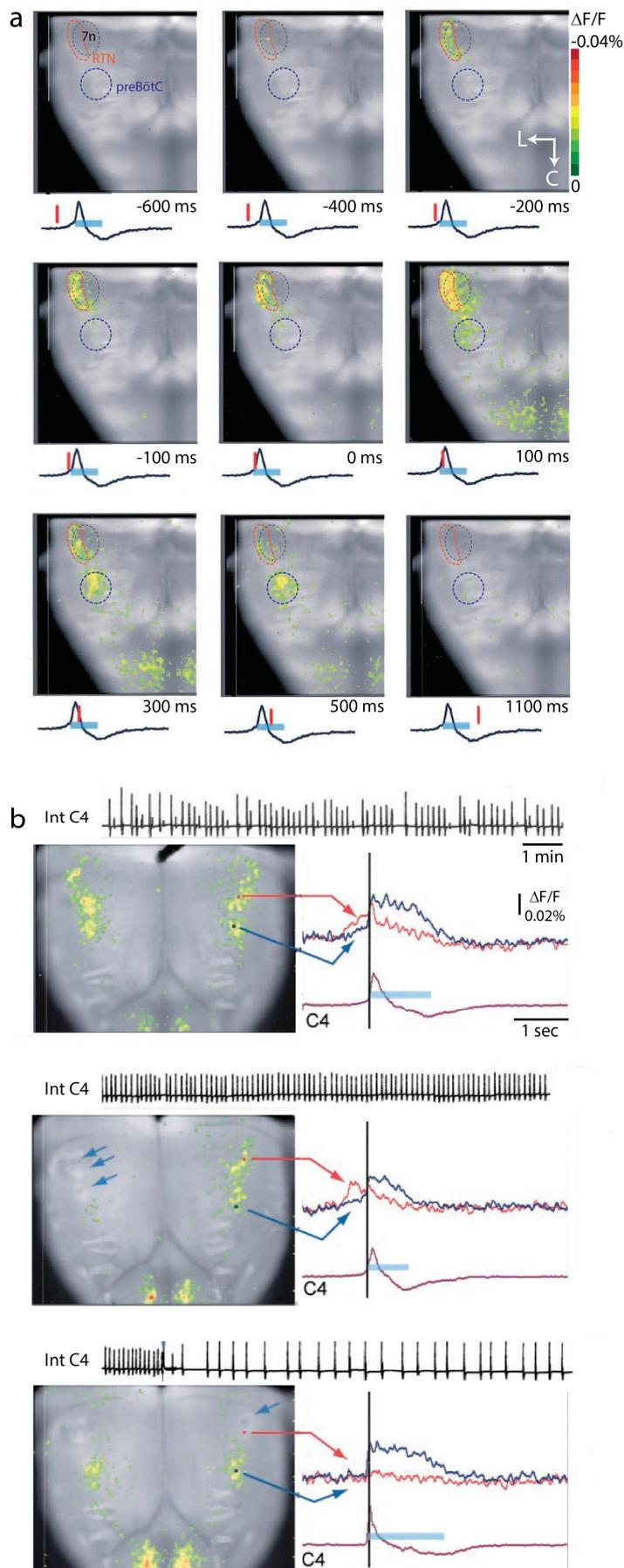


Figure 5 : Le RTN: un réseau neuronal pré-inspiratoire fonctionnellement couplé au preBötC

(a) Observation par imagerie optique du pattern spatiotemporel d'activation du RTN. Cette représentation de l'activité électrique est obtenue par superposition d'une vue ventrale du tronc cérébral et d'une carte pseudo-colorisée présentant les variations d'activités électriques enregistrées par imagerie optique sur des préparations en bloc de rat nouveau-nés (P1) préalablement incubées dans du Di-2-ANAPEQ. La trace présentée en dessous des images représente l'activité spontanée du CPG respiratoire enregistrée au niveau de la racine C4. La ligne bleue représente l'activité inspiratoire, la ligne rouge indique le temps auquel a été obtenu l'image. Nous pouvons observer l'apparition d'une bouffée d'activité pré-inspiratoire à la surface ventro-latérale du noyau facial (7n) précédant d'environ 300 ms la décharge motrice. Par la suite, cette bouffée d'activité se propage caudalement vers le preBötC et permet l'émission d'une décharge de type inspiratoire.

(b) Effet d'une lésion partielle du RTN sur l'activité spontanée du réseau respiratoire. En contrôle (haut), le RTN présente une activité électrique complexe, bilatéralement synchronisée, de type pré-inspiratoire. Ces activités précèdent l'émission d'une bouffée d'activité motrice inspiratoire (barre bleue) enregistrable sur C4. La lésion électrique du réseau gauche du RTN (panel du milieu, flèches bleues) l'activité pré-inspiratoire est préservée au sein du RTN contralatéral et la fréquence de décharge spontanée du CPG est augmentée. Suite à la lésion du RTN droit, la fréquence motrice spontanée est dramatiquement diminuée, suggérant un rôle rythmogène du RTN sur le réseau respiratoire. De manière intéressante, la perte du RTN n'induit pas la disparition des signaux optiques post-inspiratoires au sein du noyau moteur Facial. Ces résultats mettent en évidence l'existence de connections excitatrices montantes entre le preBötC et différents noyaux moteurs situés en amont.

Adapté de *Onimmaru et al., 2003*

Pour les auteurs de cette étude, ces résultats indiquaient que les neurones du pFRG se composaient de neurones pré-I susceptibles de déclencher l'activité inspiratoire (*Onimaru et Homma, 1987, Onimaru et al., 1995*).

En 2003, par des méthodes d'imagerie utilisant des sondes fluorescentes sensibles au potentiel membranaire (voltage-sensitive dyes), Onimaru décrit plus en détail les liens fonctionnels existant entre le pFRG et le reste du système respiratoire. Il montre que ce réseau se compose de deux groupes de neurones bilatéralement synchronisés dont les bouffées d'activités surviennent 500 ms avant l'émission d'une décharge motrice inspiratoire au niveau du nerf phrénique C4. Bien que la réalisation d'une lésion partielle d'un de ces groupes ne modifie pas ou peu le profil de décharge de l'activité motrice, une lésion bilatérale provoque une diminution dramatique de la fréquence du rythme et un allongement de la durée de la bouffée inspiratoire. Ainsi, le RTN peut (i) accélérer la fréquence et (ii) contrôler l'organisation spatio-temporelle des bouffées inspiratoires (*Onimaru et al., 2003*).

Il apparaît donc dès lors que la genèse du rythme respiratoire pourrait reposer sur une organisation duelle basée sur l'interaction de deux étages rythmogènes distincts, le pFRG et le preBötC. Cette hypothèse est testée dans un premier temps par une étude du Dr. Mellen (**Figure 6**, *Mellen et al., 2003*) en ayant recours à des outils pharmacologiques permettant de manipuler sélectivement l'activité des neurones du preBötC. Pour cela, il fait appel aux propriétés inhibitrices sélectives qu'exercent les opioïdes sur la rythmogénèse du preBötC (*Gray et al., 2001*) auxquelles le pFRG est insensible. Si la genèse du rythme respiratoire repose exclusivement sur les neurones inspiratoires du preBötC, l'application d'opioïdes sur des préparations *en bloc* devrait, comme sur les préparations en tranche, abolir le rythme respiratoire. A contrario, si les neurones inspiratoires du preBötC et pré-inspiratoires du pFRG interagissent pour générer le rythme, alors les conséquences de l'application d'opioïde sur le rythme devraient avoir des effets différents sur le rythme généré dans ces deux types de préparation. L'application de DAMGO, un agoniste des récepteur μ aux opioïdes, sur les préparations *en bloc*, engendre une diminution de la fréquence des décharges motrices phréniques. Cependant cette diminution de fréquence ne procède pas d'un allongement progressif de la période du rythme, elle s'effectue de manière discrète. Ainsi, la période séparant deux bouffées inspiratoires augmente par sauts dont les durées sont des multiples de la période initiale du rythme avant l'application pharmacologique. L'enregistrement en

INTRODUCTION

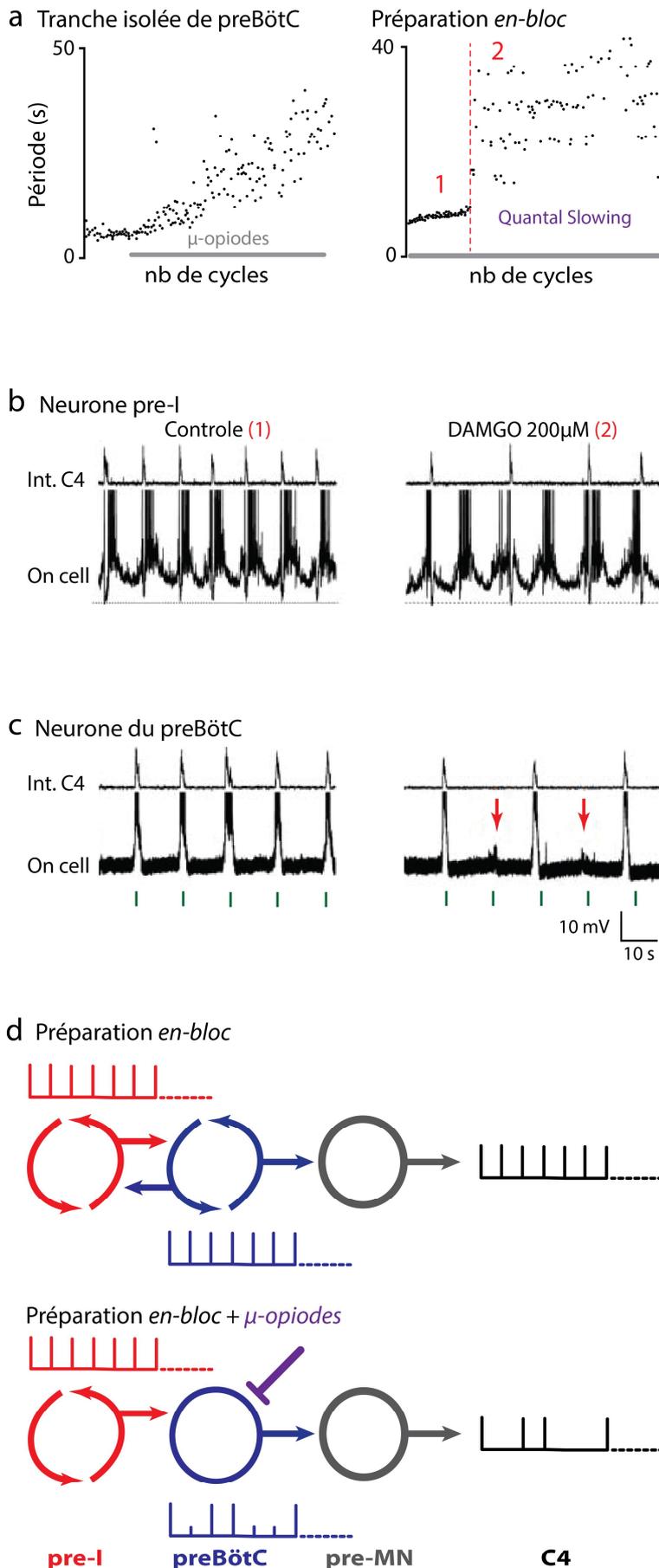


Figure 6 : Mise en évidence du RTN par l'expérience du «Quantal Slowing»

(a) L'application d'agonistes des récepteurs μ -opioïdes (barre grisée) induit un ralentissement quantique de la fréquence respiratoire (2) pouvant être mis en évidence sur des préparations en bloc (droite) mais ne pouvant pas observer sur des préparations en tranche isolée de preBötC (gauche). (b) L'enregistrement électrophysiologique des neurones pré-inspiratoires permet de mettre en évidence que ces cellules sont insensibles à l'application de DAMGO. Cependant, dans des préparations en bloc, leur activité électrophysiologique reste, au cours des étapes de ralentissement, fortement corrélée avec celle du preBötC. Ceux-ci reçoivent, au cours de cette étape de «quantal slowing», des bouffées d'activités phasiques rythmiques à une fréquence comparable à celle observée avant l'application des agonistes opiacés (représenté par les marques vertes). Ces résultats suggèrent l'existence d'un second réseau neuronal rythmique dont l'activité serait synchronisée à celle du preBötC dans les conditions contrôles (c). Modèle d'un générateur central respiratoire constitué de deux oscillateurs (d). Au sein d'une tranche transverse (haut), le rythme est produit par le réseau neuronal rythmogène formé par les neurones inspiratoires du preBötC. L'application d'agoniste μ -opiacés provoque une hyperpolarisation de ces neurones, induit une diminution de leur excitabilité et un ralentissement graduel du rythme. Dans une préparation en bloc (milieu), deux groupes de neurones rythmogènes peuvent, en interagissant l'un avec l'autre, générer une activité rythmique enregistrable au niveau du nerf phrénique C4. Suite au blocage pharmacologique du preBötC, l'activité du réseau respiratoire est diminuée. Le rythme respiratoire persiste mais certains cycles sont «sautés» à cause d'un échec de transmission entre les deux oscillateurs respiratoires. Dans cette situation, les neurones du preBötC reçoivent, de manière continue et rythmique, des bouffées d'activités excitatrices en provenance des neurones pré-inspiratoires. Cependant la dépolarisation provoquée par la libération de glutamate n'est pas suffisante pour contrebalancer l'effet inhibiteur des opiacés et déclencher une bouffée d'activité au sein du preBötC.

Adapté de *Mellen et al., 2002*

parallèle de l'activité de neurones inspiratoire du preBötC met en évidence qu'au cours de cette dépression respiratoire les neurones du preBötC reçoivent des bouffées phasiques excitatrices à une fréquence correspondant à celle des neurones pre-I. Ainsi, dans un état d'excitabilité diminué par les opiacés, les neurones du preBötC ne sont susceptibles de s'activer qu'au moment privilégié de la survenue de bouffées synaptiques excitatrices et rythmiquement organisées en provenance du pFRG. Ce phénomène spectaculaire de « quantal slowing » illustre le fait que bien qu'étant inhibés par le DAMGO, les neurones du preBötC sont sous le contrôle des neurones pre-I du pFRG. De fait, une hausse de l'excitabilité des neurones pré-I, par augmentation de la $[K^+]_e$, est suffisante pour contrer les effets des opiacés et engendre une accélération de la fréquence respiratoire (*Mellen et al., 2003*).

L'ensemble de ces expériences a permis l'identification du CPG respiratoire à l'origine de la genèse du rythme respiratoire. Il se compose de deux oscillateurs neuronaux fonctionnellement interconnectés, le preBötC et le pFRG. Le comportement respiratoire est, tout au long de la vie, finement régulé afin de permettre une adaptation efficace des échanges gazeux en fonction des besoins de l'organisme. De fait l'activité du CPG est placée sous le contrôle de cellules présentant des propriétés chémoeptives, capable de détecter des variations de concentration de CO_2/O_2 et modulant l'activité du CPG en réponse. Au niveau central, le $PaCO_2$ représente le plus puissant stimulus respiratoire. Depuis une dizaine d'années de nombreux efforts ont tenté d'identifier les groupes neuronaux assurant ce processus de chémoeption central au CO_2 . Je m'attacherai dans la partie suivante à présenter les données actuelles sous tendant ce processus vital pour la survie.

II Chémoception centrale au CO₂

1. Principes de régulation ventilatoire

Chez les mammifères, le contrôle de la ventilation affecte la fréquence du rythme respiratoire et le volume d'air inhalé à chaque cycle. Deux principaux types de facteurs peuvent influencer son fonctionnement : (i) les déformations mécaniques occasionnées par la distension des bronches et des bronchioles et qui provoquent un ralentissement de la fréquence respiratoire grâce au réflexe de Hering Breuer et (ii) les pressions partielles en O₂ (PaO₂) et CO₂ (PaCO₂).

La ventilation pulmonaire, l'activité cardiaque et la pression artérielle sont des variables physiologiques très changeantes qui doivent être continuellement ajustées par le système nerveux central afin d'assurer les demandes métaboliques liées aux divers comportements de l'organisme dans son environnement (*Bevan et al., 1969 ; Feldman et al., 2003*). A la différence de la ventilation pulmonaire, la pression partielle de CO₂ dans le sang artériel (PaCO₂) reste constante autour d'un niveau (set-point) précisément régulé (*Haldane and Priestley, 1905*). C'est un exemple classique d'homéostasie souffrant peu d'exceptions. Par exemple sous hypoxie ou dans le cadre d'exercices physiques intenses, la PaCO₂ baisse parce que le maintien du niveau d'O₂ devient prioritaire sur celui du CO₂. Pendant le sommeil lent, la PaCO₂ augmente par rapport à son niveau durant l'éveil. Ces déviations temporaires de l'homéostasie sont adaptatives (*McEwen ; 1998*).

Les mécanismes qui maintiennent la PaCO₂ constante malgré les grandes variations de la production métabolique de ce gaz, sont complexes (*Forster et al., 2012*). Par exemple, pendant l'exercice, la commande centrale, et des réflexes à point de départ musculaire en provenance de mécano-récepteurs, et de récepteurs métabotropiques, coopèrent pour activer la respiration de façon proportionnelle à l'augmentation du métabolisme et à la production de CO₂ dans l'ensemble du corps. L'association d'une commande centrale et de réflexes est sans doute responsable de l'ajustement de la production et de l'excrétion de CO₂ dans d'autres contextes physiologiques comme la thermorégulation, les changements de régimes alimentaires et les cycles veille-sommeil. La chémoréception dont il sera question dans ce travail de thèse, est présumée responsable de la stabilisation fine de la PaCO₂. Par l'activation de chémorécepteurs centraux et périphériques, une augmentation de la PaCO₂ artérielle

déclenche un réflexe, le chémoréflexe, qui augmente la respiration et active la circulation sanguine de manière à restaurer une valeur normale de la PaCO₂. Ainsi, les conséquences de l'élévation de la PaCO₂ donnent lieu à une réponse régulatrice ventilatoire et cardiovasculaire. La complexité de ces coopérations ne sera présentée ici que pour une mise en perspective des synergies fonctionnelles reposant sur les réseaux neuronaux du tronc cérébral.

Les effets cardiovasculaires de l'hypercapnie (élévation de la PaCO₂ au-delà du set-point) résultent de l'action du CO₂ à de multiples niveaux (*Magosso and Ursino, 2001* ; *Ursino et al., 2001*). Le CO₂ dilate les lits vasculaires périphériques et, via des chémorécepteurs, active le système nerveux sympathique qui produit une vaso-constriction et stimule l'activité cardiaque. En conséquence la pression artérielle peut augmenter ou décliner ou rester constante en fonction du temps. Si la pression artérielle augmente, alors les effets de la stimulation des chémorécepteurs sur la respiration seront pondérés par l'engagement en retour d'un puissant baroréflexe. Si la pression artérielle diminue, l'effet des chémorécepteurs sera potentialisé par le même feedback. Les chémorécepteurs activent le générateur respiratoire central qui augmente la respiration et induit de nombreux effets sur le contrôle nerveux de la circulation sanguine. Par exemple, l'activité respiratoire augmentée engage les récepteurs d'étirement pulmonaires qui inhibent de façon réflexe l'activité parasymphatique vagale, conduisant ainsi à des augmentations conjointes de la pression artérielle et de l'activité cardiaque. L'activité cardiaque peut aussi être augmentée par une activation directe des neurones pré-ganglionnaires sympathiques cardiaques qui reçoivent une innervation en provenance du générateur central respiratoire. Les ajustements chémoréflexes cardiovasculaires et ventilatoires sont liés et doivent être envisagés conjointement dans le cadre de la physiopathologie des apnées obstructives du sommeil (*Dempsey et al., 2010*), de l'hypoxie intermittente (*Fletcher et al., 1992*), de l'hypertension artérielle (*Tafil-Klawe et al., 1985*), de l'insuffisance cardiaque (*Esler and Kaye, 2000*).

Dans cette thèse, qui s'intéresse à la dissection des bases neurales du chémoréflexe, nous envisagerons celui-ci, à travers le prisme exclusif de la respiration.

2. Chémoception centrale

Un réflexe est initié par l'action d'une variable physique (étirement, température) sur un capteur ou par la liaison d'une molécule sur un récepteur. En recherche cardiorespiratoire,

INTRODUCTION

le terme de chémoréception renvoie en général au processus par lequel le CO₂ active les centres contrôlant la respiration, l'activité cardiaque et le tonus vasculaire.

Les mécanismes de la chémoréception respiratoire par laquelle de faibles changements de la pression partielle du CO₂ dans le sang entraînent de larges changements de la respiration restent énigmatiques. L'amplitude et la fréquence des mouvements respiratoires étaient déjà mesurés il y a plus d'un siècle (*Haldane et Priestley, 1905*). Avec une méthode simple de mesure du CO₂ dans l'air alvéolaire expiré, Haldane et Priestley établissaient deux aspects fondamentaux de la régulation respiratoire, d'une part la puissance de l'effet stimulant du CO₂ sur la respiration et d'autre part, le fait que la PaCO₂ sanguine est très étroitement régulée quel que soit le niveau d'activité physique ou l'altitude. La notion selon laquelle la PaCO₂ était le principal facteur déterminant la ventilation pulmonaire (« the main factor that normally determines lung ventilation») ou que la PaCO₂ constituait l'impulsion capitale de la respiration (« the paramount drive to breathe »), un dogme de la physiologie respiratoire, date de ces travaux. Dans la réalité, la respiration s'ajuste à n'importe quel changement comportemental et, sauf si les voies aériennes sont obstruées, ces ajustements ne proviennent pas que d'une réaction à des variations de la PaCO₂ mais également d'une réaction à des changements d'activité en provenance de multiples sites du SNC projetant sur les centres respiratoires. Ces sites sont liés aux circuits des émotions, à l'exercice, au statut métabolique, à la température corporelle et aux états de vigilance. Et même si les changements respiratoires liés à ces comportements ne sont pas dus à un changement de la PaCO₂, sa stabilité est essentielle au maintien du pH des tissus. Cette régulation homéostatique requiert un puissant contrôle en retour opérant indépendamment de l'ampleur de la ventilation pulmonaire. Ce rétro-contrôle, constituant l'objet d'étude de cette thèse, est initié par des senseurs du CO₂ localisés dans les corps carotidiens (chémorécepteurs périphériques) et au sein du SNC, les chémorécepteurs centraux (*Smith et al., 2010*). La localisation, la nature cellulaire des chémorécepteurs centraux (neurones, glie, cellules endothéliales) constituées ou non en unités fonctionnelles pluri-cellulaires, n'est pas encore définitivement établie (*Gourine et al., 2010 ; Guyenet et al., 2010 ; Nattie et al., 2009,2010*). Le CO₂ est sensé agir à travers les protons dissociés de l'acide carbonique (théorie de la réaction). Bien qu'à tout instant le pH soit dépendant de la PaCO₂ et de la concentration de bicarbonate dans les tissus, il dépend en fait vraisemblablement d'échanges ioniques entre divers compartiments : les globules rouges, le plasma, les cellules endothéliales des capillaires, le milieu extracellulaire, les neurones et les cellules gliales (*Gourine et al., 2010*). Le rôle principal des protons est plausible mais

difficile à prouver étant donné le nombre pléthorique de protéines modulées par le pH, des canaux ioniques en particulier, qui pourraient agir comme « récepteurs aux protons ». Le CO₂ moléculaire lui-même pourrait exercer des effets directs sur les cellules gliales ou les neurones en changeant les propriétés d'hémi-canaux fait de connexines particulières (*Huckstepp et al., 2010a ; Huckstepp et al., 2010b*) (voir également *Huckstepp and Dale, 2011*). Il existe au sein du SNC de nombreuses populations neuronales possédant des propriétés de chémosensibilité intrinsèque, c'est-à-dire, présentant un profil d'activité pouvant être modulé par le CO₂. Une partie de ces populations a pu être identifiée par des approches d'électrophysiologie *in vitro*. C'est notamment le cas du locus coeruleus dont l'activité est régulée par un courant membranaire potassique sensible au CO₂ (*Pineda et al., 1997*). D'autres régions ont pu être identifiées par cartographie de l'expression du gène précoce immédiat *c-fos* (*Teppema et al., 1997*) et ont permis de démontrer la sensibilité des neurones de la substance grise périacqueducale à l'hypercapnie (*Kramer et al., 1999*).

L'identification des chémorécepteurs centraux, structures neuronales chémosensibles capables de relayer cette information vers le CPG respiratoire et ainsi d'entraîner directement le comportement respiratoire de manière chémo-dépendante, est difficile à réaliser. De nombreux neurones sont activés ou inhibés par acidification *in vitro* ou en culture, indépendamment de leur connectivité, mais tous ne permettent pas d'exercer une quelconque influence sur l'activité du réseau respiratoire (*Su et al., 2009*). Ainsi, il n'y a pas à l'heure actuelle de certitudes ni sur le ligand (CO₂ moléculaire, ions bicarbonates, protons, ions hydroxides) reconnu par le système chémosensible, ni sur les mécanismes senseurs en propre, ni sur les types cellulaires exprimant ces senseurs.

Il doit être mentionné ici que deux écoles s'affrontent depuis des années sur la question des bases neurales de la chémoréception centrale. Une première école, soutient que la chémoréception centrale, dite « distribuée » repose sur un grand nombre de structures respiratoires du tronc cérébral sensibles au pH/PaCO₂ combiné à une distribution potentiellement aussi large de structures sensibles au pH/ PaCO₂ qui en régulent l'activité. Ainsi les structures candidates à exprimer des chémorécepteurs centraux incluent le noyau rétrotrapézoïde (RTN, dont nous re-parlerons longuement), le noyau du tractus solitaire (NTS), les neurones sérotoninergiques du raphé obscurus (RO) et l'hypothalamus (voir *Nattie and Li, 2009* pour revue). Cette vision repose sur des expériences de microdialyse par lesquelles des acidifications focales de diverses régions du cerveau sont susceptibles d'induire des augmentations plus ou moins importantes de la respiration et sur les résultats de lésions ou

INTRODUCTION

de manipulations pharmacologiques (*Corcoran et al., 2009 ; Duffin, 2010 ; Foster and Smith, 2010 ; Hodges and Richerson, 2010 ; Nattie , 2011 ; Nattie and Li, 2008*). La théorie alternative veut que la chémoréception centrale soit opérée par des populations neuronales discrètes et dédiées et ici encore les tenants de deux populations candidates s'opposent : d'une part ceux assignant un rôle principal aux neurones sérotoninergiques (5HT) (*Hodges and Richerson, 2010*) et d'autre part ceux plaidant pour un rôle privilégié du RTN (*Guyenet et al., 2010*). Dans les deux cas, ces systèmes vérifient un certain nombre de critères requis pour jouer un rôle dans la chémoréception centrale. Les critères pertinents définissant ces structures comme candidats crédibles sont multiples et pour certains restent encore non complètement vérifiés. La stimulation des neurones de ces structures doit aboutir à une augmentation de l'activité respiratoire, les neurones doivent pouvoir répondre de façon autonome à une acidification du milieu extracellulaire, l'augmentation d'activité des neurones par acidification doit être comparable à celle que causerait l'exposition des animaux à des taux correspondants de CO₂ dans l'air inspiré. La lésion ou la mise au silence de ces neurones doit aboutir à la disparition des réponses chémosensibles.

Une brève restitution de l'état de l'art concernant ces validations pour chacune des deux populations neuronales candidates sera faite ci-dessous et démontrera que le RTN est sans doute le mieux placé. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse sont, comme il sera discuté ultérieurement, aussi à l'appui du rôle prépondérant du RTN dans la chémoréception centrale.

3. La chémoréception centrale par les neurones sérotoninergiques

Afin de pouvoir être considérés comme des chémorécepteurs respiratoires centraux, les neurones doivent (i) posséder des propriétés de chémosensibilité en accord avec des gammes de pH physiologiques comprises entre pH7.4 et pH7.2, (ii) posséder une réponse intrinsèque même en absence de toute afférence du système et (iii) être capables de moduler directement le réseau respiratoire afin d'augmenter l'activité respiratoire en réponse à un challenge hypercapnique. En raison de leurs projections vers de nombreuses régions cérébrales impliquées dans le comportement respiratoire, les neurones sérotoninergiques ont été largement étudiés (*Lindsay and Feldman, 1993*). Ces neurones sont localisés au niveau du bulbe rachidien, du pont et du mésencéphale dans un ensemble de structures sous-corticales

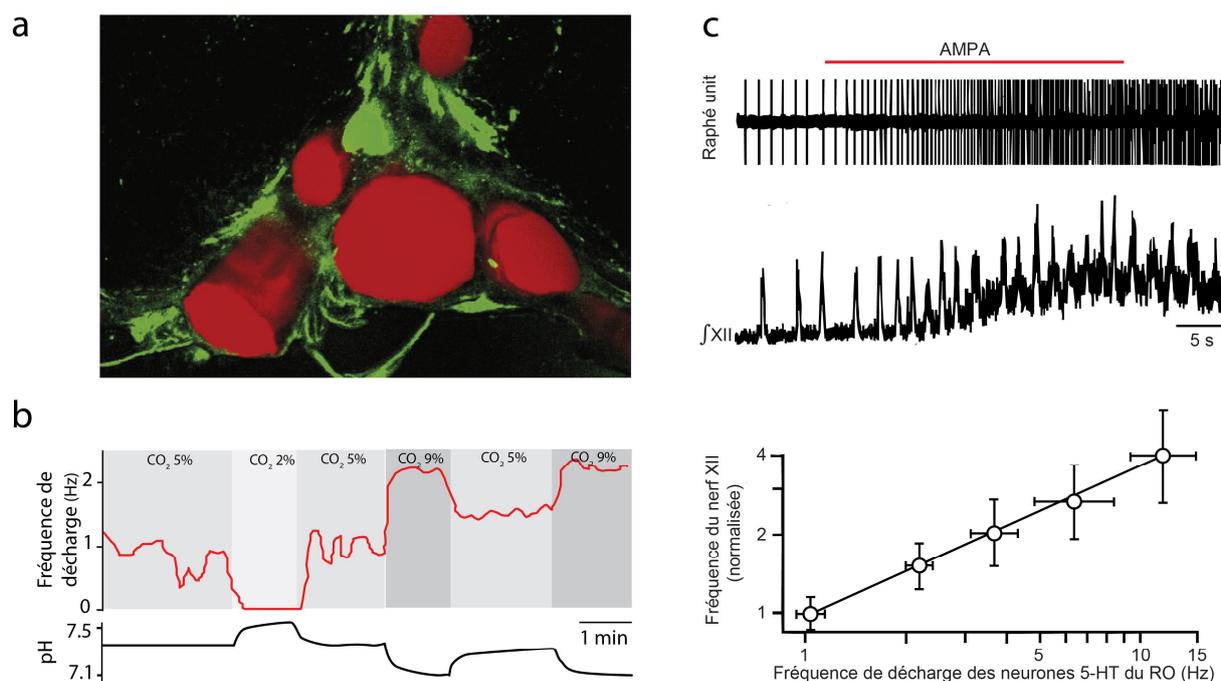


Figure 7 : Les neurones sérotoninergiques du noyau Raphé Obscurus présentent des propriétés de chémosensibilité intrinsèque

Les neurones 5-HT du RO (vert) sont localisés à proximité des artères de la médulla (rouge) comme le montre la projection maximale de ce stack acquis au microscope confocal (a). Ces neurones sont sensibles aux variations de pH *in vitro* (b). De plus ces neurones sont fonctionnellement couplés au reste du réseau respiratoire. Une injection stéréotaxique d'AMPA au sein du RO induit une augmentation du taux de décharge des neurones sérotoninergiques du RO (haut) provoquant un accroissement proportionnel de la fréquence des bouffées d'activités du preBötC ici enregistrées au niveau du nerf XIIIn (bas) (c).

Le panel a est issu de *Fiske et al., 2002*, b de *Richerson GB et al., 2001* et c de *Wang et al., 1995*

nommées les noyaux du Raphé. Les études effectuées depuis une quinzaine d'années sur l'un de ces noyaux, le Raphé Obscurus, situé au sein de la partie médiane du bulbe, ont permis de mettre en évidence que les neurones qui le composent possèdent les caractéristiques permettant de les définir comme étant des chémocepteurs centraux.

3.1 - Les neurones sérotoninergiques sont intrinsèquement chémosensibles

La plupart des neurones sérotoninergiques des noyaux médullaires sont localisés à proximité des artères cérébrales, une position idéale pour pouvoir rapidement détecter les variations de PaCO₂ dans la circulation sanguine (Figure 7 ; *Bradley et al., 2002*). De nombreuses études électrophysiologiques effectuées *in vivo* et *in vitro* ont permis de mettre en évidence que ces neurones peuvent répondre à une augmentation du CO₂ par un accroissement de leur taux de décharge neuronale (*Richerson et al., 2005 ; Veasey et al., 1995, 1997*). Des

INTRODUCTION

expériences d'immuno-marquage dirigées contre le gène immédiat précoce *c-fos* ont démontré que les neurones du RO sont fortement activés suite à un challenge hypercapnique (*Johnson et al., 2005; Pete et al., 2002*). L'utilisation des outils génétiques a permis de démontrer de manière irréfutable le caractère chémosensible de ces populations neuronales. L'étude des souris mutantes *Pet1-1^{cre} ; Lmx1b^{lox/lox}* permettant l'inactivation du facteur de transcription Lmx1b nécessaire pour la différenciation des neurones sérotoninergiques met en évidence une ablation quasi-totale des populations sérotoninergiques dans le CNS. Chez ces mutants, les réponses respiratoires observées lors d'un challenge hypercapniques sont diminuées de moitié par rapport aux réponses enregistrées chez les contrôles (*Zhao et al., 2006 ; Hodges et al., 2008*). Ces résultats ont pu être confirmés dans une étude publiée au cours de l'année 2011. Dans ces travaux, l'équipe du docteur Dimecky exprima grâce à l'utilisation de lignées doublement conditionnelles le récepteur DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) au sein des neurones sérotoninergiques du tronc cérébral. La technique DREADD permet l'expression d'un récepteur métabotrope associé à une protéine G permettant l'activation de canaux hyperpolarisant de type hM4Di. Suite à sa liaison avec une molécule de clozapine-N-oxide (CNO) ce canal provoque l'inactivation des neurones dans lesquels il est exprimé (*Armbuster et al., 2007*). L'apport de la molécule soit dans l'alimentation de l'animal (*in vivo*) ou dans le milieu de perfusion (*in vitro*), active ce récepteur et met les neurones sous silence, permettant d'en déduire leur rôle fonctionnel. Cette étude conclue que l'inactivation des neurones sérotoninergiques du tronc aboutit à une perte transitoire de la chémosensibilité au CO₂ comparable à celle observée chez les mutants conditionnels (*Ray et al., 2011*). Les mécanismes moléculaires sous-tendant les propriétés de chémoception des neurones sérotoninergiques ont été identifiés grâce à l'utilisation de souris génétiquement invalidée pour les gènes codant les canaux potassiques de type TASK depuis longtemps suspectés d'être un des acteurs majeurs de ce processus. Ces canaux sont (i) fortement exprimés dans de nombreuses sous-classes de neurones respiratoires (*Sirois et al., 2000 ; Washburn et al., 2002, 2003*), peuvent (ii) générer un courant potassique dépolarisant (*Bayliss et al., 2001 ; Washburn et al., 2002 ; Mulkey et al., 2004*) (iii) sont fortement sensibles aux variations de pH physiologique (*Lesage et al., 2003 ; Talley et al., 2003*). L'inactivation des sous-unités constitutives des canaux TASK-1 et TASK-3 bloque la genèse de ce courant pH-sensible au sein des neurones sérotoninergiques du RO empêchant ainsi l'adaptation de leur profil de décharge (*Mulkey et al., 2007*).

3.2 - Les neurones sérotoninergiques sont connectés au CPG respiratoire

3.2.1 - Evidences anatomiques

De nombreuses expériences ont permis de conclure quant à l'existence de connections anatomiques entre les différents groupes de neurones respiratoires et les neurones sérotoninergiques du RO. L'injection stéréotaxique d'un adénovirus Cre-dépendant (AAV2-DIO-ChR2mCherry) au sein du RO de souris transgéniques *Pet1^{cre}* permet l'expression de la protéine rapporteur mCherry sélectivement dans les neurones sérotoninergiques ainsi que leur dendrites et axones, et peut de fait être utilisée pour tracer les territoires cibles des neurones sérotoninergiques (*DePuy et al., 2011*). Ces expériences révèlent de nombreuses projections vers les neurones du preBötC, du noyau moteur du nerf vague, des motoneurones de l'hypoglosse, trigéminaux ainsi qu'en direction des neurones du RTN. Ces derniers résultats sont en accord avec des études antérieures dans lesquelles l'injection d'un traceur rétrograde, le fragment B de la toxine Cholérique (CTB), au niveau du RTN, induit un fort marquage des neurones sérotoninergiques du RO (*Mulkey et al., 2007*).

3.2.2 - Evidences fonctionnelles

Il a été démontré, chez la souris éveillée, qu'une condition hypercapnique provoque une augmentation massive de sérotonine au sein du noyau moteur de l'hypoglosse (XIIIn) (*Kanamaru et Homma., 2007*). Fonctionnellement, les neurones sérotoninergiques augmentent leur fréquence de décharge lors d'une hausse de la PaCO₂. *In vivo*, cette augmentation de fréquence est corrélée à un accroissement de la fréquence ventilatoire, suggérant un important lien entre ces deux processus (*Veasey et al., 1995*). Ces effets peuvent être reproduits artificiellement par injection intracérébroventriculaire d'agonistes pharmacologiques des récepteurs sérotoninergiques (*Cayetanot et al., 2002*) et sont dans certains cas utilisés pour traiter des cas d'hypoplasie olivo-ponto-cérébelleuse. Ces patients développent de manière répétée des phases d'apnées due à l'atrophie de régions pontiques et médullaires. L'ingestion de Buspirone, un anxiolytique interagissant avec les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} permet, dans certains cas, le rétablissement d'une ventilation rythmique (*Richter D.W., 2003*). Enfin il a été démontré que la stimulation des neurones sérotoninergiques par approche optogénétique provoque une accélération de la fréquence respiratoire pouvant être bloquée par l'application intrapéritoneale de methylsergide, un bloquant à large spectre des récepteurs 5-HT_R (*DePuy et al., 2011*).

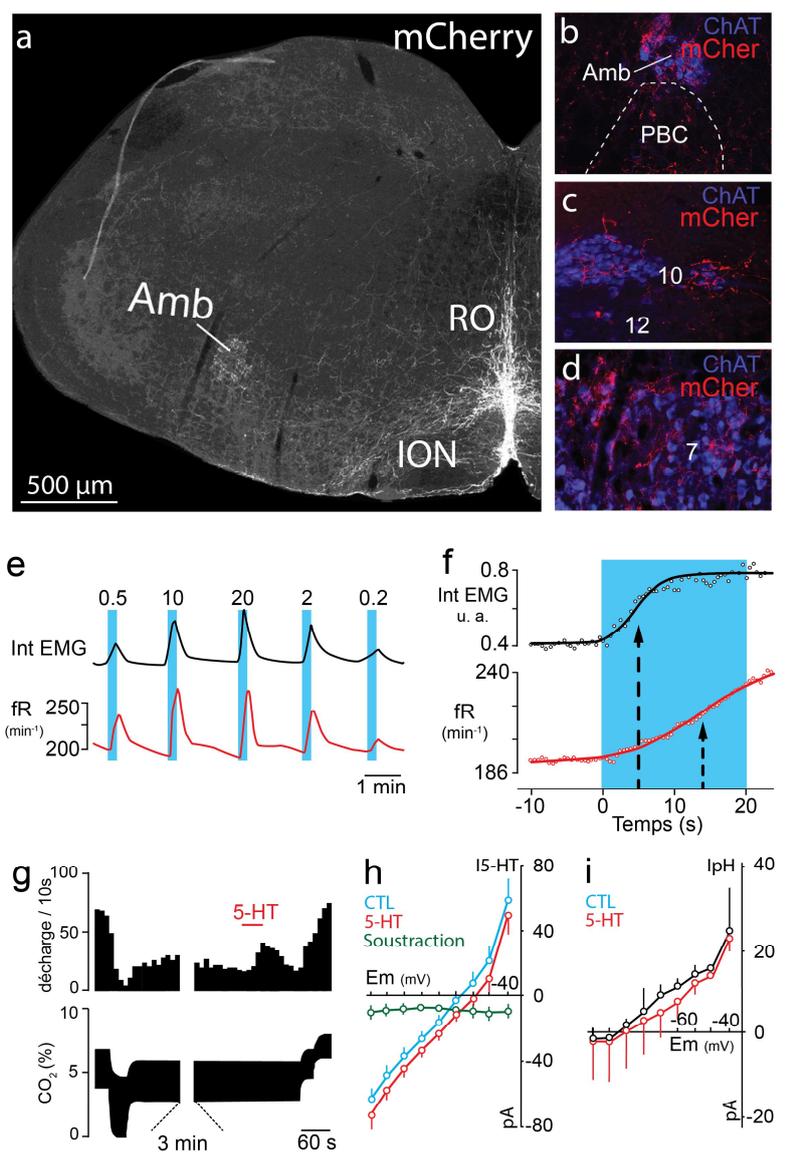


Figure 8 : Les neurones sérotoninergiques ont un rôle modulateur sur l'activité respiratoire

(a) L'expression de protéine rapporteur au sein des neurones 5-HT du Raphé Obscurus (RO) grâce à l'injection stéréotaxique d'un adéno virus *AAV2-ChR2-mCherry* dans le fond génétique *Pet1^{Cre}* permet d'observer de nombreuses projections neuronales en direction des groupes neuronaux du préBötC (b), des noyaux moteur Hypoglossaux (12), Vague (10) (c) et Faciaux (d). La stimulation optogénétique des neurones du RO induit une augmentation de la fréquence respiratoire (fR) proportionnelle à la durée de la stimulation lumineuse. Dans l'expérience présentée les stimulations ont été effectuées pendant 30 secondes à une fréquence de 20Hz avec des pulses lumineux dont la durée était située entre 0.2 et 20 ms (e). Etude de l'évolution de l'amplitude et de la fréquence en réponse à une stimulation du RO. On peut noter que le T_{50} (temps auquel la moitié de la réponse maximale est atteinte) est observé plus de 10 sec après le début de la stimulation lumineuse (flèche sur le graphique) (f). Intégration de l'activité unitaire d'un neurone du RTN enregistré *in vivo*. Nous pouvons noter qu'une baisse de la concentration en CO_2 aboutit à une diminution du taux de décharge, rendant le neurone silencieux. A contrario, une augmentation de la concentration en CO_2 provoque un accroissement du taux de décharge du neurone. Des effets

similaires peuvent être observés suite à l'application iontophorétique de 5-HT localement au niveau du RTN(g). Etude des courants ioniques induits dans les neurones du RTN suite à l'application de 5-HT dans le bain de perfusion. La 5-HT n'induit qu'un faible changement de conductance (h) et ne modifie pas le courant pH sensible (i).

Les panels a-f ont été adaptés de *DePuy et al., 2011*. Les panels g et i proviennent de *Mulkey et al., 2007*.

Plus récemment, les mécanismes impliqués dans ces réponses hypercapniques ont pu être, en partie, mis en évidence. La découverte d'une forte innervation des structures respiratoires par les neurones sérotoninergiques du RO a soulevé l'hypothèse selon laquelle une application locale d'agoniste ou d'antagoniste de la sérotonine serait suffisante pour médier un effet sur le réseau respiratoire. Cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* et *in vivo*. Ainsi une application iontophorétique d'antagonistes des récepteurs $5-HT_{2A}$ au niveau du noyau moteur de l'hypoglosse a un puissant effet dépressant sur la fréquence respiratoire

(Brandes *et al.*, 2006) tandis que l'application d'agoniste 5-HT au niveau du RTN peut, au contraire, stimuler la ventilation (Mulkey *et al.*, 2007).

3.3 - Critique et modèle actuel

Bien que ces nombreux travaux aient permis une meilleure compréhension des mécanismes assurant une modulation de l'activité respiratoire, l'implication des neurones du RO sur ces phénomènes de chémocception centrale suscite encore des débats au sein de la communauté scientifique. Certaines études indiquent une absence quasi-complète de réponse de la part des neurones sérotoninergiques chez les animaux nouveau-nés suite à la réalisation d'un test hypercapnique (Mulkey *et al.*, 2004 ; Veasey *et al.*, 1995). De plus, il a été montré que la mise en place de cette réponse s'établit de manière progressive au cours du développement postnatal (entre P12 et P21 chez le rat, Wang *et Richerson* 1999), rendant peu probable la contribution de ces neurones dans l'établissement d'une réponse hypercapnique aux stades péri-nataux. Chez l'adulte, l'ablation génétique (*Pet1-1^{Cre} ; Lmx1b^{lox/lox}*) ou pharmacologique (système DREADD) des neurones du RO n'abolit que partiellement le chémoréflexe suggérant que ces neurones n'ont pas une place centrale dans ce mécanisme (Ray *et al.*, 2011 ; Hodges *et al.*, 2008).

Les travaux de Mulkey ont permis de démontrer l'implication des canaux potassiques TASK1/3 dans la chémosensibilité des neurones du RO *in vitro*. Cependant, l'étude d'animaux mutants TASK1/3 nuls *in vivo* ne démontre aucune altération du chémoréflexe central au CO₂ (Mulkey *et al.*, 2007) laissant supposer que ces neurones, bien que chémosensibles, ne sont pas nécessaires pour le chémoréflexe central.

D'autres études *in vivo* ont mis en évidence que le taux de décharge des neurones sérotoninergiques était fortement corrélé à l'état de vigilance des animaux. Ainsi, ces neurones présentent un fort taux de décharge au cours des phases d'éveil mais celui-ci diminue dramatiquement au cours de phases de repos jusqu'à devenir quasiment nul durant les phases de sommeil profond (McGinty *and Harper*, 1976 ; Trulson *and Jacobs* 1979). Plus récemment, une étude réalisée chez le chat vigile a démontré que les propriétés propres de chémosensibilité des neurones du RO disparaissaient au cours de ces phases (Veasey *et al.*, 1995). Rappelons ici qu'au cours du sommeil, l'abaissement des fonctions cérébrales et la perte de l'état vigile place les phénomènes de régulation chimique au centre du contrôle respiratoire. De fait la disparition de ces propriétés chémoczeptives au cours de ces stades est

en complète opposition avec le rôle vital qu'ils devraient jouer pour le maintien de la fonction respiratoire. Enfin certains auteurs pointent également le délai très long (plus d'une dizaine de secondes) séparant les réponses observées au sein du RO et l'augmentation de la fréquence respiratoire le rendant incompatible avec une modulation directe de la ventilation (*DuPuy et al., 2011*). Un des modèles actuellement proposé décrit le RO comme un acteur secondaire de la réponse hypercapnique (*Teran et al., 2014*). Dans ce modèle, les neurones du RO seraient capables de détecter des variations de PaCO₂ sanguin et pourraient, via des projections vers d'autres groupes de neurones respiratoires, indirectement augmenter la fréquence ventilatoire. Des expériences supportant ce modèle ont pu être réalisées et mettent notamment en évidence qu'une libération locale de sérotonine au niveau d'une autre structure respiratoire chémosensible, le RTN, ne module pas le courant pH sensible mais permet d'accroître l'activité de ce réseau (**Figure 8**; *Mulkey et al., 2007*).

4. Chémoception centrale par les neurones du RTN

4.1 - Les neurones du RTN possèdent des propriétés chémosensibles

Dès la fin des années 1980, à cause des projections axonales qu'il établit avec d'autres réseaux neuronaux respiratoire du VRG, dont le preBötC, un rôle neuro-modulateur putativement lié aux mécanismes chémocceptifs fut proposé pour le RTN (*Smith et al., 1989* ; *Connelly et al., 1989*). Chez l'animal adulte, le RTN se compose d'une petite collection de neurones bordant latéralement et médialement la surface ventrale du noyau moteur facial et localisé en proche périphérie des vaisseaux sanguins (*Onimaru et al., 2014*). Les premiers indices attestant de la nature chémosensible des neurones du RTN ont été obtenus au début des années 1990. Le Dr. Sato montra que l'exposition de rat, à des conditions hypercapniques provoquait l'expression du gène de réponse précoce *cFos* dans les neurones RTN (*Sato et al., 1992*, *Fortuna et al., 2009*). Quelques années plus tard, il fut démontré, chez le rat conscient ou anesthésié, que la fréquence respiratoire pouvait être rapidement augmentée suite à une acidification locale d'une région délimitant le RTN (*Li et al., 1999*). En réponse à une augmentation de la PaCO₂ au sein du SNC ces neurones peuvent accroître leur fréquence de décharge (*Mulkey et al., 2004*). Enfin, la photo-activation de neurones du RTN préalablement transfectés par un vecteur lentiviral permettant l'expression de canaux ChR2 par les neurones Phox2b positifs, dont les neurones du RTN font partie (PRSX8-ChR2-mCherry), provoque chez l'animal anesthésié une augmentation de la fréquence de décharge du nerf phrénique

associée à un accroissement de l'amplitude des bouffées d'activité motrice (*Abbott et al., 2009*). Inversement, l'inhibition ou l'ablation des neurones du RTN déprime la réponse ventilatoire au CO₂ *in vivo* (*Dubreuil et al., 2008* ; *Takakuda et al., 2008* ; *Marina et al., 2010*). En conclusion, l'ensemble de ces expériences montre que les neurones du RTN peuvent être physiologiquement activés par des chémo-stimulations centrales et périphériques et induisent une augmentation de la ventilation respiratoire.

Des résultats similaires peuvent également être observés sur des préparations réduites pour lesquelles une acidification du bain de perfusion provoque l'augmentation de l'activité de ces neurones (*Ritucci et al., 2005* ; *Lazarenko et al., 2009*) et ce dès les stades embryonnaires (*Dubreuil et al., 2009*). Ces réponses persistent après le blocage pharmacologique des neurotransmissions glutamatergiques, GABAergiques, glycinergiques et purinergiques sous-tendant l'idée que les neurones du RTN possèdent des propriétés de chémosensibilité intrinsèque (*Mulkey et al., 2004*). Plus récemment, en utilisant une lignée transgénique exprimant la protéine rapporteur GFP au sein des neurones Phox2b (*Jx99-Phox2b-GFP*), une étude électrophysiologique sur cellule unique a pu être réalisée sur des neurones du RTN. Il a été observé que la quasi-totalité des neurones GFP-positifs possédaient des propriétés chémosensibles caractérisées par une augmentation de leur taux de décharge neuronale suite à une acidification du milieu extracellulaire. Ces expériences ont permis d'identifier deux types de neurones au sein du RTN. Dans des conditions mimant des états de normocapnie (pH 7.5/ [HCO₃⁻] : 26 mM) les neurones de type I présentent un taux de décharge tonique plus faible que les neurones de type II (2 vs 4 Hz). Suite à l'acidification du milieu de perfusion, bien que ces deux types cellulaires augmentent leur fréquence de décharge, il a pu être mis en évidence que les neurones de type I présentaient une réponse accrue (+300 vs +150% d'augmentation de la fréquence de décharge). L'obtention de ces réponses en absence d'afférences en provenance du réseau permet de conclure indiscutablement sur le caractère chémosensible des cellules constitutives de cet oscillateur (*Wang et al., 2013*). L'existence de ces deux types de réponse ouvre de nombreuses questions quant à l'organisation fonctionnelle au sein de ce réseau.

4.2 - Mécanismes moléculaires

Au milieu des années 2000, il a été suggéré que les réponses électrophysiologiques des neurones chémosensibles en réponse à des variations de CO₂/H⁺ pouvaient être médiées par

INTRODUCTION

la fermeture de canaux potassiques (*Jiang et al., 2005 ; Putnam et al., 2004*). Cette hypothèse était supportée par le fait que les neurones du RTN présentaient la particularité de répondre aux stimulations hypercapniques par une augmentation de leur résistance membranaire ce qui est en accord avec l'existence d'une conductance potassique sensible au pH (*Mulkey et al., 2004 ; Guyenet et al., 2008 ; Kawai et al., 2006*). Bien que les canaux ioniques impliqués dans ce processus restent encore inconnus, l'attention s'est tournée vers les canaux potassiques de type TASK (TWIK-related K⁺ channel) qui présentent une sensibilité au pH (*Bayliss et al., 2001*). Pour autant, l'analyse des modèles de mutants KO pour les gènes TASK1/3 a permis de mettre en évidence que ces canaux ne sont pas impliqués dans les processus de chémosensibilité des neurones du RTN (*Gestreau et al., 2010*) alors qu'ils sont un des acteurs majeurs de la réponse au sein des neurones 5-HT du RO (*Sirois et al., 2000 ; Teran et al., 2014 ; Washburn et al., 2002*).

4.3 - Implication des canaux TASK2 dans la chémosensibilité des neurones du RTN

Grâce à l'utilisation d'une lignée transgénique exprimant la protéine rapporteur β -Galactosidase sous le contrôle du promoteur du gène TASK-2 (*TASK-2^{LacZ}*) l'expression de ce canal a pu être mise en évidence au sein du RTN laissant supposer que ces canaux pouvaient être à l'origine de leur sensibilité au pH. Bien que l'étude des souris KO TASK2^{-/-} montre une réponse hypercapnique accrue, pour de faibles concentrations de CO₂ (<2%) cette réponse évolue peu suite à l'accroissement de la concentration en CO₂ (>5%) et reste, pour ces concentrations, très inférieure aux réponses contrôles. Ces résultats, associés au faible taux d'expression d'ARNm codant ce canal chez les animaux sauvages, semblaient exclure un lien putatif liant expression de ce canal et chémosensibilité des cellules du RTN. Les conclusions de cette étude suggèrent cependant une implication des canaux TASK2 dans le maintien d'un état hyperpolarisé pour des faibles concentrations de CO₂. Cependant ce courant ne semblait pas directement impliqué dans la détection des variations de pH au sein du RTN (*Gestreau et al., 2010*).

Une étude plus récente a permis de nuancer ces résultats. Par enregistrement électrophysiologique d'une large population de neurone du RTN chez les mutants TASK2^{-/-}, les auteurs ont pu mettre en évidence une forte hétérogénéité des réponses alcalines observées chez les mutants. Alors que l'ensemble des neurones enregistrés chez les animaux contrôles présentaient des propriétés chémoceptives leur permettant suite à l'augmentation du pH

extracellulaire de progressivement réduire le taux de décharge jusqu'à devenir silencieux à pH7.8, seule la moitié des neurones enregistrés chez les mutants présentait des réponses similaires. En outre, au sein de cette population, les réponses enregistrées étaient significativement amoindries (**Figure 9**) entraînant qu'une diminution de l'ordre de 40% suite au passage de pH7.0 à 7.8. Concernant la seconde moitié des neurones du RTN enregistrés chez les mutants, ceux-ci ne présentaient aucune réponse suite au changement de pH extracellulaire (pH insensible).

L'étude des transcrits codant pour le canal TASK2 par des approches de RT-PCR met en évidence une expression quasi-ubiquitaire de ce canal au sein du RTN. Cependant il a été observé que seule une fraction de ces neurones exprimait fortement la protéine canal TASK2. De manière intéressante, une corrélation directe a pu être établie entre le taux d'expression protéique et l'implication du canal dans les mécanismes de sensibilité au pH (*Wang et al., 2013 ; Bayliss et al., 2014*).

En conclusion, cette étude démontre une forte hétérogénéité d'expression du canal TASK2 au sein des neurones du RTN. Ce canal est, dans les cellules pour lesquelles il est fortement exprimé, directement responsable de la chémosensibilité intrinsèque. Cependant ce processus moléculaire n'est pas exclusif au sein du réseau et d'autres mécanismes, non encore élucidés, participent à la mise en place de la chémoception au sein de l'oscillateur.

4.4 - Autres mécanismes moléculaires sous-tendant la chémoception intrinsèque au CO₂

De nombreux autres types de canaux potassiques présentent une sensibilité au pH caractérisée par des changements conformationnels provoquant la fermeture des pores suite à une acidification du milieu (*Putnam et al., 2010*). Ces résultats récents ouvrent de nouvelles portes dans la compréhension des mécanismes moléculaires de chémoception. Récemment il a été montré que les neurones pré-I du RTN pouvaient, en présence de TTX, produire des potentiels d'action sous-tendus par une entrée de calcium (*Putman et al., 2010*). Ces résultats relancent le débat sur un possible rôle des canaux calciques et/ou des canaux cationiques non sélectifs de type I_{CAN}. Bien qu'il soit admis que l'accroissement du taux de décharge des neurones de cette structure soit dû à une dépolarisation induite par la baisse des conductances potassiques, ce phénomène pourrait avoir un rôle facilitateur dans la dépolarisation membranaire (*Onimaru et al., 2012*). Notons enfin que certaines études démontrent que près de 20% des neurones du RTN répondent à des variations de pH en ne modifiant pas leur

INTRODUCTION

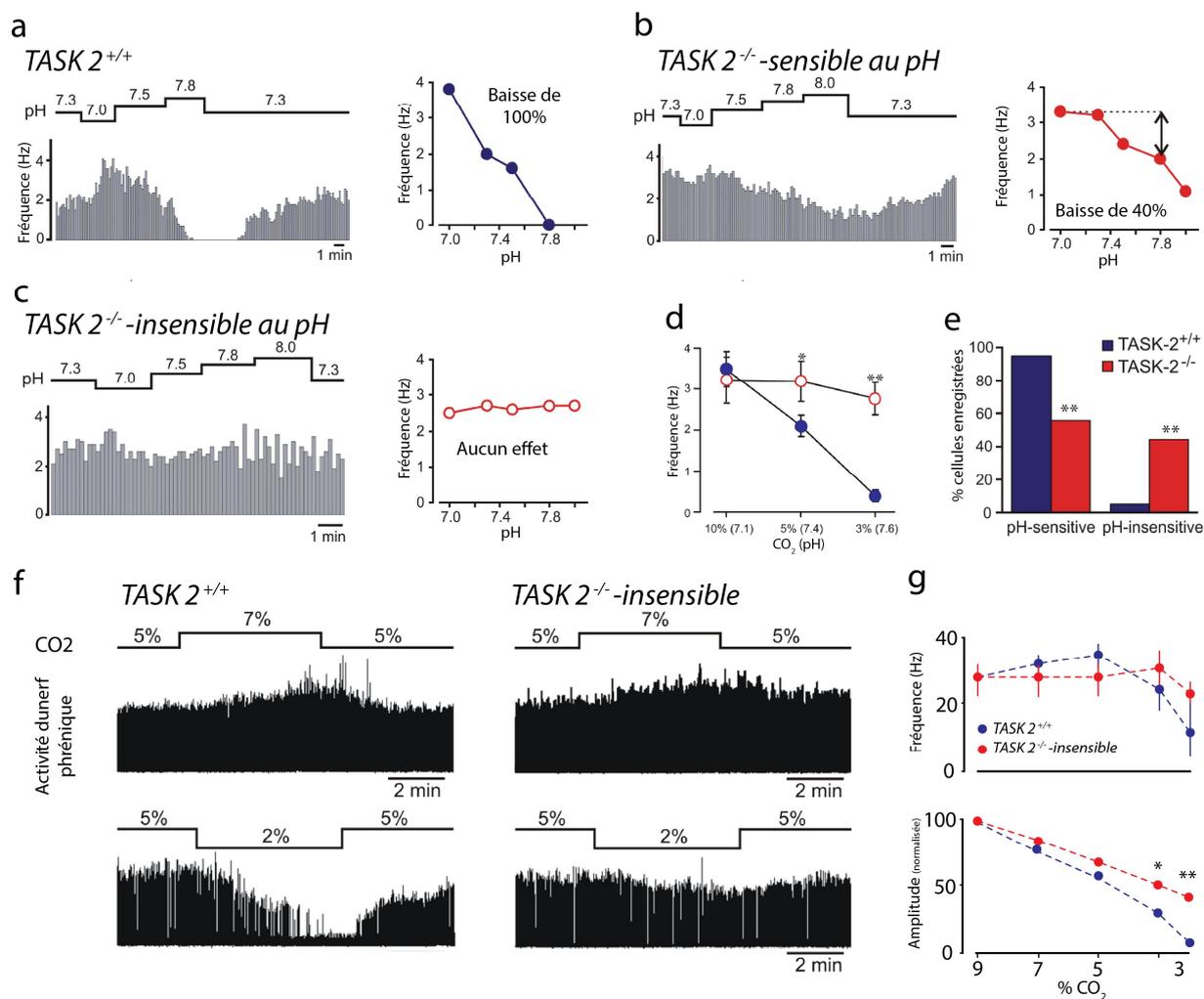


Figure 9: Implication des canaux TASK-2 dans le mécanisme de chémosensibilité intrinsèque des neurones du RTN

(a-e) L'ablation génétique des canaux TASK-2 (*TASK-2^{-/-}*) induit une baisse ou une perte de sensibilité au pH au sein des neurones du RTN. (a) Graphique présentant l'évolution de la fréquence de décharge des neurones du RTN lors de changements de pH extra-cellulaire. L'activité spontanée des neurones est acquise grâce à des approches électrophysiologiques en configuration «cellule attachée». A droite, nous pouvons observer que le passage d'un pH 7.0 à pH 7.8 aboutit à la mise sous silence de l'activité spontanée du neurone. (b et c) Chez les mutants *TASK-2^{-/-}*, l'étude des fréquences révèle la présence de deux populations au sein de l'oscillateur. Une première population (b) composée de neurones pH sensibles mais pour laquelle la variation du pattern de décharge est atténuée par rapport au contrôle (baisse de 40% de la fréquence suite au passage de pH 7.0 à 7.8). Une seconde population (c) pH insensible pour laquelle la fréquence de décharge n'est pas modulée par le pH rendant les neurones de fait toniquement actifs (d). (e) graphique présentant le nombre de cellules pH sensible vs pH insensibles dans un contexte génétique contrôle et mutant. (f) Etude de l'activité électrophysiologique du nerf phrénique sur les préparations *in situ* de préparation de tronc-cérébral, cœur isolé. Chez les animaux sauvages, l'augmentation de la PaCO₂ induit un accroissement de l'amplitude des bouffées d'activités motrices sans modifier la fréquence de décharge. A contrario l'abaissement de la PaCO₂ provoque une diminution progressive de la fréquence et de l'amplitude des activités motrices (g). Chez les mutants *TASK-2^{-/-}*, les réponses générées lors du test hypercapnique sont comparables aux réponses contrôles. Cependant, suite à une baisse de la PaCO₂, nous pouvons observer que la réponse est sévèrement perturbée et préserve une activité rythmique basale même pour de faibles concentrations de CO₂.

Adapté de Wang et al., 2013

conductance ionique (*Kawai et al., 2006*). Dès lors certains auteurs ont avancé des effets liés à une augmentation de la $[H^+]$ sur les systèmes de transport ionique ainsi que sur les pompes électrogéniques. L'étude la plus récente non encore publiée au moment de la rédaction de cette thèse propose que le mécanisme chémosensible complémentaire des canaux Task2 dans le RTN soit des GCPRs en particulier CGR4 (*Guyenet et al., communication personnelle*).

4.5 - Chémoception du RTN et mécanismes paracrines impliquant les astrocytes

Depuis le milieu des années 2000, d'autres théories mettant en jeu un mécanisme paracrine de sensibilité au pH ont vu le jour. Ces théories sont basées sur le fait qu'une partie des cellules gliales présentes à la surface ventrale du bulbe peuvent être dépolarisées par une acidification (*Fukuda et Honda., 1975 ; Ritucci et al., 2005*) et seraient, par la suite, capables d'activer les chémorécepteurs centraux, dont le RTN, via une libération d'ATP (*Spyer et al., 2004*). Cette hypothèse est soutenue par de nombreux travaux. Il a été démontré que l'ATP, impliqué dans la neurotransmission et dans la propagation des vagues calciques astrocytaires (*Guthrie et al., 1999*), peut être libéré *in vivo* à la surface ventrale du tronc cérébral suite à une stimulation hypercapnique (*Spyer et al., 2004 ; Gourine et al., 2005*). Cette augmentation d'ATP précédant d'environ 20 secondes l'augmentation de la fréquence respiratoire, les auteurs ont émis l'hypothèse que la libération d'ATP serait le miroir du stimulus hypercapnique (*Gourine et al., 2005*). L'application iontophorétique d'ATP sur une zone médullaire définissant le RTN peut induire artificiellement une augmentation de la fréquence respiratoire, cet effet pouvant être bloqué par l'application d'antagonistes purinergiques des récepteurs P2X et P2Y comme le PPADS, la Suramine ou le TNP-ATP (*Spyer et Thomas, 2000 ; Gourine et al., 2005*). En 2010, l'équipe du docteur Gourine publia dans le journal Science une étude particulièrement élégante mettant en évidence l'implication du réseau astrocytaire localisé à la surface du RTN dans la réponse hypercapnique (*Gourine et al., 2010*). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des sondes calciques génétiquement codées et adressées aux astrocytes ventraux grâce à des vecteurs viraux (**Figure 10** ; AAV-sGFAP-Case12) et démontrèrent que les astrocytes en contact avec les vaisseaux sanguins pouvaient détecter des variations de pH plasmatique. Cette chémosensibilité propre des astrocytes induit une libération d'ATP provoquant une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones du RTN. La photo-activation des astrocytes ventraux préalablement transfectés avec une construction génétique assurant l'expression du canal photo-sensible ChR2 (AAV-sGFAP-

INTRODUCTION

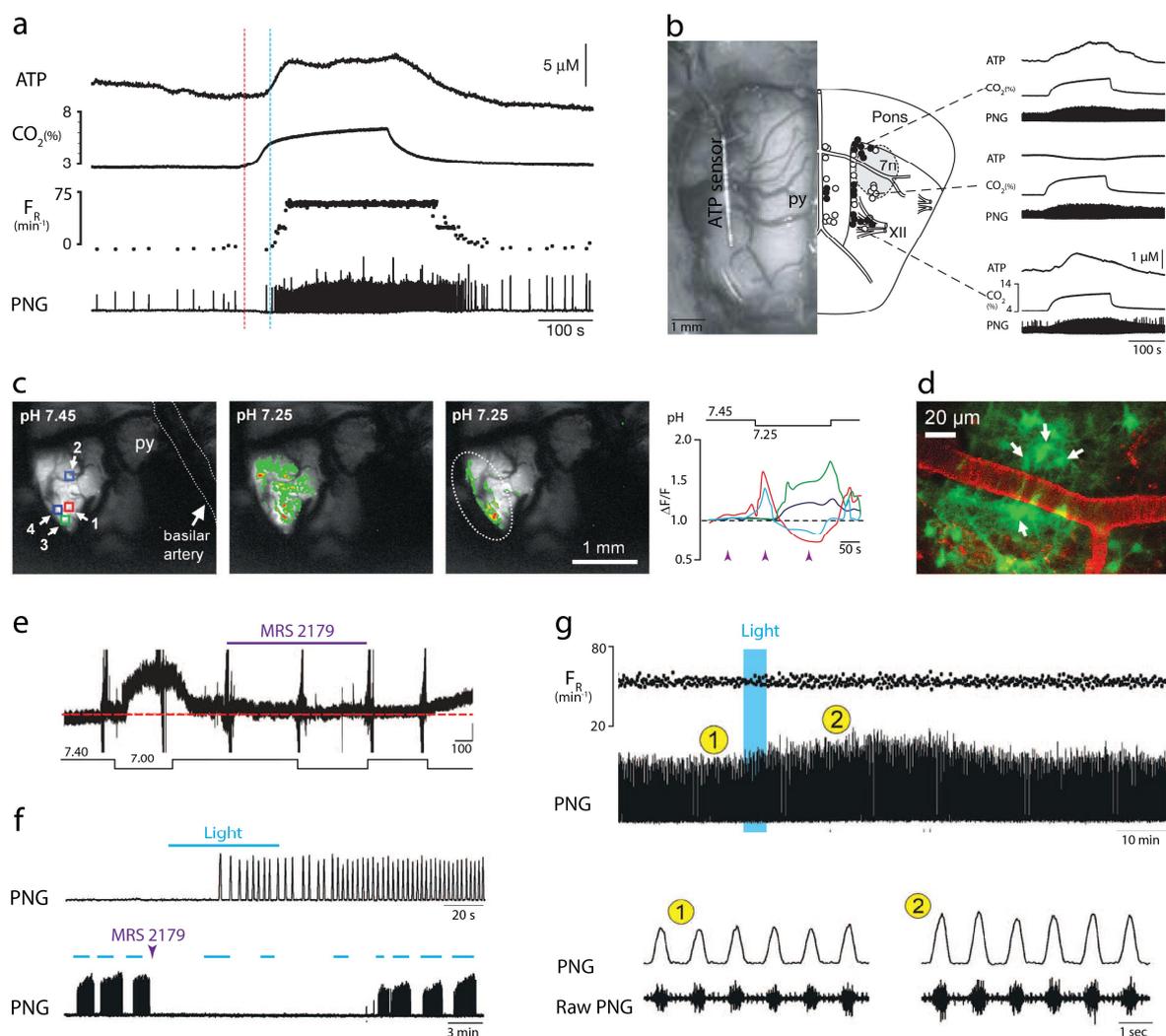


Figure 10 : Les astrocytes participent au contrôle du comportement respiratoire par une libération d'ATP dépendante du pH

(a) Une augmentation de la $p\text{CO}_2$ sanguine (ligne rouge) provoque, *in vivo*, une libération massive d'ATP à la surface ventrale de la médulla (ligne bleue) et induit une accélération de la fréquence respiratoire comme le montre l'enregistrement du nerf phrénique. Cette libération d'ATP est localisée à la surface du tronc cérébral à la surface de zones anatomiques délimitant le RTN, le complexe preBötC et des neurones sérotoninergiques du Raphé Obscurus (b). Les ronds pleins représentent les positions pour lesquelles un accroissement de la $p\text{CO}_2$ induit une augmentation de la concentration d'ATP, les vides celles pour lesquelles aucune réponse n'a pu être observée. (c) Les astrocytes localisés à la surface ventrale du RTN sont sensibles à des variations de pH. Expériences d'imagerie calcique *in vivo* présentant la réponse astrocytaire induite par une diminution locale du pH. L'activité des cellules astrocytaires a pu être suivie suite à leur transfection avec une sonde calcique codée génétiquement (*AVV-sGFAP-Case12*). A droite sont présentés les changements de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enregistrés au niveau des quatre régions d'intérêt définies sur le panel de gauche. Les flèches représentent le temps auquel ont été obtenues les images. Nous pouvons observer qu'une diminution du pH provoque des vagues d'activation calcique au sein du réseau astrocytaire. (d) L'étude de la localisation des astrocytes chémosensibles (flèches blanches) révèle que ces cellules sont positionnées au voisinage des vaisseaux sanguins (marquage de la lectine présenté ici en rouge). (e) Enregistrement de l'activité électrophysiologique d'un neurone du RTN. L'acidification du milieu de culture organotypique provoque une dépolarisation membranaire et l'émission de potentiels d'actions. Cet effet peut être bloqué suite à l'application d'un agoniste des récepteurs purinergiques P2Y, le MRS2179. L'activation optogénétique des populations astrocytaires localisées à la surface du RTN stimule l'activité respiratoire *in vivo*. La photoactivation unilatérale des astrocytes exprimant le Chr2 (*Chr2(H134R)-Katushka1.3*) est suffisante pour déclencher l'activité respiratoire chez un rat anesthésié maintenu en apnée hypocapnique. Cet effet est bloqué suite à l'application de MRS2179 (f). Chez un animal éveillé, l'activation de ces populations astrocytaires ne modifie pas la fréquence respiratoire mais accroît l'activité du nerf phrénique (g). Les parties (1) et (2) représentent des agrandissements du tracé présenté dans la partie supérieure.

Les panels a & b ont été adaptés de *Gourine et al., 2005*. Les panels c-g proviennent de *Gourine et al., 2010*

ChR2(H134R)-Katushka1.3) provoque une augmentation de l'activité du nerf phrénique chez des animaux anesthésiés, vagotomisés et ventilés artificiellement. Cet effet peut être bloqué par l'application locale d'antagonistes des récepteurs purinergiques P2Y, tel le MRS 2179, au niveau des neurones du RTN démontrant que l'effet observé est dû à une activation de ces neurones suite à une libération d'ATP par les astrocytes. Cependant des résultats plus nuancés ont été observés dans les expériences *in vitro*. Dans ces conditions, les neurones du RTN semblent être peu activés suite à l'application d'agoniste des récepteurs P2Y (Mulkey et al., 2006). Ces résultats suggèrent que si ce phénomène d'activation par l'ATP existe, il est possible qu'il ne puisse être observé qu'*in vivo* et que d'autres processus biologiques générés au sein des cellules gliales (tel le DIA, « depolarization induced alkalosis » à l'origine d'une libération importante de protons dans le milieu extérieur) puisse également participer à la genèse de ces réponses chémosensibles (Erlichman et al., 2008). Enfin, une étude publiée en 2007 met en évidence que les neurones du preBötC expriment certaines sous-unités de récepteurs purinergiques et que l'application iontophorétique d'ATP au niveau de cet oscillateur provoque, *in vitro*, une accélération des décharges inspiratoires (Lorier et al., 2007). Ces travaux ouvrent de nouvelles pistes quant à une possible régulation de l'activité respiratoire par l'ATP directement au niveau du générateur inspiratoire.

En conclusion, il n'y a pas de raison forte de ne pas concevoir un rôle du RTN possiblement en association avec un rôle des astrocytes. Une réponse définitive sera apportée par l'élucidation du mécanisme complétement les TASK dont l'invalidation conjointe dans les neurones du RTN devrait amener à une perte totale de la chémoréponse.

5. RTN et pathologies respiratoires

5.1- Etude du syndrome d'Ondine

Le dérèglement neural de la respiration définit ou complique de nombreuses maladies : le Syndrome d'Ondine ou Syndrome d'Hypoventilation Centrale Congénitale (CCHS en anglais) , le syndrome de Rett (Ogier et Katz., 2008) , l'atrophie multisystématisée , entre autres. Il explique probablement une partie des morts subites du nourrisson (sudden infant death syndrome, SIDS) . Il est souvent la cause proximale de mort dans la maladie de Parkinson (Dutschmann et al., 2010), la maladie d'Alzheimer (Dutschmann et al., 2010), l'atrophie multi-systématisée (Benarroch et al., 2007) et la sclérose en plaques (Nogues et

INTRODUCTION

Benaroch., 2008). Cependant, les deux principaux défis de santé publique impliquant le contrôle neural de la respiration restent, par leur importance statistique et les chances d'intervention thérapeutique : i) l'immaturité respiratoire du prématuré, et ii) les troubles respiratoires du sommeil. Bien que le trouble respiratoire le plus fréquent, l'apnée obstructive du sommeil, soit causé principalement par l'obstruction des voies respiratoires, il est de mieux en mieux documenté qu'il est facilité par des défauts du contrôle neural de la respiration et que les instances répétitives d'hypoxie et d'hypercapnie qui en résultent causent à leur tour des perturbations du contrôle central. Rappelons enfin que le dysfonctionnement respiratoire central est une complication majeure de l'insuffisance cardiaque congestive. La correction des troubles du contrôle neural de la respiration exigera une compréhension des circuits neuronaux impliqués dans la genèse et la robustesse du rythme respiratoire et dans le chémoréflexe central (c'est-à-dire l'hyperventilation en réponse à l'hypercapnie), ce dernier considéré comme un moteur essentiel de la respiration.

Le contrôle central de la respiration est affecté dans de nombreuses pathologies, dont une part peuvent avoir des origines génétiques et/ou congénitales. La plupart de ces désordres respiratoires présentent généralement une symptomatologie complexe impliquant de nombreux facteurs, liés au dysfonctionnement d'une ou plusieurs régions du cerveau, à des processus physiologiques liés à l'âge, à l'environnement et/au contexte sociétal. En conséquence, la recherche sur ces maladies se est souvent focalisée sur des sites candidats, définis par un phénotype de neurotransmission et supposés impliqués, sur la base d'arguments divers, dans la respiration. C'est le cas des neurones noradrénergiques dans le syndrome de Rett ou les neurones sérotonergiques dans le SIDS, en vertu, comme nous venons de le voir, du rôle possible, mais controversé, de ces derniers dans la chémoréception centrale.

Un contre-exemple frappant est le Syndrome d' Ondine pour lequel les symptômes sont bien définis et pénétrants. Définie dès 1970 (*Mellins et al., 1970*), cette pathologie génétique rare se caractérise par l'abolition de la réponse hypercapnique associée à des arrêts respiratoires chez les nouveaux nés. Ceux-ci peuvent, dans les cas les plus dramatiques, aboutir au syndrome de la mort subite du nourrisson qui reste encore actuellement la première cause de mortalité des enfants de moins de 1 an sur le continent Nord-Américain avec une prévalence de 1 cas sur 100 000 naissances. Plus tardivement, ces phases d'apnées se cantonnent progressivement aux périodes de sommeil (syndrome central d'apnée du sommeil ou CSAS). Le fait que, chez l'adulte, seules les détections des variations de PaCO₂ permettent

de moduler le comportement respiratoire au cours du sommeil pourrait expliquer l'apparition des phases « d'apnée du sommeil ».

Les études cliniques effectuées depuis les années 1980 ont pu mettre en évidence de nombreuses anomalies « satellites » chez les patients atteints de CCHS. Parallèlement aux symptômes cardinaux précédemment décrits, certains patients peuvent développer des arythmies cardiaques, des troubles de la déglutition alimentaire (dysphagie), des troubles de la motricité oculaire intrinsèque, des neuroblastomes ou des aganglionoses intestinales (maladie de Hirschsprung) (*Weese-Mayer., 2010 ; Trang et al., 2005*). L'ensemble de ces syndromes dérivant pour tout ou partie des pathologies impliquant des défauts touchant la crête neurale permet de classer le CCHS comme une dysautonomie neurovégétative. De plus, chacun des symptômes est lié à des perturbations du système nerveux autonome (ou SNA) dont un des déterminants moléculaires de spécification est le facteur de transcription *Phox2b*. De fait, ces observations ont fait émerger la possibilité que des altérations de ce gène pourraient être causales de la pathologie.

5.2- Le facteur de transcription Phox2b, un déterminant du système nerveux autonome

Le système nerveux central, comme tout organe, se forme sous le contrôle de l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription. Ces facteurs de transcriptions, exprimés en combinaisons variées, appelées communément « des codes transcriptionnels », spécifient des régions du cerveau et, subséquentement, la multitude des types neuronaux qui en émergent. Ce système extrêmement combinatoire entraîne le fait que le patron d'expression d'un facteur de transcription considéré individuellement, dans le cerveau en formation, a une faible valeur prédictive en ce qui concerne la connectivité et la fonction des neurones qu'il contient. Un facteur de transcription, de façon énigmatique, semble s'inscrire en faux : le facteur Paired-like homeobox gene *Phox2b*, qui est spécifiquement exprimé et requis pour la survie de l'ensemble des neurones destinés à constituer les circuits réflexes viscéraux contrôlant les fonctions digestive, cardio-vasculaire et respiratoire (*Brunet et Goridis 2008*).

L'expression de *Phox2b* est strictement confinée au système nerveux central et périphérique (*Pattyn et al. 1997*) et en leur sein à quelques types neuronaux. Dans toutes les structures examinées, l'expression de *Phox2b* dans le système nerveux central est détectée dans les progéniteurs neuronaux en division ou dès leur sortie du cycle cellulaire dans les

INTRODUCTION

précurseurs neuraux ; dans le système nerveux périphérique dès l'apparition de la formation des ganglions.

Les types neuronaux exprimant *Phox2b* qui semblent a priori former un ensemble aléatoire, semblent en fait l'incarnation du concept anatomique de Blessing (*Blessing , 1997, Anatomy of the lower brainstem*) les regroupant en « visceral neurons, afferent and efferent » neurones viscéraux afférents et efférents, en remplacement du concept confus de système nerveux autonome, c'est-à-dire l'ensemble des neurones qui maintiennent l'homéostasie de l'organisme à travers le contrôle réflexe des fonctions digestive, cardiovasculaire et respiratoire. Sur le plan afférent, du réflexe viscéral, *Phox2b* est exprimé par les neurones sensoriels primaires qui forment les trois ganglions distaux des nerfs crâniens VII (facial), IX (glossopharyngien) et X (vague), les ganglions géniculé, pétreux et noueux ainsi que les corps carotidiens, un organe chémosenseur présynaptique du ganglion pétreux. *Phox2b* est aussi exprimé dans les cibles centrales de ces afférences, dans les neurones viscéraux secondaires du tronc cérébral formant le noyau du tractus solitaire (NTS) et dans les aires chémosensibles qui lui sont associées comme l'area postrema. Sur le plan des efférences, on retrouve l'expression de *Phox2b* au niveau de tous les ganglions autonomes (sympathiques, parasympathiques et entériques) ainsi que dans leurs partenaires présynaptiques, les neurones préganglionnaires aussi connus sous le nom de neurones de la motricité viscérale générale du tronc cérébral - à l'exception notable des neurones pré-ganglionnaires sympathiques localisés dans la moelle épinière. En revanche, les neurones prémoteurs sympathiques, au moins la très large majorité d'entre eux (formant le groupe adrénérique C1) expriment *Phox2b* ainsi que les neurones dit branchiomoteurs localisés dans les noyau moteurs du V (trijumeau), VII , IX (nucleus ambiguus) et du XI (noyau spinal accessoire), innervant les muscles moteurs de la face et du cou. Ces derniers ne sont ni inclus dans le concept de système nerveux autonome, ni dans celui de Blessing (qui les caractérise de motoneurones somatiques). Dans une perspective zoologique plus globale, il apparaît que chez les vertébrés aquatiques, ce sont bien par exemple les neurones branchiomoteurs en innervant les muscles des branchies qui sont responsables du contrôle de la fonction respiratoire, une des trois fonctions viscérales cardinales. De plus, leurs cibles (les muscles dérivant des arcs branchiaux) sont ontogénétiquement assez distincts de celles dérivant des somites qui sont innervés par des motoneurones somatiques. Enfin leur code transcriptionnel (*Phox2b⁺/Tbx20⁺/Hb9⁺,Lhx3/4*) et leur origine (dans le domaine du neuroépithélium le plus ventral : le pMNv) sont identiques à ceux dont dérivent les neurones viscéromoteurs généraux.

Il apparaît donc de façon claire, que *Phox2b* est exprimé, de façon spectaculaire, par trois, quatre ou cinq relais neuronaux (à l'exception près déjà mentionnée des pré-granglionnaires sympathiques) au sein des circuits réflexes viscéraux digestif, cardiaque et respiratoire. Il s'agit de très loin du plus bel exemple de corrélation entre expression d'un facteur de transcription et la formation d'un circuit neuronal. Il faut remercier ici Christo Goridis et Jean-François Brunet de l'ENS qui sont les grands découvreurs et débrouailleurs de cet exceptionnel déterminant cellulaire. Deux autres exemples notables mais moins complets sont d'une part *DgrII* dans les neurones sensoriels somatiques primaires et secondaires (*Chen et al., 2001*) et *Math1* (maintenant *Atoh1*) dans les circuits proprioceptifs (*Bermingham et al., 2001*).

5.3- *Phox2b* et fonction respiratoire

Concernant le contrôle neural de la respiration, l'appréciation du rôle de *Phox2b* a été largement contrainte par les complexités intrinsèques de la fonction et de ses bases anatomiques chez les vertébrés terrestres et par la létalité embryonnaire de la mutation nulle de *Phox2b* empêchant toute investigation physiologique.

Lorsqu'on apparaît la vie terrestre, le contrôle musculaire de la respiration est alors imparti à des muscles squelettiques, innervés par des motoneurones somatiques (qui n'expriment pas *Phox2b*). En parallèle, la respiration semble évoluer, d'une fonction purement homéostatique à une fonction partiellement non-homéostatique, volontaire relationnelle et émotionnelle (incluant vocalisation, rire, sanglots, éternuements, etc.). Mais la forme respiratoire ancestrale comme indiquée plus haut reposait sur des neurones exprimant *Phox2b* qui sont encore conservés chez les mammifères. Si les muscles contrôlant les branchies ont disparu les neurones viscéraux moteurs spéciaux ou branchiomoteurs innervent encore les muscles des voies aériennes supérieures pour en réguler la résistance (upper airway patency). Sur le plan des afférents réflexes respiratoires, les conservations sont encore plus spectaculaires, au sein du ganglion géniculé qui comprend les corps cellulaires des récepteurs directement des poumons à l'origine du réflexe de Hering-Breuer, les corps carotidiens (contenant des senseurs de pO_2 et dans une moindre mesure du CO_2), le ganglion pétreux (innervant les corps carotidiens) et le NTS (intégrant les afférences chémo- et barosensorielles). De plus, *Phox2b* est aussi requis pour la formation de tous les centres noradrénergiques, parmi lesquels A5 et le Locus Coeruleus qui interviennent de façon antagoniste dans la modulation de la commande rythmique respiratoire (voir pour une revue

INTRODUCTION

du sujet *Hilaire et al., 2004*). Il convient de mentionner que la medulla ventro-latérale du tronc cérébral contient de nombreux autres neurones exprimant *Phox2b* dont le statut fonctionnel reste à définir.

5.4- Phénotype des mutants *Phox2b*

Les souris mutantes nulles pour *Phox2b* meurent autour du jour embryonnaire 12 (E12) de détresse cardiaque (*Pattyn et al., 1999*), mais peuvent être sauvées jusqu'à un stade prénatal par administration chez la mère gestante d'agonistes noradrénergiques (*Pattyn et al., 2000*). L'examen des embryons mutants entre E10.5 et E18.5 montre que dans leur très grande majorité les structures neurales exprimant *Phox2b* sont absentes et sont, par les déficiences fonctionnelles qu'elles occasionnent, responsables de la mort des individus. En périphérie, les neurones sympathiques, parasympathiques et entériques ainsi que les corps carotidiens sont absents et les ganglions géniculé, pétreux et noueux sont massivement atrophiques. Dans le tronc cérébral, les noyaux branchiomoteurs et viscéraux moteurs, le NTS, l'area postrema, et tous les centres (nor)adrénergiques sont absents (*Pattyn et al., 2000*). Le destin des populations neurales non identifiées fonctionnellement de la medulla ventro-latérale n'a pas été examiné. La différenciation des neurones *Phox2b*-dépendants est stoppée très rapidement dans toutes les populations considérées et mène soit à la mort cellulaire soit à un changement des destins cellulaires. Par exemple, en périphérie, les précurseurs neuronaux entériques envahissent bien l'oesophage mais sont incapables d'activer le gène *Ret*, ne migrent jamais au-delà de l'estomac antérieur et ensuite dégèrent. Les précurseurs sympathiques s'agrègent normalement à proximité de l'aorte dorsale mais ne se différencient jamais et disparaissent ensuite par apoptose (*Pattyn et al., 1999*). Dans le système nerveux central, les neurones branchiomoteurs et viscéromoteurs ne se forment pas alors que les précurseurs du NTS naissent mais migrent anormalement, certains survivent mais sont probablement re-spécifiés vers un autre destin cellulaire. Ainsi dans la très grande majorité des cas, la perte d'expression de *Phox2b* entrave les aspects multiples de la différenciation cellulaire. La cause encore inconnue de ces effets pleiotropiques pourrait être l'existence d'une palette large de cibles transcriptionnelles de *Phox2b*, une position haute de *Phox2b* dans la cascade transcriptionnelle ou les deux.

Une structure fondamentale manquante à notre description des populations neuronales « viscérales », est le RTN (montré de façon opportuniste dès 2006 comme exprimant *Phox2b* par *Stornetta et al.*), dont le rôle est « central » dans cette thèse, et qui émergera

définitivement de la confrontation de données, de la génétique humaine appliquée à la pathologie respiratoire, et de celles, récemment acquises, sur l'émergence des oscillateurs respiratoires chez l'embryon. Ces données seront présentées maintenant.

5.5- Le CCHS est provoqué par une mutation au locus *PHOX2B*

Dans une étude publiée dans le journal *Nature Genetics* au cours de l'année 2003, Amiel et al. démontrent, chez des patients atteints de CCHS, la présence de mutations *de novo* du locus *PHOX2B*. Ces mutations dominantes consistent majoritairement en des expansions anormales et variables d'un segment de 20 résidus alanine situé en partie C-terminale de la protéine (mais aussi des mutations de changement de cadre de lecture et de mutations non-sens). Ces mutations ne sont probablement pas des mutations nulles qui résulteraient en une simple haplo-insuffisance. En effet, chez la souris, les mutants hétérozygotes *Phox2b* présentent un phénotype respiratoire bien moins sévère et chez les patients présentant des délétions hétérozygotes dans la région *PHOX2B* le CCHS n'apparaît pas (Weese -Mayer et al., 2005). De plus, différentes mutations de *PHOX2B* sont associées à différentes combinaisons et fréquences de symptômes (Gaultier et al. 2004). Ainsi, la protéine mutante qui cause le CCHS semble agir par un mécanisme dominant négatif ou par un effet gain-de-fonction toxique. La mutation humaine la plus fréquemment associée au CCHS, consiste en un allongement de +7 résidus Ala (Matera et al., 2004). Pour rechercher l'origine des perturbations expliquant les déficits respiratoires du CCHS, le laboratoire de Jean-François Brunet a introduit par Knock-In (KI) la mutation +7 Ala chez la souris (allèle *Phox2b*^{27Ala}, un allongement par 7 résidus de la série de 20 alanines). La descendance des chimères de ce KI est dépourvue de chémoréflexe au CO₂ et meurt à la naissance d'irrégularité du rythme respiratoire, fournissant donc une excellente phénocopie de la mutation humaine (Dubreuil 2008). Sur le plan histologique, on observe une atrophie, à la naissance, d'un petit groupe de neurones *Phox2b*⁺ sous le noyau moteur de nerf facial, le noyau respiratoire parafacial (pFRG), objet depuis quelques années de travaux physiologiques sur le réflexe chémosensible (Guyenet et al., 2008). Les nombreuses autres structures exprimant *Phox2b* ne semblant pas être altérées par la mutation, ces observations suggèrent d'une part que les neurones du pFRG possèdent une sensibilité particulière à la mutation *Phox2b*^{27Ala}, et d'autre part, que leur disparition est suffisante pour expliquer les symptômes observés et la mort des animaux.

III. Développement du tronc cérébral

Il semble nécessaire de présenter ici quelques notions concernant le développement du rhombencéphale essentiellement pour introduire les acteurs moléculaires qui seront utilisés dans ce travail de thèse pour disséquer le circuit chémo-réflexe. La présentation qui suit est donc rédigée dans ce seul but et fera l'économie d'une présentation des mécanismes fins des régulations moléculaires mentionnées.

Au cours du développement, les régionalisations antéro-postérieure et dorso-ventrale du tube neural sont responsables de l'acquisition des informations positionnelles nécessaires à la spécification des différents lignages cellulaires du tronc cérébral. Celles-ci permettent une assignation des destins cellulaires au sein des domaines de progéniteurs restreints occupant une position spatialement définie (*Jessell, 2000*).

1. Régionalisation dorso-ventrale

La signalisation selon l'axe dorso-ventral a été 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.

Cette organisation dorso-ventrale résulte de l'action de gradients de morphogènes. Les domaines dorsaux sont induits par des morphogènes dits dorsalisants appartenant à la famille des Bone Morphogenic Proteins (BMPs), des Facteurs de Croissance Fibroblastiques (en anglais FGFs) et des protéines Wnts (notamment *Wnt1* et *Wnt3a*). Ces signaux proviennent du neuro-ectoderme 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 sont induits par la protéine sécrétée Sonic hedgehog (Shh) (*Pattern and*

(Placzek, 2000), en provenance successivement de la notochorde, structure du mésoderme axial, puis des cellules de la plaque du plancher. 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, un code transcriptionnel, propre (**Figure 11**). Celui-ci est à l'origine d'une cascade d'expression génique aboutissant à la différenciation d'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 sont, comme les progéniteurs leur donnant naissance, caractérisés par une combinatoire d'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. Ainsi, les progéniteurs sont distribués en domaines dorsaux dp1 à dp6 ou,

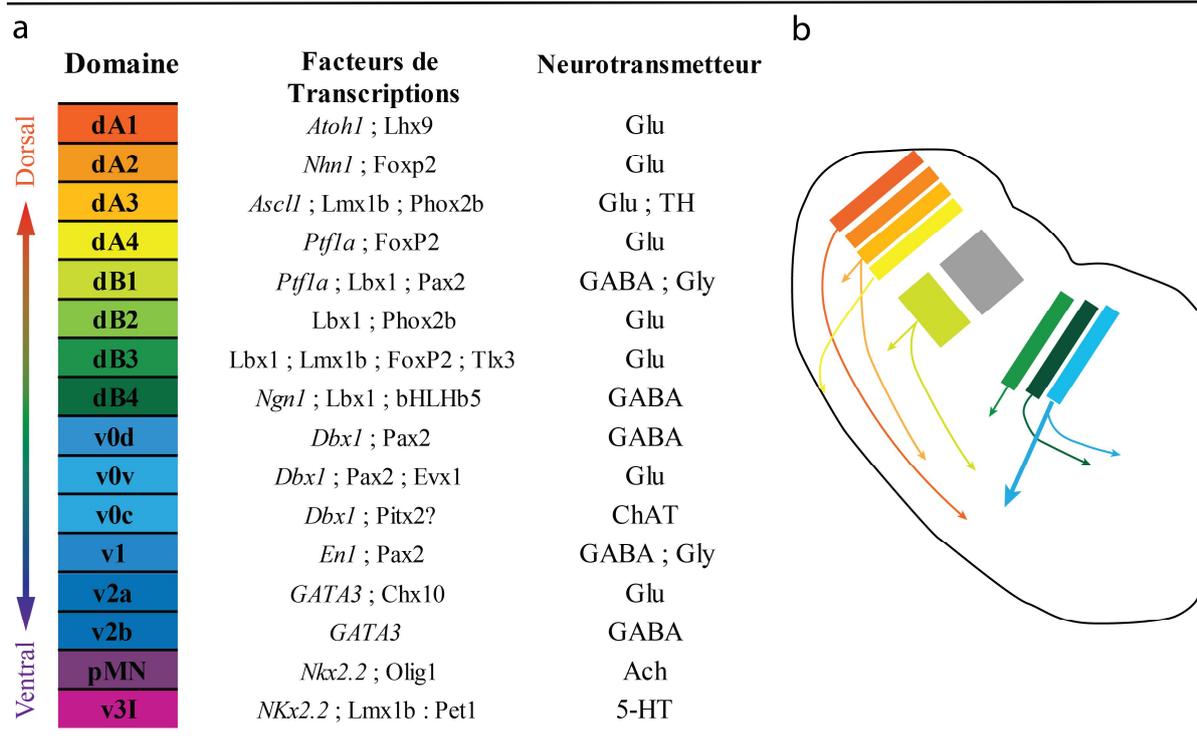


Figure 11 : Diversité génétique des neurones du tronc cérébral

(a) Table descriptive des différents domaines progéniteurs au sein du tronc cérébral. Ces progéniteurs se divisent en 8 domaines dorsaux (dA1 à dB4) et huit ventraux (v0 à v3I) en fonction de leur localisation ventro-dorsale relative au cours de l'embryogénèse. Au milieu sont notifiés de manière non exhaustive la liste des principaux facteurs de transcription exprimés au cours des phases mitotiques (italique) et post-mitotiques au sein de chaque domaine. A droite l'identité des neurotransmetteurs des neurones dérivant de ces domaines de progéniteurs. (b) Schéma montrant la localisation ainsi que les principales voies de migrations (flèches) des neurones issus des domaines de progéniteurs présentés en (a).

Adapté de *Gray et al., 2013*

INTRODUCTION

selon la nomenclature de Müller et al., 2002, 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, 1997*).

Les neurones de classe B, au contraire des neurones de classe A, expriment le gène Lbx1 (homologue du gène *LadyBird early/late* isolé chez la Drosophile) (*Muller et al., 2002; Sieber et al., 2007, Gross et al., 2002*) tout au long de la moelle épinière. Les neurones viscéraux exprimant Phox2b sont produits à partir de progéniteurs localisés à trois niveaux dorso-ventraux distincts : le domaine dA3, le domaine dB2 (confiné aux rhombomères 2 à 7, voir plus bas) et le domaine de progéniteur le plus ventral (appelé p3 dans la moelle épinière donnant naissance à des interneurons V3, qui est remplacé dans le tronc cérébral, par le domaine pMNv) donnant naissance au motoneurons viscéraux (vMN).

Il a pu être démontré que l'induction ectopique d'une expression de Lbx1 plus dorsale provoque une re-spécification des neurones de classe A vers une identité de classe B (*Gross et al., 2002; Muller et al., 2002*). A contrario, chez les mutants nuls Lbx1, les neurones originaires du domaine dB3 expriment de manière ectopique le facteur de transcription *Phox2b*. Cette nouvelle combinatoire Lmx1b, Tlx2, Phox2b provoque une disparition du noyau spinal du nerf trijumeau, un important accroissement du NTS ainsi que l'augmentation du nombre des neurones catécholaminergiques du Locus Coeruleus en accord avec une re-spécification des neurones de classe B en neurones de classe A (*Sieber et al., 2007*).

2. Régionalisation antéro-postérieure

Nous venons de voir que la génération de sous-types neuronaux variés pendant l'embryogenèse repose sur des mécanismes de signalisation et de régionalisation opérant selon l'axe dorso-ventral. Ceux-ci ne peuvent suffire à expliquer toute la diversité neuronale au sein du système nerveux dans son ensemble. La signalisation dorso-ventrale opère en effet de façon coordonnée avec une régionalisation selon l'axe antéro-postérieur (AP) influençant axialement les destins cellulaires. Cette régionalisation AP connue sous le nom de segmentation du rhombencéphale correspond à la mise en place d'une série de compartiments génétiquement et anatomiquement distincts, les rhombomères (r); on parle d'ailleurs ici de segmentation du rhombencéphale (*Lumsden and Keynes., 1989*). Cette métamerisation du tube neural, conservée chez les vertébrés, est réalisée de façon transitoire pendant la deuxième moitié du premier mois de grossesse chez l'homme, entre E1 et E4 chez le poulet et entre E8

et E12 chez la souris. Elle conduit à la formation transitoire de 7 ou 8 rhombomères, 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 (**Figure 12**).

L'organogénèse du tronc cérébral reflète cette organisation segmentée, certains types cellulaires étant réitérés, par exemple les neurones réticulaires forment des « homologues segmentaires » (*Clarke & Lumsden, 1993*). En revanche certains types cellulaires sont selon les rhombomères sélectivement présents (i.e. les neurones efférents cochléaires seuls présent en r4 *Simon & Lumsden, 1993*) ou absents (i.e. les neurones sérotoninergiques ne se forment pas dans r4, *Pattyn A et al., 2003*). Les programmes de spécifications cellulaires peuvent aussi intéresser des paires de rhombomères, par exemple, les neurones branchiomoteurs (exprimant *Phox2b*) du trijumeau, du facial et du glossopharyngien (nerf crânien V, VII et IX) projetant chacun dans un arc branchial sous-jacent, sont issus respectivement des paires de rhombomères (r2,r3), (r4,r5) et (r6,r7) et quittent le tronc cérébral par un point de sortie localisé dans le rhombomère pair correspondant. Cette distribution alternée (un rhombomère sur deux) de la sortie des nerfs crâniens est sans doute le trait anatomique conservé chez l'adulte le plus immédiatement notable. Les premières activités électriques dites primordiales apparaissent juste avant la disparition des limites rhombomériques à E10.5 comme une signature fonctionnelle des spécifications cellulaires réalisées (*Abadie et al., 2000*, voir aussi *Fortin et al., 1994a,b*). Par son influence sur le déploiement des cellules de la crête neurale, la segmentation du rhombencéphale, influence non seulement les propriétés anatomiques du tronc cérébral en contrôlant le positionnement des registres cellulaires mais aussi l'anatomie de la tête dans son ensemble (*Lumsden, 1990*).

2.1- 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 de chaque rhombomère (code homéotique, **Figure 12**). 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 antérieures d'expression correspondent avec les limites inter-rhombomériques (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*). Si

INTRODUCTION

l'identité des rhombomères est déterminée par l'expression des gènes Hox, la façon dont ces derniers sont activés et maintenus à des niveaux axiaux appropriés reste énigmatique. Parmi les mécanismes supposés réguler leur expression on peut évoquer : une régulation croisée entre gène Hox (*Lumsden and Krumlauf, 1996 ; Gavalas et al., 1998 ; Tümpel S et al., 2009*), l'influence de l'acide rétinoïque (*Conlon and Rossant, 1992 ; Marshall et al. 1994 ; Dupé and Lumsden, 2001*), des facteurs de croissance (en particulier le FGF) (*Marin and Charnay, 2000 ; Maves et al. 2002 ; Walshe et al., 2002*) ainsi que le contrôle de leur expression par d'autres facteurs de transcription en particulier Krox20 et MafB/kreisler.

2.2- Krox20

Le gène *Krox20* (aussi appelé *Egr2*) code pour une protéine comprenant trois « doigts de zinc » qui constituent les sites de fixation à l'ADN. Chez la souris le gène *Krox20* est exprimé au sein de deux domaines transversaux de progéniteurs disjoints suivant l'axe antéro-postérieur coïncidant aux rhombomères 3 et 5 (*Chavrier et al., 1988 ; 1989 ; Wilkinson et al., 1989 ; Schneider-Maunoury et al., 1993, 1997*). Le rôle de *Krox20* dans la régulation d'autres gènes *Hox* a été étudié sur deux gènes paralogues *Hoxa2* et *Hoxb2* (*Sham et al., 1993 ; Nonchev et al., 1996*). La limite antérieure d'expression du gène *Hoxb2* est r2/r3 mais il est plus fortement activé dans les rhombomères 3,4 et 5 et c'est en fait *Krox20* qui induit l'expression de *Hoxb2* en r3 et r5. C'est aussi le cas pour *Hoxa2*. De façon comparable, *MafB/kreisler* exprimé dans les rhombomère 5 et 6 y induit l'expression de *Hoxa3* et celle uniquement dans r5 de *Hoxb3* grâce à des sites de régulation différents (*Manzanares et al 1997 ; 1999*). La régulation de *Hoxb3* en r5 se fait en coopération avec *Krox20* (*Manzanares et al. 2002*). Ces travaux n'illustrent qu'une infime partie des régulations en cours et mettent en évidence la difficulté de la compréhension de l'aspect séquentiel de ces événements. Comment alors *Krox20* est-il premièrement activé ? Quels sont les mécanismes assurant l'engagement des cellules à exprimer un gène, relèvent-ils de déterminants intrinsèques hérités de façon asymétrique pendant la division cellulaire ou extrinsèques fournis dans l'environnement cellulaire ? Ou les deux ? Et quand un choix a été fait, comment est maintenu l'engagement pour préserver l'intégrité d'un tissu ou l'aspect directionnel d'un processus de développement. Le lecteur intéressé par ces questions verra qu'un scénario moléculaire sous-tendant le choix d'un destin cellulaire a été récemment proposé à partir de l'étude des éléments de régulation de *Krox20* (*Bouchoucha et al. 2013*). Nous avons déjà mentionné que des variations des programmes de spécification dorso-ventrale peuvent survenir en vertu du niveau axial considéré i.e. d'un rhombomère à un autre (voir aussi *Ericson et al., 1995 ;*

Vallstedt et al., 2005) et au sein d'un domaine dorso-ventral de progéniteur ces choix semblent faire l'objet d'une régulation temporelle (*Dias et al., 2014*).

Notre laboratoire a été parmi les premiers à questionner l'existence de liens entre l'organisation anatomique étagée du réseau neuronal respiratoire dans le tronc cérébral avec la régionalisation antéro-postérieure de son territoire présomptif : le rhombencéphale chez l'embryon. 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 (1994-1999). De façon remarquable, ces travaux initiés chez le poulet puis chez la souris établissaient un lien entre une date précoce du développement et une prédisposition fonctionnelle à la naissance, entre des régions du tube neural embryonnaire et la formation d'un circuit fonctionnel (*Champagnat et Fortin, 1997*). Des codes rhombomériques (*Fortin et al. 1999 ; Coutinho et al., 2004*) ont été proposés pour l'émergence de modules rythmiques chez l'embryon de poulet (*Fortin et al. 1994*) d'une part et les conséquences respiratoires de perte de fonction de gènes impliqués dans la segmentation en particulier *Krox* (*Jacquin et al., 1996*) et *Hox* (*Dominguez del Toro, 2001*) ont été étudiés chez la souris. Ces derniers travaux sont succinctement résumés ci-dessous car ils suggéraient déjà l'importance de neurones dérivant du rhombomère 5 pour assurer la présence à la naissance d'une activité respiratoire robuste présentant une fréquence normale et une incidence d'apnée normale: deux traits physiologiques anormaux chez ces mutants pouvant être associé à un chémoréflexe altéré.

2.3 - Données fonctionnelles des mutants *Krox20* et *Hoxa1*

Etant donné les étendues des territoires d'expression de ces gènes et l'inextricable complexité des régulations moléculaires les impliquant dans les multiples aspects de la spécification cellulaire, inmanquablement, des phénotypes affectant l'amplitude respiratoire et/ou sa fréquence ont pu être décrits (*Jacquin et al., 1996 ; Dominguez del Toro et al, 2001 ; Wrobel et al., 2004 ; Chatonnet et al., 2002, 2004 ; Borday et al. 2003* pour revue voir *Fortin et al., 2000 et Borday et al., 2004 et 2005*).

L'étude des mutants *Krox20* a révélé que les mutants hétérozygotes *Krox20*^{+/-} étaient viables et fertiles alors que plus de deux tiers des mutants homozygotes *Krox20*^{-/-} présentaient dès leur naissance de graves défauts respiratoires entraînant leur mort dans les 48 heures, le reste d'entre elles décédant au cours des trois semaines suivantes vraisemblablement de détresse

INTRODUCTION

respiratoire (*Jacquin et al., 1996*). Les mutants nuls présentaient à la naissance une fréquence respiratoire anormalement faible associée à un nombre fortement accru d'épisodes apnéiques. Ces résultats suggéraient que la mutation perturbait la mise en place d'un système possédant un rôle « anti-apnéique » impliqué dans l'entraînement de l'activité respiratoire. De graves défauts respiratoires aboutissant à une mort des souriceaux, peu après leur naissance, ont également pu être mis en évidence chez le mutant *Hoxa1* nul.

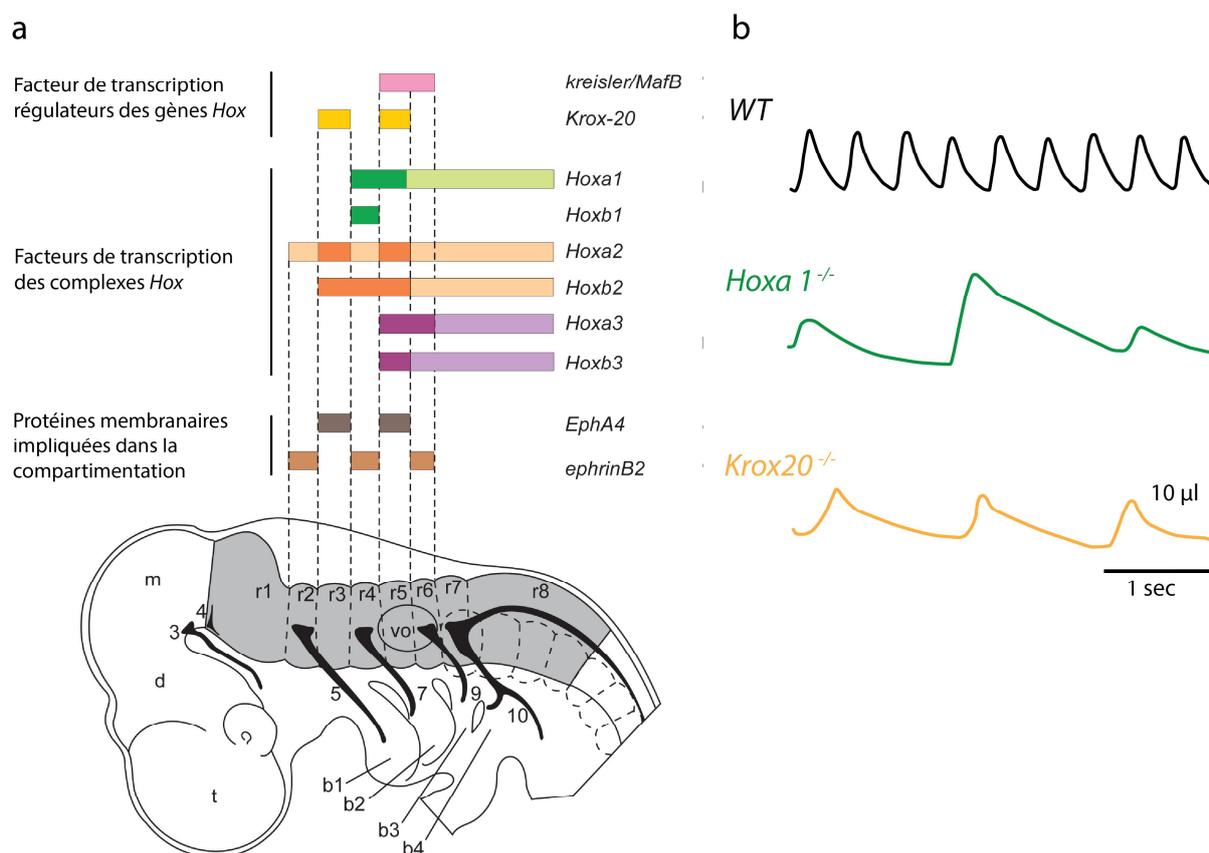


Figure 12 : Le RTN dérive de progéniteurs neuronaux issus des territoires rhombomériques 3/5

(a) Régionalisation génique du Rhombencéphale. Vue latérale de la partie antérieure d'un embryon de souris au stade E9 illustrant la segmentation du rhombencéphale en 8 territoires rhombomériques. Chaque rhombomère exprime une combinaison spécifique d'expression génique au cours du développement. Ces gènes participent à l'induction et au maintien de frontières anatomiques strictes et mettent en jeu des cascades de signalisation cellulaires impliquant des facteurs de transcription (*Krox20*, *MafB/kreisler*, famille *Hox*...) ou des protéines membranaires (*Eph/ephrin*). L'étude des mutants de segmentation du rhombomère permet d'identifier les territoires impliqués dans la genèse du rythme respiratoire à la naissance. La perte des territoires r3/4 (*Hoxa1*^{-/-}) et r3/5 (*Krox20*^{-/-}) engendre de graves troubles respiratoires suggérant chez ces mutants la perte d'un groupe neuronal anti-apnéique vital à la naissance.

Dénomination des différentes structures et noyaux médullaires:

D: Diencephale, **m**: mésencéphale, **t**: télencéphale, **vo**: vésicule otique, **3**: oculaire moteur commun, **4**: trochléaire, **7**: facial, **9**: glossopharyngien, **10**: vague

Le panel **b** est adapté de *Borday et al., 2004*.

Les symptômes respiratoires : une diminution du volume courant associé à une fréquence respiratoire anormalement basse et une incidence accrue d'apnées, ressemblaient à ceux des mutants *Krox20* nuls. Anatomiquement, ces animaux présentaient une importante hypoplasie des territoires embryonnaires r4 et r5, une forte réduction du taux de transcrite primaire des gènes *Krox20* et *Hoxb1* et une importante réduction anatomique ventrale de la région pontique (*Dominguez del Toro et al., 2001*).

Aussi claire que pouvait être la caractérisation fonctionnelle des mutants, la faillite relative de l'approche résidait dans l'impossibilité de caractériser précisément les neurones responsables des déficits observés. Ainsi des systèmes « anti-apnéiques » apparaissaient déficients par exemple chez les mutants *Krox20* et *Hoxa1* sans qu'il soit vraiment possible de les différencier ou de les assimiler, d'en assigner précisément ni l'origine au sein d'un rhombomère particulier, ni la ou les localisations anatomiques, au sein du tronc cérébral mature. En revanche, ces travaux mettaient en évidence que des altérations très précoces du développement du tube neural conduisaient à des changements irréversibles de la fonction des réseaux neuronaux ne pouvant être palliés par l'existence de redondances fonctionnelles ou la mise en place plus tardive de mécanismes de suppléance. De plus, un lien était établi entre des neurones dérivant potentiellement du rhombomères 5 (altéré conjointement chez ces deux mutants) et d'une part, une baisse de la fréquence du rythme respiratoire (plus prononcée chez les *Krox20*^{-/-}) et d'autre part, une incidence anormalement élevée d'apnées à la naissance.

2.4- Percées conceptuelles et scientifiques

C'est en procédant en quelque sorte à rebours, non plus du gène à la fonction, mais en partant des structures respiratoires et en questionnant l'identité des gènes de développement susceptibles d'être liés à leur émergence, que des progrès conséquents ont été obtenus sur la compréhension de l'organisation du générateur central respiratoire et les acteurs cellulaires de son contrôle par le CO₂.

Premièrement, la base supposée duelle de la genèse du rythme respiratoire, s'est vue confirmée par la mise en évidence de l'émergence indépendante chez l'embryon de deux systèmes rythmiques spontanément actifs, deux oscillateurs, préfigurant respectivement le pFRG/RTN (*Thoby-Brisson et al., 2009*) et le preBötC (*Bouvier et al., 2010*), et dont le couplage fonctionnel fonde la respiration fœtale. Deuxièmement, l'oscillateur embryonnaire parafacial (e-pF), préfigurant le pFRG/RTN, dès sa mise en place chez l'embryon, est sensible

INTRODUCTION

au CO₂ et le changement de son activité, causé par un changement métabolique, via son couplage au preBötC, se traduit directement par une modification de la commande centrale respiratoire. Cette structure n'est donc pas seulement chémosensible, à l'instar de nombreuses populations neuronales du SNC, mais bien chémoceptive. Troisièmement, l'étude de l'identité des progéniteurs neuronaux donnant naissance à ces oscillateurs a permis, pour chacun d'eux, d'établir des signatures moléculaires spécifiques qui les rendent accessibles sélectivement par des outils génétiques. Le pF que l'on montrera constitué de neurones glutamatergiques, ayant un historique d'expression de Phox2b / Krox20 / Lbx1 / Atoh1, combine les expressions de gènes qui invalidés individuellement conduisent à une altération profonde de la commande respiratoire à la naissance. Enfin, chez le modèle murin *Phox2b*^{27Ala/+} de CCHS, l'oscillateur parafacial chez l'embryon, le pFRG à la naissance est atrophié.

3. Ontogénèse des oscillateurs centraux

3.1- Ontogénèse du preBötC

Les conditions d'émergence du preBötC chez la souris ont été décrites par l'étude de l'apparition d'une activité spontanée rythmique soutenue au sein de préparation de tronc cérébral d'embryons à différents âges (*Thoby-Brisson et al, 2005*). Il apparaît à E15.5, en position ventro-latérale dans la medulla comme un groupe de neurones bilatéralement distribué, exprimant NK1R. Son activité spontanément rythmique requiert une transmission glutamatergique médiée par des récepteurs de type AMPA/kainate, et le rythme généré peut être modulé par la substance P (stimulation) et par un agoniste opioïde de type μ , le DAMGO (dépression). Ainsi, les caractéristiques, anatomiques et fonctionnelles, du preBötC décrites à la naissance, sont déjà présentes à l'instant de sa mise en place chez l'embryon.

La nature bilatéralement synchronisée de l'activité du preBötC, l'existence en son sein de neurones commissuraux et l'absence complète, à la naissance, de commande respiratoire chez les mutants *Dbx1* nul, ont conduit à l'identification de l'origine des neurones du preBötC au sein du domaine dorso-ventral de progéniteur P0 (Bouvier et al., 2010 ; Gray et al., 2010).

Il a pu être démontré que le facteur de transcription *Dbx1* agissait en amont de la spécification de l'ensemble des propriétés définissant les neurones du preBötC et la mise en forme de son activité. Sur tranche le preBötC des mutants *Dbx1* nul (*Dbx1*^{LacZ/LacZ}) est totalement inactif (**Figure 13**). Les marqueurs caractéristiques du preBötC, la nature glutamatergique, somatostatinergique pour une part, des neurones du preBötC et la présence

sur leur membrane de récepteurs NK1, étaient conjointement absents et expliquaient le phénotype fonctionnel. De plus, il a été montré que la synchronisation bilatérale de son activité reposait sur des axones croisant la ligne médiane par une signalisation médiée par le récepteur Robo3. L'invalidation conditionnelle de Robo3 dans les neurones dérivants de progéniteurs ayant exprimé Dbx1 entraîne la désynchronisation bilatérale des preBötC droit et gauche sur tranche (*Bouvier et al., 2010*). Enfin, l'expression du fragment A de la toxine diphtérique au sein des progéniteurs P0 dorsaux co-exprimant le facteur de transcription Pax7 (*Pax7^{Cre}; Dbx1^{DTA}*) n'empêche pas la formation d'un preBötC spontanément rythmique et bilatéralement synchronisé. Ces résultats ont permis de conclure que le preBötC est constitué d'interneurones de type V0 ventraux (*Bouvier et al., 2010*).

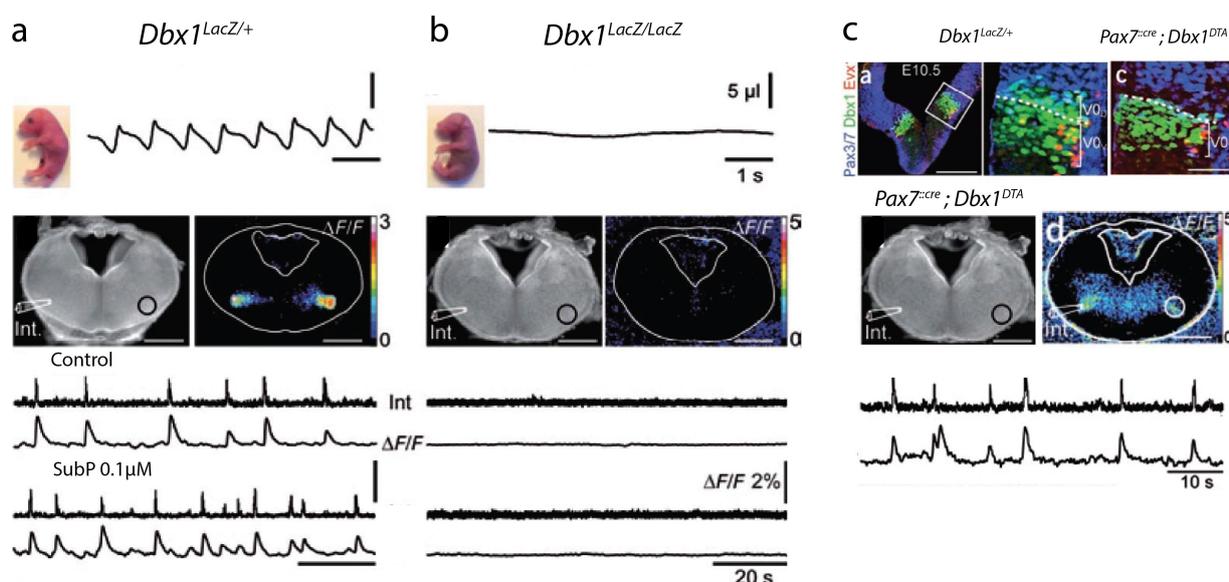


Figure 13 : Les neurones du preBötC dérivent de progéniteurs issus du domaine V0.

(a) Etude pléthysmographique de la ventilation d'animaux *Dbx1^{LacZ/+}* suite à leur mise bas par césarienne au stade E18.5. Les animaux présentent une respiration stable et régulière (haut). Enregistrement électrophysiologique et par imagerie calcique d'une tranche transverse de tronc cérébral d'un embryon à E15.5 révélant la présence des deux groupes de neurones spontanément rythmiques et bilatéralement synchronisés du preBötC (milieu). La fréquence des bouffées d'activité est significativement augmentée suite à l'application de SubP 0.1 μM (bas). (b) Chez les mutants *Dbx1^{LacZ/LacZ}*, la perte des activités respiratoires *in vivo* et l'absence d'activité rythmique identifiable lors des approches *in vitro* illustre l'importance du gène *Dbx1* pour la mise en place de l'oscillateur preBötC au cours de l'embryogénèse. (c) L'expression du fragment A de la toxine diphtérique au sein du lignage cellulaire Dbx1 dorsal (*Pax7^{Cre}; Dbx1^{DTA}*) ne perturbe pas la mise en place de l'oscillateur démontrant que les neurones constitutifs de l'oscillateur dérivent de progéniteurs issus du sous-domaine V0.

Adapté de *Bouvier et al., 2010*

3.2 - Ontogénèse du pFRG/RTN

Les premières études du pFRG, nous l'avons vu, utilisaient le critère temporel d'activité pré-Inspiratoire afin de dater l'émergence fonctionnelle du réseau. Ces activités n'étant observables qu'à partir du stade E19 chez le rat, les auteurs conclurent que le pFRG ne commençait à être fonctionnel qu'aux stades post-nataux (*Onimaru et Homma, 2005*). L'utilisation d'autres approches expérimentales, notamment d'imagerie calcique, permit d'en dater une émergence bien plus précoce. Ainsi dès la fin du deuxième tiers de gestation (stade E14.5 chez la souris) il est possible d'observer, sur des préparations de tronc cérébral isolé, des variations spontanées et rythmiques de fluorescence au niveau de deux populations cellulaires bilatéralement localisées à la surface ventrale, au niveau des noyaux moteurs du VII (7n ; voir **Figure 14**). Ces activités rythmiques préservées sur des préparations de tranches transversales provenaient donc d'un générateur de rythme. Ce réseau, maintenant son activité dans la préparation réduite de tranche transversale, fut baptisé oscillateur parafacial embryonnaire (embryonic parafacial, e-pF).

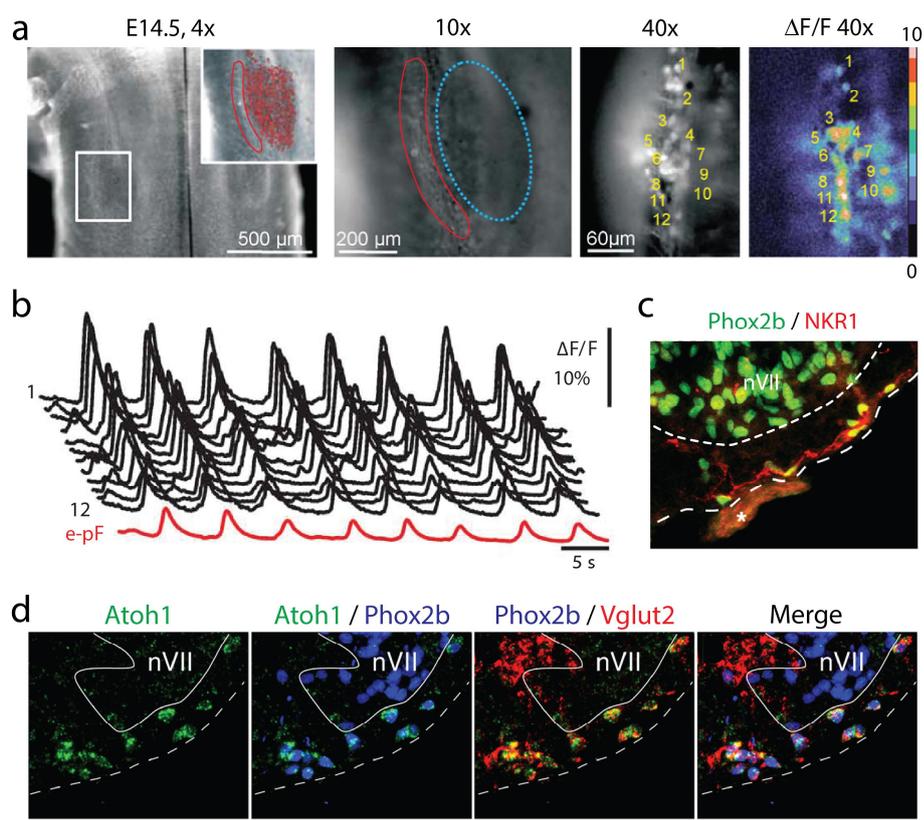


Figure 14 : Mise en place fonctionnelle du RTN au cours de l'embryogénèse

(a) Observation par imagerie calcique du profil d'activité des neurones du RTN au stade E14.5. Vue ventrale de la partie gauche d'une préparation de tronc cérébral en bloc préalablement incubé avec une solution contenant une sonde calcique. L'observation de la surface ventrale du noyau moteur facial permet de mettre en évidence une petite population neuronale ayant une activité rythmique. La partie droite du panel présente l'activité moyennée de plusieurs cycles d'activité (CTA, Cycle Trigger

Average). Les neurones du RTN présentent une activité synchronisée au sein de l'oscillateur. L'observation de la même zone anatomique à des stades développementaux antérieurs ne permet pas de mettre en évidence d'activité au sein du réseau démontrant que l'oscillateur, bien que anatomiquement en place, n'est pas fonctionnel. (c) et (d) Les neurones du RTN présentent dès les phases précoces de mise en place de la structure le même répertoire de marqueurs anatomiques (NKR1+/Vglut2+, Islet1,2-) et expriment les facteurs de transcription Phox2b et Atoh1.

Les panels (a) et (b) sont issus de *Thoby-brisson et al., 2009*. Les panels (c) et (d) ont été adaptés de *Dubreuil et al., 2009*

Lœ-pF est composé dœ environ 500 neurones dérivants de progéniteurs ayant une histoire dœ expression de *Krox20* (*Thoby-Brisson et al., 2009*). Singulièrement, lœ ensemble des neurones de lœ-pF sont glutamatergiques, expriment le facteur de transcription *Phox2b*, les récepteurs NK1, (*Thoby-Brisson et al. 2010*) mais au contraire des neurones noradrénergiques de C1 immédiatement plus caudaux, nœ expriment pas la tyrosine hydroxylase (*Dubreuil et al., 2008*). Ainsi ces neurones ont les mêmes signatures moléculaires que les neurones du pFRG décrits à la naissance avec lesquels ils partagent, en plus de la localisation anatomique, le caractère rythmique (*Onimaru et al., 2008*).

3.2 - Propriétés fonctionnelles de lœ-pF

Lœ enregistrement électrophysiologique des neurones de lœ-pF a permis de révéler que toutes les cellules de cet oscillateur possèdent des propriétés de décharge voltage-dépendantes caractérisées par lœ émission de bouffées de potentiel dœ action. Deux conductances sont requises pour le maintien du rythme de lœ-pF : (i) dœ une part, le courant sodique persistant (I_{NaP}) bloqué par le riluzole et dœ autre part, (ii) le courant I_h , un courant cationique non sélectif activé par lœ hyperpolarisation et bloqué par le ZD7288 et la présence extracellulaire de césium (*Thoby-Brisson et al., 2009*, voir **Figure 15**). Contrairement au preBötC, le rythme de lœ-pF et la synchronisation entre les cellules de lœ-pF résistent aux antagonistes glutamatergiques CNQX ou AP5, respectivement des récepteurs AMPA/Kainate et NMDA. De plus, le rythme de lœ-pF est maintenu chez les mutants nuls du gène codant pour le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (*Wallen-Mackenzie., 2006*) abolissant la transmission synaptique glutamatergique (*Thoby-Brisson et al., 2009*). De la même façon, lœ-pF est comme le pFRG à la naissance, et contrairement au preBötC, insensible au DAMGO. Lœ application de carbenoxolone, un bloquant à large spectre des jonctions communicantes, provoque une désynchronisation des activités rythmiques des cellules de lœ-pF. Dans ces conditions, une partie des neurones perdent leur activité rythmique, les autres la conservent (**Figure 15**). Finalement, la fréquence de lœ activité de lœ oscillateur e-pF, dans la préparation de tronc cérébral isolé, est augmentée par un abaissement du pH extracellulaire mimant une augmentation de la $PaCO_2$ du sang et des tissus. Cette réponse au pH est préservée dans les conditions plus réduites dœ une tranche transversale de tissu suggérant une sensibilité directe des neurones de lœ-pF à lœ acidose, une propriété partagée à la naissance par les neurones du pFRG (*Onimaru et al., 2005*).

3.3 - Couplage fonctionnel des oscillateurs e-pF et preBötC chez l'embryon

Les oscillateurs e-pF et preBötC émergent séquentiellement respectivement à E14.5 et E15.5 (Thoby-Brisson *et al.*, 2005, 2009). Au cours de ces vingt-quatre heures, l'étude des fréquences de décharge de l'e-pF en regard des activités du noyau moteur facial et du nerf XII et la pratique de sections transversales séparant les niveaux axiaux de l'e-pF et du preBötC ont permis de suivre le couplage fonctionnel des deux oscillateurs.

Initialement, les bouffées rythmiques d'activité de l'e-pF, sont rarement associées avec la survenue d'une bouffée d'activité motrice. Ainsi, la fréquence d'activité de l'e-pF est très supérieure à celle des activités motrices. Progressivement, la probabilité pour qu'une bouffée de l'e-pF soit accompagnée d'une bouffée d'activité motrice augmente, et ce, jusqu'à ce que cette co-activation soit réalisée pour chaque bouffée de l'e-pF. Ainsi, l'incorporation des bouffées motrices se fait de manière discrète sur la base rythmique de l'activité de l'e-pF, un processus tout à fait inverse du « quantal slowing » résultant de la dépression du preBötC par les opiacés démontré à la naissance (Mellen, *et al.*, 2003). Cette accélération « quantale » du rythme témoigne d'une excitabilité croissante du preBötC au cours de ces vingt-quatre heures, culminant en son acquisition d'un pouvoir rythmogène propre (Thoby-Brisson *et al.*, 2009). A

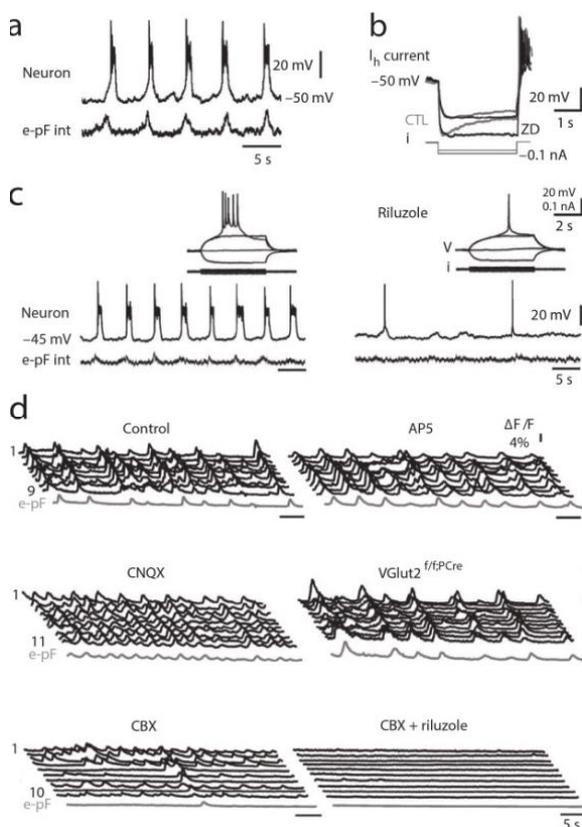


Figure 15 : Principes fonctionnels sous-tendant l'activité rythmique du RTN

(a) Les neurones du RTN présentent un profil d'activité rythmique et synchrone avec le réseau constitutif de l'oscillateur. (b) Cette activité rythmique est assurée en partie grâce au courant cationique entrant I_h activé en réponse à l'hyperpolarisation. Ce courant rectificateur participe à la genèse du rythme autonome et est sensible au ZD7288 (ici noté ZD). Les neurones présentent également une sensibilité au riluzole, bloquant des courants sodiques persistants I_{NaP} qui, bien qu'il ne semble pas intervenir dans la genèse des potentiels d'action, modifie la mise en forme des bouffées d'activité rythmiques (c).

(d) La genèse du rythme et l'activité synchrone du réseau sont préservées en présence d'antagonistes glutamatergiques (AP5, bloquant des canaux NMDA et CNQX bloquant des récepteurs AMPA/kainate) de même qu'en absence du transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 ($PGK^{::cre}; vglut2^{lox/lox}$). L'application de CBX abolit la synchronisation intercellulaire tout en préservant l'activité endogène d'une partie des neurones. Celle-ci est rendue silencieuse par l'ajout du riluzole.

Adapté de Thoby-Brisson *et al.*, 2009

partir de ce stade, une section transversale sous e-pF , permet l'observation d'activités rythmiques, de part et d'autre de la section, en provenance d'oscillateurs « libres » (libérés de leurs influences réciproques) dont les fréquences apparaissent respectivement augmentée et diminuée, par rapport à celle présente, avant la section, qui émerge du système couplé. Ainsi, e-pF dans ce couplage contribue à l'augmentation de la fréquence du rythme.

L'étude des trajectoires du potentiel de membrane des neurones de e-pF , par des enregistrements « cellule entière » à l'aide de pipettes contenant une faible concentration en ion chlorure (révélant les inhibitions), a permis de montrer qu'il contenait deux types de neurones en vertu de l'influence que le preBötC exerçait sur eux. La moitié des neurones enregistrés étaient excités en phase avec le preBötC, les autres (dans ces conditions particulières d'enregistrement) voyaient leur activité inhibée en phase avec le preBötC (**Figure 16**, *Thoby-Brisson et al., 2009*). Il est très vraisemblable que la maturation du gradient des ions chlorures se traduira à la naissance par l'apparition de puissantes inhibitions synaptiques au cours des phases inspiratoires génératrices de rebonds post-inspiratoires qui sont caractéristiques des neurones du pFRG (*Onimaru et al., 1989 ; Onimaru et Homma 2003, 2005*).

Ces travaux indiquent :

- deux dates pour diagnostiquer fonctionnellement l'état de e-pF , E14.5, date à laquelle il est seul actif, et, E16.5, date à laquelle, il est couplé au preBötC et entraîne à la hausse la fréquence de l'activité rythmique de manière pH-dépendante.
- un ensemble cohérent de propriétés moléculaires, anatomiques et fonctionnelles qui positionnent e-pF et le pFRG comme deux stades de développement d'une même structure.

3.4 - e-pF / pFRG / RTN trois stades de développement d'une même structure

Si e-pF et le pFRG peuvent être considérés comme une seule et même structure ceci constitue une extension à des stades plus précoces de l'assimilation déjà patente du pFRG et du RTN (*Guyenet and Mulkey, 2010*). En effet, de nombreux arguments existent déjà pour ce rapprochement, basés sur des recouvrements anatomiques communs, et le partage des marqueurs moléculaires des cellules dB2 les composant. De plus, les propriétés de chémosensibilité intrinsèques ont pu être mises en évidence *in vitro* et *in vivo* au sein des neurones du pFRG (*Onimaru et al., 2008*) et du RTN chez lesquels une acidification locale

INTRODUCTION

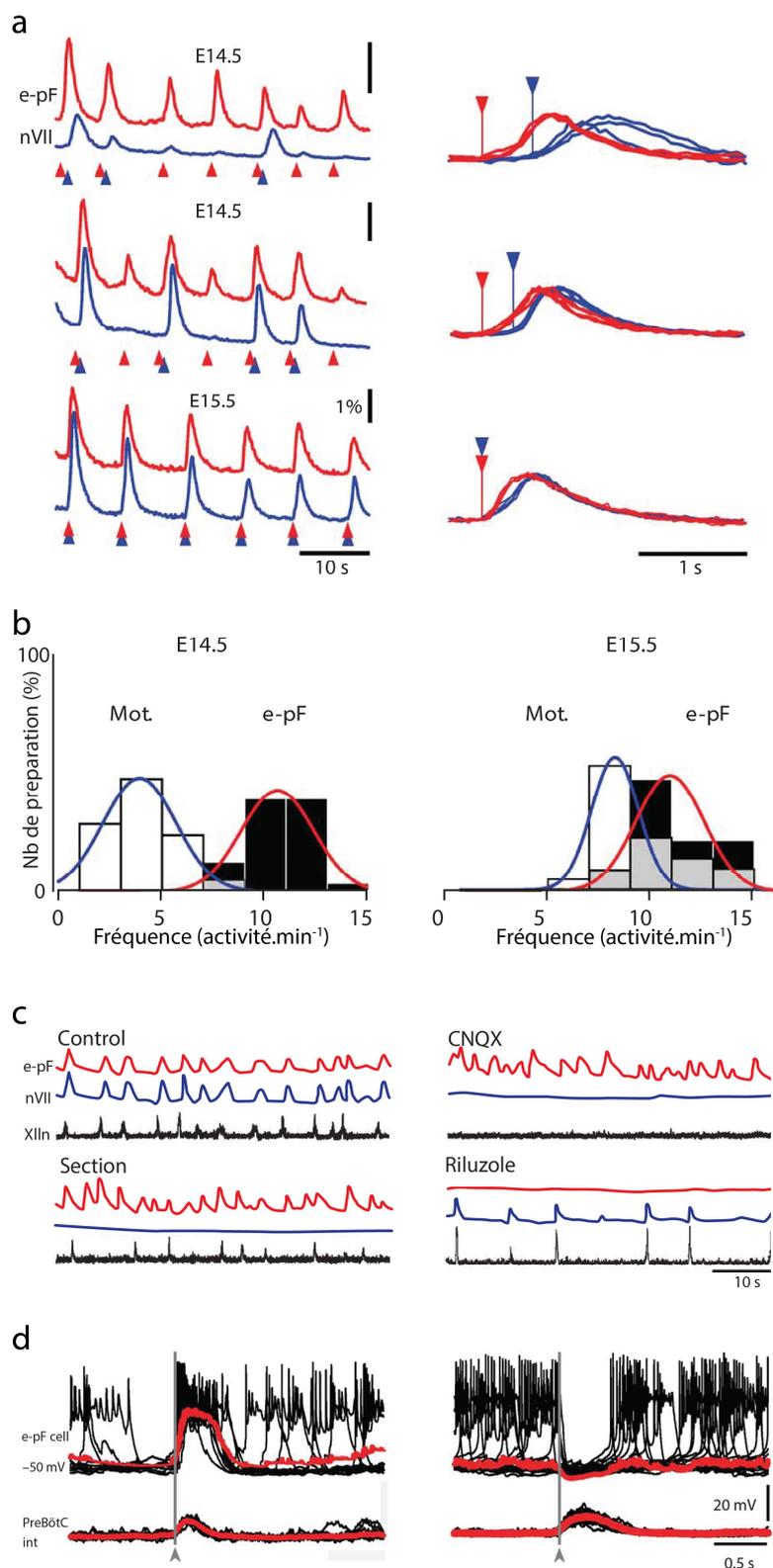


Figure 16 : Le couplage fonctionnel entre RTN et preBötC s'effectue au cours des phases précoces de l'embryogénèse

(a) Etude des activités spontanées du RTN (trace rouge) et du noyau moteur facial (nVII, trace bleue) enregistrées par imagerie calcique au cours de différents stades développementaux. Les décharges enregistrées au niveau du noyau moteur facial reflétant l'activité du réseau respiratoire, nous pouvons observer que ces deux systèmes vont se coupler fonctionnellement entre les stades E14.5 et E15.5. Nous pouvons également noter un important accroissement du nombre des bouffées motrices synchrones aux activités du RTN au cours de cette période critique (partie droite). Ce couplage fonctionnel provoque une diminution de l'activité rythmique du RTN et l'accélération des décharges motrices (b). La réalisation de transection au dessous du RTN ou le blocage pharmacologique de cet oscillateur provoque une diminution de la fréquence des décharges motrices (c). Ces données sont congruentes avec un rôle rythmogénique du RTN sur l'activité du réseau respiratoire et ce dès les stades embryonnaires précoces. A contrario, la mise sous silence des activités du preBötC suite à l'application du CNQX provoque une forte accélération de la fréquence spontanée du RTN suggérant un puissant effet inhibiteur en provenance de cet oscillateur. Ces données peuvent être confirmées par des approches électrophysiologiques permettant de mettre en évidence l'existence de deux populations de neurones au sein du RTN (d). La première, excitée par l'émission d'une bouffée d'activité au sein du preBötC décharge des trains de potentiel d'action (à gauche). La seconde (à droite) est rendue silencieuse suite à la libération de neuromédiateurs inhibiteurs pouvant être bloqués par l'application de bicuculline.

Adapté de *Thoby-Brisson et al., 2009*

engendre une accélération du taux de décharge (*Mulkey et al., 2004*). Enfin de nombreuses évidences démontrent que ces trois structures, à des stades différents, peuvent contrôler l'activité inspiratoire (*Onimaru et al., 1989 ; Abbott et al., 2009*). Des expériences publiées par *Pagliardini et al. 2011*, ont montré que la stimulation optogénétique des neurones du

RTN évoquait non pas des activités inspiratoires comme l'ensemble des travaux précités mais des expirations actives introduisant une divergence inattendue dans cette continuité. Ces expériences, faisaient usage d'activations optogénétiques non-spécifiques de neurones présents dans la région parafaciale et les auteurs s'accordent à l'attribution de ces effets à des neurones n'exprimant pas *Phox2b* (donc dérogeant à l'identité du RTN), une position depuis confirmée par une autre étude (*Tupal et al., 2014*).

Les neurones de l α -pF peuvent, en réponse à une acidification, fortement accroître leur fréquence de décharge (*Thoby-Brisson et al. 2009 ; Dubreuil et al., 2009*). Des propriétés de chémosensibilité intrinsèques ont par ailleurs pu être mise en évidence *in vitro* et *in vivo* au sein des neurones du pFRG (*Onimaru et al., 2008*) et du RTN chez lesquels une acidification locale engendre une accélération du taux de décharge (*Mulkey et al., 2004*). Enfin de nombreuses évidences démontrent que ces trois structures, à des stades différents, peuvent contrôler l'activité inspiratoire (*Onimaru et al., 1989 ; Abbott et al., 2009*), expiratoire (*Janczewski and Feldman 2006 ; Pagliardini et al., 2011*) et jouent un rôle important pour la modulation de l'activité respiratoire par le CO₂ (*Dubreuil et al., 2009 ; Onimaru et al., 2008 ; Stornetta et al., 2006*).

La plus grande divergence fonctionnelle entre l α -pF ou le pFRG et le RTN réside dans le mode de décharge des neurones ; l α -pF et le pFRG sont des structures rythmiques, le RTN est lui caractérisé par des neurones déchargeant de façon tonique. Les mécanismes susceptibles d'opérer cette transition des profils de décharge restent totalement inconnus même si la disparition de l'activité primordiale (un mode de décharge rythmique) au cours du développement est un phénomène probablement ubiquitaire (*Fortin et al., 1999 ; Moody and Bosma, 2005 ; Spitzer, 2006 ; Bonifazi et al., 2009 ; Picardo et al., 2011 ; Marissal et al., 2012*). Cette transition fonctionnelle pourrait impliquer une modulation du courant I_h crucial pour la rythmicité des neurones de l α -pF et pour lequel des mécanismes d'inactivation par le cAMP sous le contrôle d'isoformes de l'Adénylate Cyclase exprimées particulièrement dans le tronc cérébral ont été rapportées (*Chan et al., 2007*).

Dans la suite de ce manuscrit, notre travail qui intéressera à la fois les stades embryonnaires, néonataux et adultes adoptera la terminologie unique de RTN pour qualifier ces neurones.

IV. Rôle du RTN dans la chémoception centrale : approches de génétique conditionnelle chez l'embryon

La transposition de la mutation *Phox2b*^{27Ala} à l'origine du syndrome CCHS chez le modèle murin phénocopie les symptômes observés chez l'homme et provoque une perte de la chémoception centrale. Cependant, suite à l'expression de cet allèle constitutif, il est important d'écarter de possibles déficits fonctionnels touchant d'autres populations *Phox2b* dépendantes et ainsi légitimer le rôle vital du RTN pour la mise en place des mécanismes de chémoception centrale au CO₂. Dans ce chapitre, je m'attacherai à présenter les approches visant à cibler cette structure avec une plus forte spécificité que la mutation constitutive 27Ala. La grande majorité des résultats présentés dans ce chapitre provient d'études réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Brunet.

1. Etude des effets d'une perte de fonction du gène *Phox2b* au sein des progéniteurs neuronaux

L'identification du domaine de progéniteurs à partir duquel vont se spécifier les neurones du RTN, le domaine dB2 (voir plus haut) a permis l'obtention de nouveaux outils permettant de fortement restreindre les territoires d'expression des mutations touchant le RTN. C'est dans cette optique que fut générée au sein du laboratoire de J-F Brunet une souris transgénique chez laquelle la majeure partie de la séquence codante l'exon 2 de l'homéodomaine du gène *Phox2b* est entourée de séquences lox (souris *Phox2b* flox notée *Phox2b*^{lox/lox}). La délétion de la séquence codante du gène *Phox2b* ciblée aux progéniteurs neuronaux dérivant (i) du sous-domaine dorsal dB2 (*Lbx1*^{Cre/+};*Phox2b*^{lox/lox}) ou (ii) des territoires r3-r5 (*Krox20*^{Cre/+};*Phox2b*^{lox/lox}) provoque une perte anatomique et fonctionnelle des neurones du RTN. Physiologiquement, aux stades tardifs de développement, ces mutants présentent une importante diminution de la fréquence respiratoire, comparable à celle observée chez les mutants *Phox2b*^{27Ala/+}. Ces dépressions respiratoires sont associées à une perte du chémoréflexe central (*Dubreuil et al., 2009*). L'ensemble de ces troubles sont à l'origine de la létalité périnatale observée chez l'ensemble de ces mutants. Les études réalisées chez les mutants constitutifs *Phox2b*^{27Ala/+}, ainsi que chez les mutants conditionnels

Krox20^{Cre/+};Phox2b^{lox/lox} et *Lbx1^{Cre/+};Phox2b^{lox/lox}* mettent en évidence que l'activité spontanée du preBötC n'est pas modifiée. Ces résultats sont en accord avec le fait que les deux oscillateurs constitutifs du CPG respiratoire suivent des programmes ontogéniques distincts et indépendants (*Thoby-Brisson et al., 2005*, *Bouvier et al., 2009*). Evoquons ici qu'au cours de l'embryogénèse, les neurones du RTN migrent du sous-domaine dorsal dB2 jusqu'à la surface ventrale du tronc cérébral entre les stades E11.5 et E13.5. Cette migration se fait en parallèle de la migration des motoneurones du nerf facial le long de la surface piaie du rhombomère 6. L'invalidation de *Phox2b* dans les populations de motoneurones (*Islet^{Cre/+}; Phox2b^{lox/lox}*) abolit la formation de ce noyau moteur notamment en empêchant une migration correcte des motoneurones (*Coppola et al., 2010*) mais ne perturbe pas la migration des neurones du RTN vers la surface ventrale. Bien que chez ces mutants, les neurones du RTN soient plus dispersés le long de la surface du bulbe, ces résultats démontrent que le RTN suit des processus migratoires indépendants de la présence des motoneurons faciaux.

*La combinaison des critères moléculaires permis par la délétion de *Phox2b* associée à une historique d'expression de *Lbx1* ou de *Krox20* assure le ciblage de sous-ensembles différents de neurones *Phox2b* mais incluant tous deux le RTN. Dans ces deux fonds génétiques, le RTN est pareillement atrophié et les déficits physiologiques associés - diminution de la fréquence respiratoire et perte de la chémoreception centrale - sont comparables aux mutants constitutifs 27Ala. Ces expériences nous informent sur l'importance de *Phox2b* dans la mise en place du RTN et la forte implication du RTN dans le développement d'un chémoréflexe à la naissance. Ces travaux assurent un ciblage plus confiné des mutations à l'oscillateur RTN et récapitulent les principaux symptômes cardinaux observés chez les patients humains. Cependant, l'étude des différents modèles précédemment énoncés ne permet pas, d'une part, d'exclure de manière définitive l'implication d'autres sous-types neuronaux impliqués dans l'émergence du chémoréflexe central et, d'autre part, d'expliquer les différences de létalité observées entre les patients humains et les différents modèles murins.*

INTRODUCTION

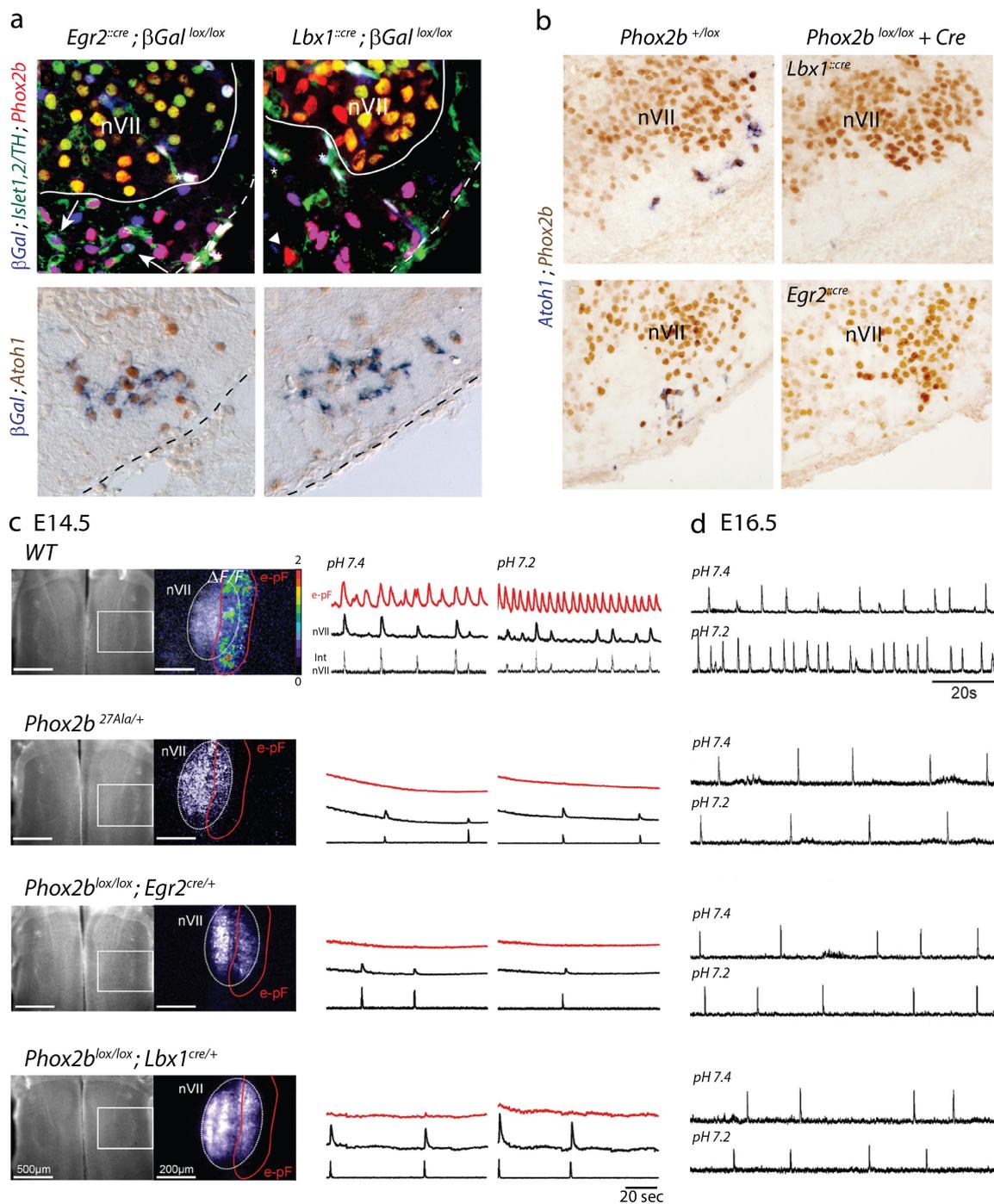


Figure 17 : Caractérisation développementale des neurones du RTN: implication de Phox2b dans la mise en place anatomo-fonctionnelle de l'oscillateur

(a) Les neurones du RTN proviennent de progéniteurs neuronaux localisés au sein des rhombomères 3/5 et sont issus du sous-domaine dB2. Etude anatomique sur coupes transverses de mutants *Egr2::cre;Tau^{GFPnLacZ}* et *Lbx1::cre;Tau^{GFPnLacZ}* à E15.5. La co-localisation entre les neurones du RTN (*Phox2b* + *Islet1,2/TH*-) et la protéine rapportrice β -Galactosidase permet d'établir le lignage cellulaire de l'oscillateur respiratoire. La mise en place anatomo-fonctionnelle du RTN dépend de l'expression du facteur de transcription *Phox2b*. Lorsque celui-ci est conditionnellement délété des lignages cellulaires dérivant de r3/5 (*Egr2::cre;Phox2b^{lox/lox}*) ou du sous-domaine dB2 (*Egr2::cre;Phox2b^{lox/lox}*), les neurones constitutifs de l'oscillateur sont anatomiquement absents (b) et aucune activité rythmique ne peut être mise en évidence à la surface du noyau moteur facial. Ces délétions anatomiques, comparables à celles observées chez les mutants constitutifs 27Ala provoquent une dépression de l'activité du réseau respiratoire comme en atteste l'importante diminution de la fréquence de décharge du noyau moteur Facial (c). La perte du RTN entraîne une diminution de l'activité du réseau respiratoire et une abolition du chemoreflexe central (d). Adapté de *Dubreuil et al., 2009*.

2. La co-expression des facteurs de transcription Phox2b et Atoh1 comme outil de ciblage du RTN

2.1 - *Atoh1*, un facteur de transcription impliqué dans les processus neurogéniques, prolifératifs et la spécification des neurones du SCN et SNP

Atoh1 (Atonal Homolog 1 chez la *Drosophila*) est un facteur de transcription neuronal de type bHLH (Basic Helix-loop-Helix) impliqué dans de très nombreux processus développementaux. On le retrouve notamment au cours des processus de différenciation des cellules mécano-sensorielles de l'oreille interne et des neurones cérébelleux. *Atoh1* est également connu comme un facteur oncogénique impliqué dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que des processus apoptotiques ce qui en fait un gène suppresseur de tumeur (*Ben-Arie et al., 1999 ; Bermingham et al., 1999 ; Yang et al., 2001*).

2.1.1- Action périphérique

Au sein du système vestibulaire périphérique, *Atoh1* est exprimé par les cellules ciliées de l'oreille interne au niveau de l'organe de Corti et de la rampe vestibulaire. Ces cellules prennent origine à partir de la placode optique localisée entre les territoires r5 et r6 du tronc cérébral. C'est au sein de ce segment ectodermique que les cellules ciliées et les cellules de support prolifèrent et se différencient en épithélium sensoriel entre les stades E13 et E18. Chez les mutants nuls *Atoh1* ^{β Gal/ β Gal}, ces cellules ne sont pas présentes. L'absence de marqueurs apoptotiques suggère que suite à la perte de ce facteur de transcription, les cellules précurseurs sont soit incapables de proliférer, soit incapables de maintenir un état différencié. La présence chez ces animaux mutants de cellules de support, également issues des cellules prolifératives, met en exergue un rôle de *Atoh1* dans la spécification et le maintien de nombreux sous-type cellulaires (*Bermingham et al., 1999*).

2.1.2- Action centrale

Au sein du SNC, *Atoh1* est détecté dans les ganglions crâniens ainsi que dans la partie dorsale du tube neural dès le stade E8.5. Progressivement son expression se restreint dorsalement à la lèvre rhombique (E9.5) ainsi qu'à la partie dorsale de la moelle épinière (E13.5). Au stades tardifs de gestation *Atoh1* n'est observé que dans les cellules granulaires de la couche externe du cervelet issues de la lèvre rhombique (*Akazawa et al., 1995*). Ces cellules vont, durant les stades post-nataux précoces, subir des processus de migrations

INTRODUCTION

radiales leur permettant de se spécifier en cellules granulaires internes formant le cervelet. L'étude des mutants *Atoh1* nuls met en évidence une diminution du nombre de cellules granulaires externes. De plus ces cellules sont fortement désorganisées et ne forment pas de structure laminaire causant une hypoplasie cérébelleuse (*Ben-Ari et al., 1997*). De manière intéressante, les mutants *Atoh1*^{-/-} meurent rapidement après leur naissance de défauts respiratoires. Les travaux histologiques réalisés au cours de cette étude ont révélé l'absence de malformations des poumons suggérant une altération du contrôle central respiratoire.

2.2 - *Atoh1* est exprimé de novo par les neurones du RTN

Dans la recherche de nouveaux marqueurs anatomiques permettant de définir le RTN, Dubreuil et al. ont pu mettre en évidence que la grande majorité des neurones expriment *Atoh1* (é 85 % des neurones *Phox2b*+/*Vglut2*+ ; *Dubreuil et al., 2009*). Réciproquement la totalité des cellules *Atoh1*+ observées à la surface ventrale du nerf facial co-exprimaient *Phox2b* et *Vglut2*. De plus l'ensemble des neurones *NKR1*+ co-localisent avec *Atoh1*. Enfin, aucun chevauchement entre *Atoh1* et la tyrosine Hydroxydase n'a été observé, suggérant que les neurones Adrénergique C1, *Phox2B*+, n'expriment pas ce facteur de transcription. L'ensemble de ces résultats permettent de définir la combinaison de marqueur *Atoh1*/*Phox2b* comme spécifique des neurones du RTN.

Alors que le facteur de transcription *Atoh1* est exprimé de manière continue dans la partie dorsale du tronc cérébral, il est possible d'observer une expression *de novo* au sein des neurones du RTN. La réalisation de double hybridation *in situ* dirigées contre *Phox2b* et *Atoh1* démontre une absence de co-localisation entre ces deux marqueurs aux stades antérieurs à E11.5. À partir de E12.5, ces marqueurs sont exprimés au sein d'une petite population de neurones localisée dorsalement au noyau moteur du nerf facial. Entre les stades E12.5 et E14.5, cette population va progressivement migrer ventralement jusqu'à atteindre sa position finale à la surface piaie du rhombomère 6. Par la suite, l'expression de *Atoh1* diminue progressivement jusqu'à n'être plus observable à partir de E18.5 (**Figure 18**). L'absence de double marquage *Phox2b*+/*Atoh1*+ aux stades E12.5 et E15.5 chez les mutants *Phox2b*^{27Ala/+} permet de confirmer la forte spécificité de cette combinatoire pour l'étude des neurones du RTN et en fait un outil de choix pour l'étude des mécanismes sous tendant la mise en place de cette structure (*Dubreuil et al., 2009*).

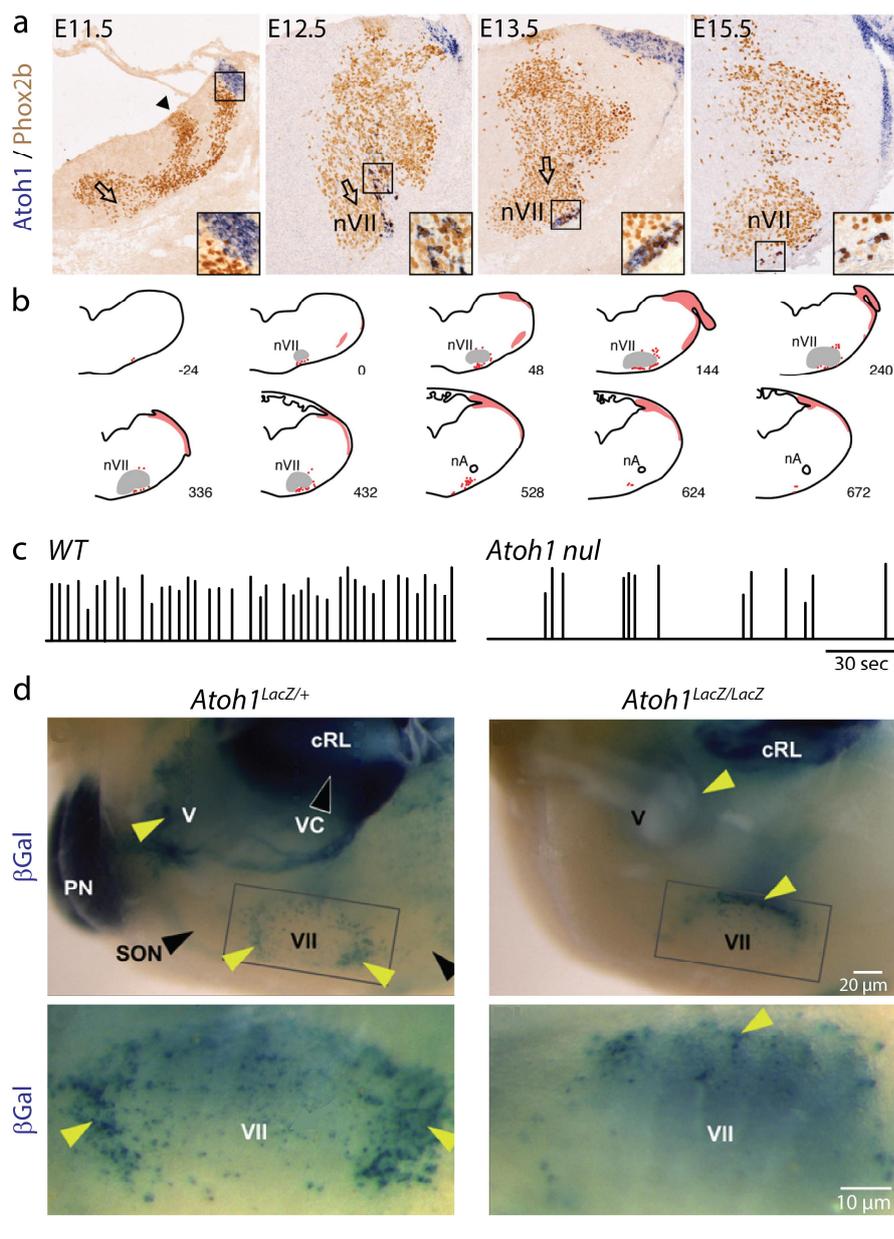


Figure 18: La combinaison d'expression *Phox2b* et *Atoh1* peut être utilisée comme un marqueur anatomique spécifique du RTN

(a) Caractérisation de l'expression de *Atoh1* au sein du RTN. Des expériences de double hybridation *in situ* ont été réalisées à différents stades embryologiques. Au stade E11.5, *Atoh1* est observé dans la partie dorsale du tronc cérébral au niveau de la lèvre rhombique. A ce stade, aucune co-localisation entre les signaux *Phox2b* et *Atoh1* ne peut être observée (c.f. agrandissement). A partir de E12.5 une petite population dorsale au VIIIn commence à co-exprimer ces deux marqueurs. Cette population va progressivement migrer ventralement jusqu'à atteindre sa position finale (stade E14.5). Du fait que ces neurones co-expriment *Phox2b* et *Atoh1*, sont glutamatergiques et sont localisés en surface ventrale du VIIIn, nous pouvons conclure que cette population constitue le RTN. (b) Illustration schématique présentant la position des neurones *Atoh1*⁺/*Phox2b*⁺ le long

de l'axe rostro-caudal observés sur des sections transverses de tronc cérébral au stade E14.5. L'apparition de la partierostrale du noyau moteur facial définit le point d'origine, la valeur inscrite en bas à droite indique la distance séparant la coupe illustrée et le point 0 (en μm). (c) Enregistrement de l'activité électrique du nerf phrénique réalisé chez des animaux contrôles (*Atoh1*^{LacZ/+}) et mutants (*Atoh1*^{LacZ/LacZ}) au stade E18.5. (d) Etude de l'expression du facteur de transcription *Atoh1* au sein des populations neuronales du tronc cérébral chez les animaux contrôles (*Atoh1*^{LacZ/+}) et mutants (*Atoh1*^{LacZ/LacZ}). L'historique d'expression du facteur de transcription est observé grâce au marquage de la protéine rapportrice β-Galactosidase sur tronc entier au stade E18.5. On peut observer chez les animaux mutants *Atoh1* nuls une modification de la localisation du RTN qui se retrouve placé en arrière du noyau moteur Facial (flèche jaune) alors qu'il est situé plus ventralement chez le contrôle. **cRL**: Lèvre Rhombique caudale **PN**: région pontique, **V**: noyau moteur Trigéminal, **VII**: noyau moteur Facial, **VC**: noyau Cochléaire Ventral.

Les panels **a** & **b** ont été adaptés de *Dubreuil et al., 2009*. Les panels **c** & **d** proviennent de *Rose et al., 2009*.

La même année fut publiée dans le journal *Neuron* une étude démontrant l'implication de *Atoh1* dans la mise en place des neurones du RTN. Dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence une perte anatomique des neurones du RTN chez les mutants *Atoh1* nuls (*Atoh1*^{LacZ/LacZ}). Physiologiquement, ces mutants présentent de graves troubles respiratoires

caractérisés par une baisse dramatique de la fréquence respiratoire associée à une perte de la régularité. L'étude des neurones LacZ+ aux stades tardifs de gestation mit en évidence l'apparition d'une population neuronale Atoh1+ localisée en position dorsale au noyau moteur facial (*Rose et al., Neuron 2009*). De fait, Atoh1 semble jouer un rôle particulièrement important dans la mise en place du RTN et offre de nouvelles stratégies développementales dans le cadre de son investigation fonctionnelle.

3. Problématique du travail de thèse

Bien que de nombreuses données physiologiques suggèrent le rôle crucial du RTN dans la mise en place d'une réponse hypercapnique efficiente à la naissance, faute de délétion spécifique, des preuves définitives du rôle du RTN manquent, engendrant encore de nombreux doutes au sein de la communauté scientifique.

*Le travail réalisé et présenté au cours de cette thèse vise à la réalisation d'une dissection génétique des programmes développementaux conditionnant l'émergence de cet oscillateur respiratoire et son intégration fonctionnelle au sein du CPG respiratoire. Grâce à l'utilisation de différentes approches de génétique intersectionnelle utilisant l'historique d'expression par les neurones du RTN d'une combinatoire spécifique de facteurs de transcriptions (*Phox2b*, *Atoh1*), et l'étude d'une nouvelle mutation isolée chez des patients atteints de CCHS (*Lbx1fs*), les présents travaux visent à cibler les neurones du RTN avec une spécificité jamais atteinte dans le cas de l'étude d'une pathologie et dans le cadre plus global de la dissection de réseaux neuronaux du tronc cérébral. Le but ici est de mettre en lumière les liens existants entre les programmes développementaux précoces et l'apparition d'une activité physiologique à la naissance. Ces travaux visent à conforter ce rôle absolu du RTN dans le chémoréflexe central au CO₂ à la naissance, éliminant de fait les nombreux autres sites candidats encore explorés par la communauté. Ces travaux permettent de légitimer une focalisation de la recherche thérapeutique sur ce groupe de neurones et permettent, grâce à la forte spécificité des outils génétique utilisés, de lever les derniers points d'ombre encore inexpliqués.*

MATÉRIELS & MÉTHODES

Le travail présenté dans cette thèse vise à comprendre (i) l'implication de l'oscillateur RTN dans les phénomènes de chémoception centrale ainsi que (ii) déterminer les événements développementaux conditionnant son émergence fonctionnelle et son intégration au sein du CPG respiratoire. Notre stratégie d'étude repose sur une approche associant neurophysiologie et neurobiologie du développement. Cette étude a principalement été menée sur des lignées murines permettant, dans des sous-populations neuronales spécifiques, d'exprimer des protéines d'intérêt (protéine activatrice, inhibitrice, rapporteur) ou d'invalider sélectivement des facteurs de transcription suspectés d'être impliqués dans le développement de cette structure.

L'étude du comportement respiratoire a été effectuée *in vitro* par des méthodes électrophysiologiques et d'imagerie fonctionnelle afin d'étudier la mise en place de l'oscillateur au cours du développement. En parallèle, ces altérations ont été anatomiquement examinées par des protocoles d'immunomarquages fluorescents ou d'hybridation *in situ* multiples sur coupes fines de tronc cérébral. Enfin, les diagnostics respiratoires ont été étudiés *in vivo* par l'enregistrement pléthysmographique de l'activité ventilatoire à la naissance, puis au cours du vieillissement.

Bien que les travaux présentés ici n'impliquent pas directement la réalisation des différentes lignées transgéniques, il est important au cours de la première partie de ce chapitre de comprendre leurs spécificités propres. Par la suite seront détaillés les protocoles expérimentaux mis en œuvre dans l'étude du comportement respiratoire.

I. Présentation des lignées murines

1. Généralités

L'ensemble des expériences présentées dans ce travail de thèse a été réalisé en accord avec les directives françaises du ministère de l'agriculture et suivent les recommandations européennes visant au respect de l'animal de laboratoire. Les lignées sont entretenues et croisées au sein de l'animalerie centrale du campus CNRS de Gif-sur-Yvette dans des conditions d'élevage standard (cycle jour/nuit de 12 heures, température des salles 23 °C) par du personnel qualifié. L'animalerie assure un niveau de confinement de type P2 empêchant la dissémination des animaux transgéniques. Les animaux sont élevés dans des cages disposant de capot filtrant et changés une fois par semaine sous hotte afin de garantir un bon état

MATÉRIELS & MÉTHODES

sanitaire. Les animaux sont groupés en fonction de leur génotype et de leur sexe au sein d'une même cage (maximum 5 animaux) et ceci afin de favoriser les interactions sociales.

Lorsque cela est possible, les lignées sont maintenues à l'état homozygote en croisant entre eux des parents possédant la mutation sur les deux allèles. Dans le cas contraire les animaux portant la mutation à l'état hétérozygote sont croisés avec des animaux C57BL6/j obtenus chez un éleveur (Janvier Labs) dans le but de maintenir l'homogénéité du fond génétique. Afin de minimiser les variabilités pouvant être dues, d'une part, au fond génétique des souches murines et, d'autre part, à des variations dans les stades développementaux, les expériences contrôles sont effectuées sur des animaux sauvages (ou hétérozygotes) en provenance des mêmes portées que ceux portant la modification génétique. Notre approche étant basée sur l'étude de la mise en place des réseaux neuronaux constitutifs des oscillateurs au cours de stades développementaux précis, les croisements sont effectués la nuit et la détection d'un bouchon vaginal le lendemain matin permet de définir le stade E0.5.

Il est important ici de préciser que dans la suite de ce manuscrit il sera considéré qu'un animal est génétiquement modifié s'il possède une ou des séquences géniques modifiant l'intégrité de son génome. L'allèle muté d'un gène produira ainsi soit une protéine altérée pouvant être non fonctionnelle, ou aucune protéine comme c'est le cas lorsque la séquence codante est délétée. Pour la majorité des lignées utilisées dans cette étude, à l'exception des mutants *Phox2b*^{27AlaCKI}, la présence d'une seule copie de l'allèle sauvage suffit à garantir l'expression d'une protéine fonctionnelle et à la bonne réalisation de fonction du gène sur l'organisme. On parle alors d'haplo-suffisance. Le terme de mutant sera ainsi réservé aux animaux homozygotes chez lesquels la fonction finale du gène est altérée ou perdue, pouvant entraîner un phénotype à l'échelle cellulaire ou de l'organisme. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour générer de tels animaux allant de la mutagenèse aléatoire à la mutagenèse dirigée qui permet soit de déléter spécifiquement par recombinaison homologue une séquence codante par une séquence d'intérêt (on parle alors de Knock-Out ou KO) soit de remplacer cette séquence par une séquence codant pour une protéine d'intérêt (protéine rapporteur par exemple). On parle alors de Knock-In (KI). Les animaux portant des modifications des séquences géniques n'affectant pas la fonction du gène seront désignés par des termes plus appropriés. C'est par exemple le cas dans les systèmes d'expressions conditionnelles de type Cre/lox (ou Flipase/FRT) chez lesquels il est possible d'induire ou de déléter de manière conditionnelle une séquence codante suite à l'expression de protéine recombinante. Dans ces cas de figure, nous parlerons de lignées Cre, c'est-à-dire de lignées exprimant la protéine Cre-

recombinase sous le contrôle d'un gène cible, et de lignées flox chez lesquelles un élément de régulation génique ou un gène entier se retrouve entouré de séquence lox. Ce système sera présenté dans un prochain paragraphe. De même, lorsqu'une lignée transgénique possède dans une région non codante du gène une cassette gouvernant l'expression de protéines exogènes (protéine rapporteur, Cre-recombinase), le terme de mutant ne sera pas employé.

2. Les lignées de souris Knock-Out/Knock-In

2.1- Lignée *Vglut2::ChR2-YFP*

Cette lignée produite au sein de laboratoire de Ole Kiehn du Karolinska Institute permet d'exprimer le canal cationique photo-sensible ChR2 sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2. Ce transporteur assure le chargement en glutamate de la majorité des neurones excitateurs du tronc cérébral (*Hägglund et al., 2010*). Ce canal a été fusionné en sa partie N-terminale avec une protéine fluorescente rapporteur eYFP (enhanced Yellow Fluorescent Protein) permettant de localiser au sein du tronc cérébral les populations neuronales exprimant ce canal. Cette lignée permet de (i) stimuler grâce aux outils d'optogénétique les populations glutamatergiques du tronc cérébral et ainsi moduler leur pattern de décharge et, dans une moindre mesure, (ii) marquer par l'expression de la eYFP des neurones glutamatergiques du tronc cérébral.

Développée dans un premier temps dans le cadre de l'étude des circuits neuronaux du tronc cérébral impliqués dans la locomotion, cette lignée est pour nous un outil particulièrement intéressant. En effet, le RTN étant composé de neurones glutamatergiques localisés à la surface ventrale du tronc cérébral, cette structure est optiquement accessible pour l'utilisation d'approches mettant en jeu les outils optogénétiques. De plus, au cours des phases de développement précoces, les neurones du RTN présentent une importante résistance membranaire (*Thoby-brisson et al., 2009*). Celle-ci permet d'engendrer une dépolarisation du potentiel membranaire suffisante pour déclencher des bouffées de potentiel d'action, palliant à la faiblesse des courants ioniques (quelques pA) provoqués par le faible temps d'expression de ces protéines photosensibles.

Cette lignée fut produite grâce à l'insertion d'une séquence codante pour la *ChR2-YFP* au sein d'un Chromosome Artificiel Bactérien (BAC) contenant une séquence génomique du gène *Vglut2*. Cette séquence fut placée à la suite du promoteur de *Vglut2*, en amont des 12

MATÉRIELS & MÉTHODES

exons codant pour le transporteur. Par la suite, le BAC fut linéarisé et micro-injecté dans des cellules souches embryonnaires (ES). Par recombinaison homologe, un échange entre la séquence native du *vGlut2* contenue dans le génome endogène des cellules ES et la séquence contenue dans le BAC permet l'insertion du transgène dans la séquence codante au sein des cellules. Puis ces cellules ES furent réintroduites dans des blastocystes avant d'être implantées dans l'utérus de femelles pseudo-gestantes (processus de fécondation *in vitro*). Les animaux chimériques constitués de cellules sauvages et de cellules issues de la recombinaison ont été identifiés au moyen de génotypage par réaction de polymérisation en chaîne à l'aide de amorces appropriées (voir partie II.1.4). Les animaux hétérozygotes ainsi produits portent une copie de la construction génétique, sont viables et fertiles.

Cette lignée est maintenue à l'état homozygote sur un fond génétique C57BL6/j par croisement permanent entre mâles hétérozygotes et femelles sauvages. Les expériences sont effectuées à partir d'animaux issus de ce même croisement après détection du bouchon vaginal.

2.2- Lignée *Dbx1^{LacZ}*

Cette lignée permet i) de suivre, à l'état hétérozygote, la descendance cellulaire V0 des progéniteurs p0 définis par l'expression de *Dbx1* (lignée rapporteur) et ii) caractériser, à l'état homozygote, les altérations anatomo-fonctionnelles provoquées par l'absence d'expression du gène (lignée à la fois rapporteur et mutants nuls). Cette lignée, issue du laboratoire du Dr Alessandra Pierrani, a été décrite dans de nombreuses publications portant sur le développement embryonnaire de la moelle épinière (*Pierrani et al., 2001 ; Moran-Rivard et al., 2001 ; Lanuza et al., 2004*) et du cortex (*Bielle et al., 2005*).

Cette lignée a été obtenue par recombinaison homologue d'une séquence codante de 4 kb du gène *Dbx1*, comprenant les exons 1 à 4, par le gène *LacZ* codant pour la protéine β -Galactosidase (β -Gal) précédé du signal de localisation nucléaire (nslLacZ) de sorte que la séquence de *Dbx1* fut intégralement excisée et que ses séquences régulatrices contrôlent, à la place, l'expression de la protéine rapporteur.

A l'état hétérozygote (*Dbx1^{LacZ/+}*), les animaux ne portent qu'une seule copie de la construction génétique et sont viables, fertiles et sans phénotype fonctionnel. Les neurones V0 dérivant des progéniteurs p0 expriment cependant la protéine β -Gal au niveau nucléaire, ce qui les rend identifiables par les méthodes immunohistochimiques. Cette expression débute en

même temps que l'expression endogène de *Dbx1*, c'est à dire à partir des stades précoces de régionalisation dorso-ventrale (E9-E10), mais perdure cependant bien après le stade post-mitotique permettant de rendre ces cellules identifiables jusqu'à la naissance. Ces animaux constituent donc une lignée rapporteur du lignage cellulaire dérivant des progéniteurs p0. Les animaux homozygotes (*Dbx1^{LacZ/LacZ}*) ne portent aucune version fonctionnelle du gène *Dbx1* et constituent des mutants nuls. En l'absence de *Dbx1*, les progéniteurs potentiels ne sont pas éliminés mais re-spécifiés en sous-types cellulaires différents qu'il est possible de suivre grâce à l'expression de la β -Gal. Les travaux initiés par le Docteur Pierrani ont permis de démontrer que l'absence de *Dbx1* dans la moelle épinière induit une augmentation du nombre de neurones post-mitotiques de type dB4 et V1. Ces mutants se développent normalement mais meurent rapidement à la naissance de défaut respiratoire résultant de l'absence d'un preBötC fonctionnel (Bouvier *et al.* 2010). Comme précédemment, cette lignée est maintenue à l'état homozygote dans un fond génétique C57BL6/j.

3. Les lignées conditionnelles

L'utilisation des systèmes de transgénèse de type KO/KI présente l'avantage de permettre d'étudier les effets de mutations de type « perte de fonction » sur le développement d'un système cellulaire ou d'un organisme. Cependant, ces approches possèdent de nombreux inconvénients. Au cours du développement de nombreux facteurs de transcription vont être exprimés de manière dynamique suivant une organisation spatio-temporelle spécifique. Ces facteurs gouvernent, à un stade développemental particulier, la mise en place d'une fonction dans un sous-type cellulaire donné. De fait un même facteur de transcription peut, en fonction du sous-type cellulaire et/ou du stade développemental auquel il est exprimé, avoir une fonction différente sur la régulation des cascades d'expressions génique sous-jacentes. Nous pourrions ici citer le cas du facteur de transcription *Atoh1* comme exemple illustrant cette ambiguïté. Au cours des stades post-mitotiques (E10-E11), *Atoh1* est impliqué dans la mise en place et la spécification de divers types de cellules nerveuses au sein du cervelet et du tronc cérébral (Wang *et al.* 2005, Huang *et al.* 2012). Plus tardivement (E16.5) ce facteur de transcription gouverne la mise en place des cellules entéro-endocrines sécrétrices au sein de l'épithélium intestinal (Yang *et al.*, 2001). Aux stades post-nataux il interagit avec la voie de signalisation *Shh* et pourrait dans certains modèles de médulloblastome prévenir l'apparition de néoplasie cérébelleuse (Flora *et al.*, 2010).

Ainsi, la perte de fonction d'un facteur de transcription peut avoir de très nombreux effets non spécifiques sur le développement d'un tissu rendant ainsi compliqué l'étude de la fonction d'un gène sur la mise en place d'un type cellulaire particulier. Depuis quelques années, les progrès réalisés dans les techniques de génie génétique offrent la possibilité d'interagir de manière plus spécifique avec la fonction d'un gène grâce aux lignées mutantes conditionnelles. Pour cela, la modification d'un gène d'intérêt (délétion ou expression d'un autre gène) ne sera exprimée que si une condition préalable est vérifiée. De telles modifications conditionnelles du génome, permettant de fortement accroître la spécificité de la mutation, sont rendues possibles chez le modèle murin par l'utilisation d'un procédé nommé le système Cre/lox. Ce système repose sur deux lignées transgéniques distinctes qui une fois croisées produiront des descendants portant la mutation conditionnelle.

3.1- Le système Cre/lox

La Cre recombinase est une protéine de 38 KDa de la famille des intégrases du bactériophage P1 pouvant catalyser la recombinaison de séquences géniques entre deux sites nucléotidiques de reconnaissance appelé sites LoxP. Ces derniers sont constitués de séquence d'ADN de 34 pb comprenant à leur extrémité des nucléotides palindromiques. Normalement absentes des cellules eucaryotes, ces séquences artificiellement introduites autour d'une séquence génique d'intérêt permettent la fixation de la Cre-recombinase et l'excision (ou l'inversion en fonction des constructions) de la séquence contenue entre les deux sites LoxP.

Ce système repose sur l'utilisation de deux lignées transgéniques distinctes. Une première lignée exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle d'une séquence régulatrice particulière comme, dans le cadre de ces travaux, les séquences promotrices de facteur de transcription. Dans cette lignée, toutes les cellules exprimant, ou ayant exprimée, ce facteur de transcription vont produire la protéine recombinase. La seconde lignée, appelée lignée floxée, contient au sein de son génome une séquence nucléotidique entourée de deux sites LoxP. Après croisement, les animaux héritant des deux constructions subiront la recombinaison dans les cellules répondant à ce double critère. Dans notre cas d'étude, seules les cellules dérivant de progéniteurs exprimant le facteur de transcription d'intérêt pourront exprimer la Cre-recombinase et exciser les séquences géniques floxées. Dans les autres sous-types cellulaires, la mutation ne sera pas exprimée.

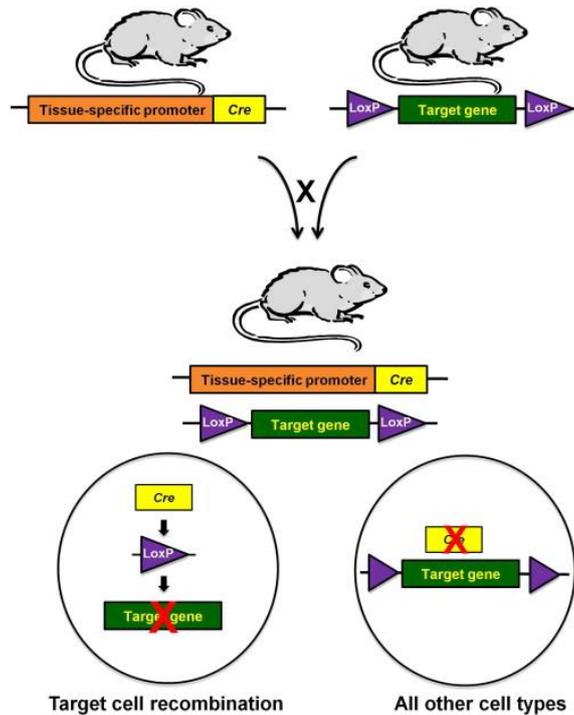


Figure 19 : Principe de mutagénèse conditionnelle utilisant le système Cre/lox

Une lignée de souris transgénique exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur spécifique du gène A (condition 1) est croisée avec une lignée floxée portant une séquence génique entourée de deux sites LoxP. Dans la descendance, les cellules exprimant le gène A synthétisent la protéine Cre permettant l'excision de la séquence génique floxée. Ce procédé peut être utilisé pour inactiver un gène comme c'est le cas lorsque les sites lox sont placés de part et d'autre d'un exon ou au contraire permettre son expression dans le cas où la séquence floxée permet l'excision d'une séquence STOP.

La nature de la séquence nucléotidique floxée conditionne la conséquence phénotypique de l'excision. Si les séquences LoxP sont situées de part et d'autre d'un gène d'intérêt, sa recombinaison, à l'état homozygote, induira son invalidation et la perte de sa fonction. Si les séquences LoxP entourent une séquence de régulation empêchant l'expression (codon stop) d'une protéine exogène l'excision provoquera une perte de cet élément de régulation permettant la production de la protéine dans un type cellulaire spécifique.

Il est cependant important de garder à l'esprit que dans le cadre de ces mutations conditionnelles de nombreuses contraintes peuvent influencer sur l'obtention du génotype. Dans le cadre d'une mutation de type perte de fonction, il est nécessaire de rappeler que les deux allèles doivent être excisés afin d'éviter les phénomènes d'haplo-suffisance. Pour obtenir de tels génotypes, il faudra obtenir dans la descendance des animaux portant une version du gène floxé sur chacun des deux chromosomes ($gèneB^{lox/lox}$). Dans le cas d'une mutation létale, cas pour lequel ces mutations conditionnelles utilisant le système Cre/lox sont majoritairement utilisées, il sera nécessaire de croiser des animaux $gèneA::Cre ; gèneB^{lox/+}$ avec des animaux $gèneB^{lox/lox}$. Si les gènes A et B sont génétiquement indépendants, à l'issue de la méiose, la

MATÉRIELS & MÉTHODES

probabilité d'obtenir des animaux mutants $gèneA::Cre ; gèneB^{lox/lox}$ sera d'environ $1/4$. En revanche si les deux gènes sont génétiquement liés ils auront tendance à ségréger ensemble et la probabilité d'obtenir un événement de recombinaison sera alors inversement proportionnelle à la distance les séparant.

Une seconde contrainte inhérente à l'utilisation des systèmes de mutation conditionnelle implique l'expression dynamique des gènes. Dans des contextes développementaux pour lesquels certains gènes peuvent être exprimés pendant des durées très brèves (de quelques heures à quelques jours), ces phénomènes sont particulièrement importants. En effet, pour pouvoir réaliser l'excision d'une construction floxée, il faut que le gène gouvernant l'expression de la Cre-recombinase soit exprimé précocement. Les processus de synthèse protéique pouvant prendre plusieurs heures, il est important que la fenêtre temporelle de chevauchement entre les deux gènes soit suffisamment longue. Le cas échéant, la séquence génomique modifiée après excision ne sera peut-être plus traduite rendant l'excision du gène sans conséquence. De même, une excision trop tardive pourrait abolir que partiellement les effets d'une protéine dans un sous-type cellulaire donné. Enfin, dans le cadre d'une protéine rapporteur ou de l'expression d'allèle toxique, une expression temporellement réduite pourrait ne pas avoir les effets escomptés (marquage ou dégénérescence cellulaire).

En conclusion, les systèmes de mutagenèse conditionnelle offrent de très nombreux avantages pour l'étude de mutations létales et pour l'investigation de sous-populations neuronales en rendant les mutations beaucoup plus spécifiques. Cependant, ce type de mutagenèse reste sous le coup des lois de la mutagenèse classique et nécessite que l'expression de la Cre-recombinase se fasse en amont de l'expression du gène portant la construction floxée et persiste dans le temps.

3.2- Les lignées Cre

3.2.1- Lignée Atoh1CreERT2

Cette lignée, produite au sein du laboratoire de Dr. Mikio Hoshino, exprime une version modifiée de la protéine Cre-recombinase au sein des cellules exprimant le facteur de transcription *Atoh1*. Dans cette lignée inductible, initialement développée par les professeurs Chambon et Metzger, la protéine Cre-recombinase est fusionnée au récepteur aux ñ strogènes

ERT2. L'expression de la Cre recombinase étant dépendante de l'injection d'un agoniste du récepteur ERT2, le tamoxifène, cette lignée permet un contrôle spatio-temporel très précis de la mutagenèse somatique. Par recombinaison homologe, une cassette pBS-pro-CreERT2-polyA-Néo a été insérée dans la partie 5' de l'ORF du gène *Atoh1* (Fujiyama *et al.*, 2009). La spécificité de cette lignée a été vérifiée grâce à des croisements avec des lignées rapporteurs floxées. *Atoh1* ayant pour particularité d'être exprimé tardivement et *de novo* à partir du stade E12.5 dans les cellules constitutives du RTN (Dubreuil *et al.*, 2010) cette souris devait être initialement utilisée afin d'exciser spécifiquement le facteur de transcription Phox2b (*Phox2b^{lox/lox}*) ou d'exprimer l'allèle toxique du gène Phox2b (*Phox2b^{27AlaCKI}*) dans le lignage neuronal de *Atoh1*. Cependant, suite à l'impossibilité technique de réaliser ces expériences, cette lignée fut utilisée afin d'étudier les effets engendrés par la perte du gène *Atoh1* (KO *Atoh1*) sur la mise en place du RTN. Cette lignée est maintenue à l'état homozygote par croisement permanent entre mâles hétérozygotes et femelles sauvages C57BL6/j.

3.2.2- Lignée *Atoh1^{ΔFRT:Cre}*

La lignée *Atoh1^{ΔFRT:Cre}* a été générée par l'équipe du docteur J-F Brunet de l'ENS. Initialement cette lignée contenait une construction *Atoh1^{FRT:Cre}* permettant l'expression de la Cre-recombinase au sein des neurones *Atoh1* après excision du codon stop par une flipase. De ce fait cette lignée devait permettre une expression spécifique de la Cre dans des populations neuronales en suivant deux critères de conditionnalité, d'une part l'expression du facteur de transcription *Atoh1* et d'autre part celle imposée par la flipase dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur d'un second gène.

Dans le cadre de nos études, il fut nécessaire de générer une lignée *Atoh1^{:Cre}* non conditionnée par l'expression d'une protéine flipase. Ce choix fut motivé par les nombreux problèmes rencontrés lors de l'utilisation de la lignée inductible *Atoh1^{ERT2Cre}*. Bien que le gavage des souris gestantes au stade E12.5 (5 mg pour une souris de 40g) permette d'obtenir une recombinaison efficace au sein des neurones constitutifs du RTN, les embryons issus de ces manipulations ont révélé de sévères troubles du réseau respiratoire. Les études physiologiques effectuées à E14.5 ont permis de mettre en évidence une forte diminution de l'activité rythmique du RTN. Au stade E16.5, les fréquences de décharge du réseau étaient fortement diminuées et s'accompagnaient d'une perte du chémoréflexe central. De manière surprenante, l'ensemble des animaux de la portée, même ceux ne portant pas la construction Cre, semblaient touchés par ce phénomène. Parallèlement, les animaux traités

MATÉRIELS & MÉTHODES

présentaient, dans les heures suivant la parturition, un très fort taux de mortalité. Dans la plupart des cas, les embryons naissaient mal formés, avaient de graves défauts respiratoires et finissaient par mourir après quelques minutes. Dans le cadre d'une étude sur l'évolution du chémoréflexe central aux stades *post-nataux*, l'utilisation de cet outil n'était pas adéquate. L'étude de la littérature nous a révélé que des problèmes similaires avaient été observés dans d'autres laboratoires. Certaines études pharmacologiques démontrent que cette substance peut être utilisée comme un inhibiteur des jonctions communicantes, expliquant en partie les défauts respiratoires observés chez les contrôles. A cause de ces effets toxiques sur le développement embryonnaire, ce système d'induction est peu utilisé durant les stades précoces de la vie mais reste un outil de choix pour les études chez l'adulte.

C'est afin de résoudre ce problème que nous avons éliminé la conditionnalité imposé par la flipase par excision du locus FRT-dépendant grâce à une flipase ubiquitaire (*PGK^{::FLP}*). Ces croisements ont permis d'obtenir des animaux exprimant la Cre de manière constitutive. Cependant la construction utilisée (insertion d'une cassette Cre dans la partie 3'UTR du gène *Atoh1*) ne permet pas, lors de croisement entre hétérozygotes, d'obtenir une invalidation du gène justifiant l'utilisation de deux lignées transgéniques.

3.2.3- Lignée *Phox2b::CreBAC1*

La lignée transgénique contient une construction permettant l'expression de la Cre-recombinase dans les neurones *Phox2b*. Cette construction BAC contient le gène codant pour la recombinaison Cre fusionné à la séquence codant les 82 premiers acides aminés de la protéine *Phox2b*. Cette construction fut par la suite insérée par recombinaison homologue dans le génome d'un blastocyte avant d'être injectée par fécondation *in vitro* dans l'utérus d'une mère porteuse (*D'Autréaux et al., 2011*).

3.2.4- Lignée double conditionnelle *Atoh1^{FRTCre};Phox2b::FLPo*

Dans le but de pouvoir cibler l'expression de certaines mutations spécifiquement au sein des neurones du RTN, nous avons eu recours à une stratégie mettant en jeu une double conditionnalité d'expression des facteurs de transcription *Phox2b* et *Atoh1* (voir Figure 19). En utilisant le fait que l'expression de *Atoh1* au sein des neurones du RTN se fait *de novo* à partir de E12.5, nous avons pu démontrer que cette double conditionnalité permettait de restreindre le pattern d'expression de la Cre à la population du RTN ainsi qu'à une autre petite population située autour du noyau moteur du trijumeau (nommé par la suite neurones du

periV). Cette combinatoire particulière représentait dès lors un outil extrêmement sélectif assurant une spécificité cellulaire rare dans le cadre des études des populations du système nerveux central. Pour obtenir ce génotype, des souris *Atoh1^{FRT Cre}* sont croisées avec des souris exprimant la protéine Flipase sous le contrôle de la séquence promotrice du gène *Phox2b* (*Phox2b::FLPo*). La lignée ainsi obtenue est maintenue à l'état de double hétérozygote. Par la suite ces animaux sont croisés avec des lignées rapporteurs (*R26^{tdTomato-YFP-lox/lox}*) ou des lignées permettant l'expression de canaux photo-sensibles excitateurs (lignée *Ai32^{ChR2lox/lox}*) ou inhibiteurs (lignée *Ai35^{Arch lox/lox}*).

3.2.4- Lignée *Dbx1::Cre*

Ces animaux expriment la Cre recombinase au sein des neurones progéniteurs p0 caractérisés par l'expression de *Dbx1*. Cette lignée est obtenue par recombinaison homologue grâce à l'insertion d'une cassette IRES-Cre-pGK-Hygro dans la région non transcrite 3'UTR du gène *DBX1* (*Bielle et al., 2005*). La lignée, généreusement fournie par le docteur Alessandra Pierani (Institut Jacques Monod, Paris) est maintenue dans l'animalerie centrale du campus de Gif-sur-Yvette par croisement entre mâles hétérozygotes mutants et femelles sauvages C57BL6/j.

3.2.5- Lignée *Krox20^{Cre}*

Cette lignée, notée dans la publication 1 et 2 *Egr2^{Cre}*, permet l'expression de la Cre recombinase au sein des neurones dérivant des territoires rhombomériques 3 et 5. Cette lignée développée et fournie par le laboratoire de P. Charnay à l'ENS Ulm est obtenue par insertion d'une cassette codant pour la Cre dans le locus *Krox20*. Ce KI est maintenu à l'état hétérozygote (*Voiculescu et al., 2000*).

3.3. Les lignées floxées

3.3.1- Lignée *Atoh1^{lox/lox}*

Cette lignée, générée et obtenue grâce au Dr. Hoshino, contient des insertions de sites LoxP de part et d'autre de la séquence codante du gène *Atoh1* (*Shroyer et al., 2007*). Suite au croisement avec une lignée *Phox2b::CreBAC1*, l'excision permet d'obtenir un allèle nul pour le locus *Atoh1* au sein du lignage *Phox2b*. La partie 3'UTR n'étant pas contenue entre les séquences lox, nous avons généré une sonde nucléotidique nous permettant l'observation de l'ensemble des neurones exprimant *Atoh1*, dont les neurones ayant subi l'évènement de

MATÉRIELS & MÉTHODES

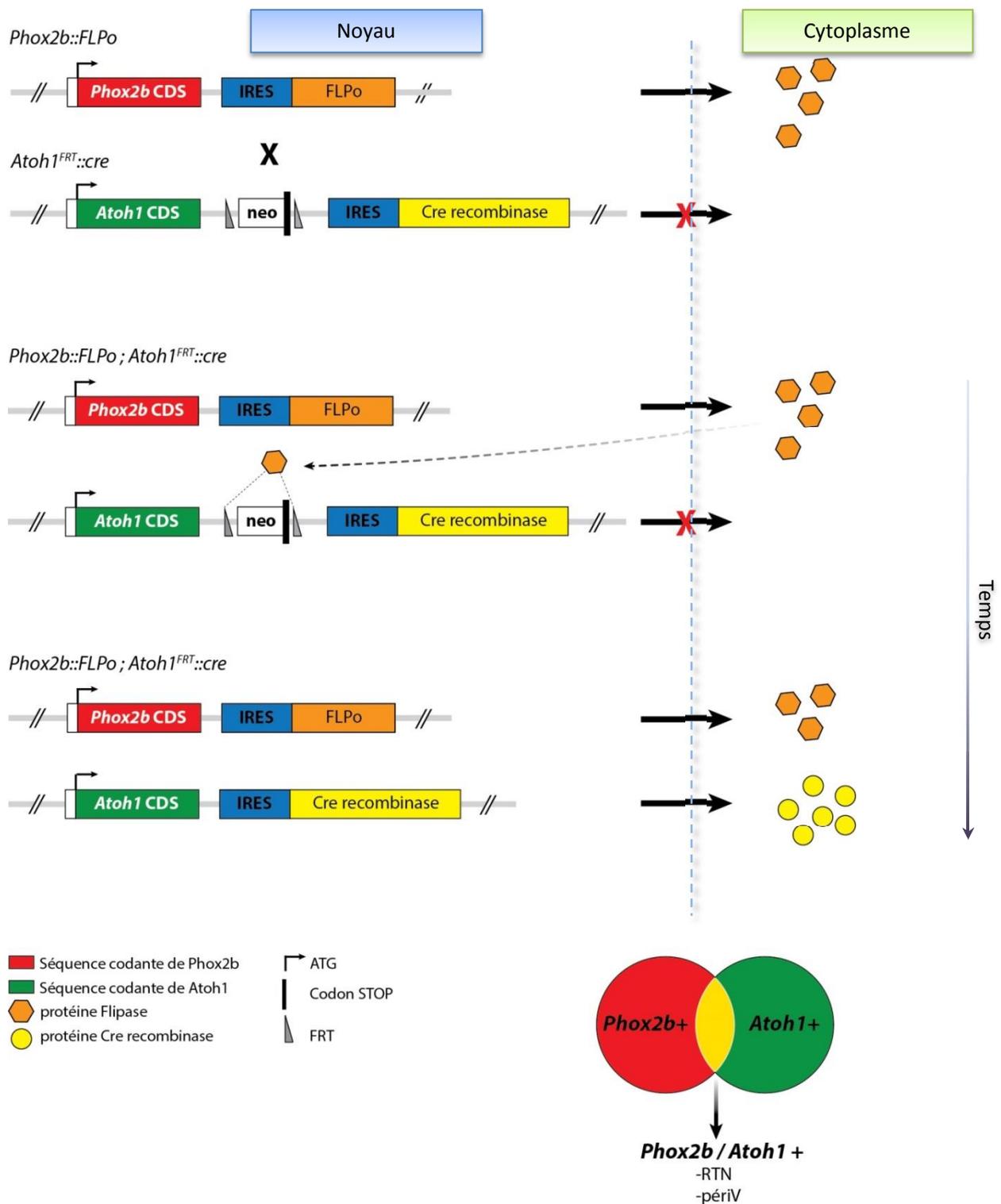


Figure 19 : Ciblage génétique des neurones du RTN grâce à l'utilisation de la lignée double conditionnelle *Atoh1^{FRTCre}; Phox2b::FLPo*

La protéine FLPo est synthétisée au sein du lignage Phox2b précocement dans les précurseurs neuronaux. Suite à son accumulation, la protéine est transloquée dans le noyau où elle va déléter la séquence génique du codon STOP entourée de sites FRT permettant la transcription puis la synthèse de la Cre-recombinase dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur du gène *Atoh1*. L'enchaînement temporel de ces événements permet la production de protéines recombinantes des neurones du lignage Atoh1+ à partir du stade embryonnaire E12.5, permettant de cibler les populations constitutives du RTN et des neurones du périV

recombinaison. Grâce à ces approches de hybridation *in situ* (décrit dans la partie II.1.3.3), nous avons été capables de suivre la migration des neurones Phox2b+/Atoh1- au cours de l'embryogénèse, permettant de corroborer les observations obtenues lors des approches physiologiques avec les données anatomiques.

3.3.2- Lignée *Dbx1*^{DTA}

Cette lignée contient une construction floxée *Dbx1*^{LoxP-STOP-LoxP-DTA} permettant, après excision de la séquence stop par la Cre-recombinase, d'exprimer le fragment 1 de la toxine diphtérique (DTA) au sein des cellules *Dbx1*. La présence de l'allèle floxé à l'état hétérozygote suffit à induire l'expression de cette toxine conduisant à une mort cellulaire (Bielle *et al.*, 2005). Cette lignée, obtenue grâce au Dr. Pierani, a été utilisée pour générer des descendants *Vglut2::ChR2-YFP*, *Dbx1*^{DTA}, *Dbx1::Cre* chez lesquels les neurones du RTN peuvent être stimulés par la lumière mais dans lesquels les neurones constitutifs du preBötC sont génétiquement délétés (Bouvier *et al.*, 2010).

3.3.3- Lignée *Phox2b*^{27AlaCKI}

Cette lignée transgénique permet d'induire sous contrôle d'une Cre-recombinase l'extension de la queue poly Alanine de l'exon 3 du gène *Phox2b*. Pour cela, l'exon 3 du gène murin sauvage contenant la séquence codante suivie du codon stop est flanqué de séquence

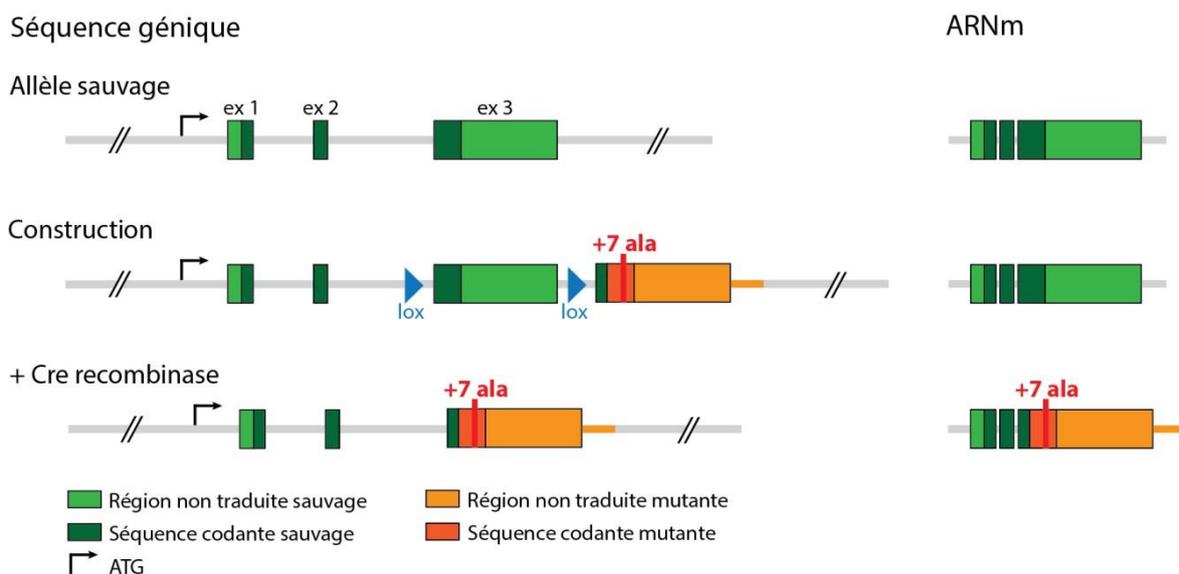


Figure 20 : Représentation schématique de la construction conditionnelle *Phox2b*^{27AlaCKI}

Présentation des événements de recombinaison permettant la synthèse de l'allèle toxique du facteur de transcription *Phox2b* de manière conditionnelle. En absence de protéine Cre-recombinase, la protéine sauvage est synthétisée et est effective. En présence de protéines recombinantes, l'exon 3 du gène *Phox2b* est délété et remplacé par la séquence mutante humaine caractérisée par une élévation de 7 résidus Alanine placés dans la partie N-terminale de la protéine.

MATÉRIELS & MÉTHODES

lox. L'exon3 mutant humain portant l'extension de sept résidus Alanine est inséré en aval du second site lox. Suite à l'excision par la Cre-recombinase, l'exon 3 sauvage est éliminé et remplacé par l'allèle muté. Cette mutation permet de mimer chez le modèle murin le syndrome humain CCHS (*Ramanantsoa et al., 2011*). Bien que le mécanisme induisant la mort cellulaire ne soit pas encore élucidé, il semblerait que la présence de cette protéine allongée empêcherait sa bonne dégradation provoquant la formation d'agrégats toxiques pour la cellule. Cette lignée, obtenue grâce au Dr. Jean-François Brunet est maintenue à l'état homozygote. Après croisement avec une lignée Cre spécifique des rhombomère 3/5 (*Krox20^{Cre}*) elle permet la délétion des neurones du RTN.

3.3.4- Lignée *Phox2b^{lox/lox}*

Cette lignée a pour particularité de posséder deux sites de reconnaissance LoxP situés de part et d'autre de l'exon 2 codant pour la majorité de l'homéodomaine du gène *Phox2b*. Celle-ci a été obtenue par recombinaison homologe entre le gène sauvage et un vecteur contenant un brin homologue 5' du gène d'une longueur de 5kb, un site loxP inséré dans le premier intro, l'exon 2 natif, un second site LoxP situé dans le deuxième intron et un brin homologue 3' de 4.5 kb (*Dubreuil et al., 2009*). Cette lignée de souris a été croisée avec la lignée *Atoh1^{ΔFRTCre}*. Ces croisements aboutissent à l'excision du gène *Phox2b* dans le lignage *Atoh1* et nous permettent de voir les effets de la perte de fonction *Phox2b* sur le développement du RTN.

3.3.5- Lignée *R26^{Tdtomato-lox/lox}*

Cette lignée transgénique contient une mutation au locus *Gt(ROSA)26Sor* contenant une séquence stop floxée empêchant la transcription d'une protéine rapporteur émettant dans des longueurs d'onde correspondant à la couleur rouge (*R26^{Tdtomato}*). L'expression de cette protéine est placée sous le contrôle d'un promoteur CAG (*Madisen et al., 2010*). Cette souris provenant du Laboratoire Jackson (USA) est maintenue à l'état homozygote.

3.3.6- Lignées *Ai32^{ChR2-lox/lox}* et *Ai35^{Arch-lox/lox}*

Dans le but de réaliser des stimulations optogénétiques permettant l'activation des populations neuronales constitutives du RTN, nous nous sommes procuré une lignée transgénique chez laquelle l'expression du canal cationique excitateur ChR2 est conditionnée par la présence d'un codon stop situé en amont de la partie codante du gène. Suite à l'excision

de ce codon, ce canal photosensible est exprimé au sein des cellules et permet, suite à des stimulations lumineuses ($\lambda = 473\text{nm}$), la genèse de courants cationiques entrants dépolarisants. Du fait que les gradients chloriques ne s'établissent que tardivement au cours du développement embryonnaire, notamment grâce à l'expression des co-transporteurs chloriques NKCC1 et KCC2, l'utilisation des protéines transmembranaires de type Halo-Rhodopsine était rendue impossible dans le cadre d'une stratégie visant à l'inhibition du RTN. C'est pourquoi nous nous sommes procuré une lignée exprimant de manière conditionnelle la pompe électrogénique Arch. Cette pompe génère, suite à une stimulation lumineuse ($\lambda : 560\text{ nm}$), un courant sortant protonique provoquant une hyperpolarisation de la membrane et la mise sous silence du neurone dans lequel il est exprimé (*Chow et al., 2010 ; Madisen et al., 2012*). Ces lignées ont été obtenues à partir du Jackson Laboratory et sont maintenues à l'état homozygote.

4. Génotypage des animaux

Ce procédé permet de détecter dans le génome des animaux étudiés la présence de la construction transgénique (mutation ou insertion) et de voir la nature de celle-ci. Il est réalisé à partir de matériel génétique issus soit de tissus embryonnaires obtenus lors de la dissection, soit à partir d'échantillons de queue prélevés entre les stades P2 et P15. L'échantillon peut être congelé ou utilisé directement après le prélèvement comme lors de génotypages « rapides » permettant l'identification des animaux portant la mutation quelques heures après le début de l'expérience. Dans les deux cas le protocole suivi est le même. L'ADN génomique des échantillons est extrait par lyse alcaline (20 min dans 100 μl de NaOH 50mM à 95°C). La réaction de lyse est ensuite stoppée par l'ajout de 50 μl de Tris-HCl 1M pH 7-8 permettant de tamponner la solution. Quelques microlitres d'ADN sont prélevés et mélangés avec une solution « MasterMix » contenant la Taq polymérase, les dNTPs, une solution tampon et un tampon de charge. Le génotypage est réalisé par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR) permettant d'amplifier sélectivement des séquences génomiques caractéristiques en fonction des amorces choisies. Les produits de PCR sont par la suite déposés sur un gel d'agarose 1.5% et soumis à une migration par électrophorèse entre 40 min et 3 heures en fonction de la taille de bande attendue. Les séquences obtenues permettent de discriminer les animaux sauvages ou mutants ainsi que l'état hétérozygote ou homozygote de la mutation. Les différentes séquences d'amorces ainsi que la taille attendue des produits de PCR sont présentés dans le tableau ci-dessous.

MATÉRIELS & MÉTHODES

Lignée	Séquence détectées	Amorce (5' vers 3')	Taille (pb)	Tm (°C)
<i>Ai32</i>	WT	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA	212	61
		CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC		
	Mut	ACA TGG TCC TGC TGGAGT TC	297	
		GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC		
<i>Ai35</i>	WT	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA	212	60
		CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC		
	Mut	TCC CAA AGT CGC TCT GAG TT	246	
		CTT TAA GCC TGC CCA GAA GA		
<i>Atoh1^{CreERT2}</i>	WT	GCG ATG ATG GCA CAG AAG G	600	64
		GAA GGG CAT TTG GTT GTC TCA G		
	Mut	TGA TGG ACA TGT TCA GGG ATC	400	
		GAA ATC AGT GCG TTC GAA CGC TAG		
<i>Atoh1^{ΔFRTcre}</i>	Cassette	GGG AGG ATT GGG AAG ACA AT	211	60
ACA ACG ATC ACC ACA GAC CA				
<i>Atoh1^{lox/lox}</i>	Mut	GCG ATG ATG GCA CAG AAG G	WT : 200	60
		GAA GGG CAT TTG GTT GTC TCA G	Mut : 350	
<i>Dbx1^{DTA}</i>	Cassette	GCGTGGTCAAAGTGACGTATC	300	60
		CGATTCTGCACAGGCTTG		
<i>Dbx1^{LacZ}</i>	WT	GAGGATGAGGAAATCACGGTC	200	66
		GCAAGGAAATGTCTCTGGGAC		
	Mut	GATCGGCCATTGAACAAGATG	100	
		AGAGCAGCCGATTGTCTGTTG		
<i>Lignées Cre</i>	Cassette	GTCCAATTTACTGACCGTACACC	700	60
		GTTATTCGGATCATCGCTACACC	297	
<i>Lbx1^{FS}</i>	Mut	CGC GCC AAG CTC AAG CGG GAC CTA G	WT : 400	60
		GTC CCA GCT CCC CTT AGC GGT CCG AT	Mut : 450	
<i>Lbx1^{KO}</i>	Mut	CGC CTT CCT CTC GCA CCG TC	WT : 200	60
		GGC AGC CCG GAD GAC	Mut : 250	
<i>Phox2b^{lox/lox}</i>	Mut	GGCCGGTCATTTTATGATC	WT : 250	60
		AAGTGCCTTGGGTGAGATG	flox : 297	
<i>Phox2b^{27AlaCK1}</i>	Cassette	GCCCACAGTGCCTCTTA ACT	474	60
		CTCTTAAACGGGCGTCTCAC		
<i>Phox2b^{FLPo}</i>	Cassette	GAG CTT CGA CAT CGT GAA CA	330	60
		ACA GGG TCT TGG TCT TGG TG		
<i>Tau^{GFP,LacZ}</i>	Cassette	AGT TCA CCC GTG CAC CGC	453	60
		CGC TCG GGA AGA CGT ACG		
<i>Vglut2::ChR2-YFP</i>	Cassette	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	530	50
		CCC CTC ACA GTA TTG GGT TC		

Tableau 1: Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes

Le tableau présente les séquences sens et anti-sens utilisées pour réaliser le génotypage des animaux, le type de séquence nucléotidique détecté, la taille des fragments attendus et la température d'hybridation

II. Investigations fonctionnelles in vitro

Dans le cadre de l'étude de la mise en place fonctionnelle du RTN nous avons réalisé des expériences à différents stades développementaux. Afin de déterminer la présence de l'oscillateur, nous avons réalisé des préparations *in vitro* à E14.5, stade où seule cette structure est fonctionnellement active. Les investigations ont principalement été réalisées par la méthode d'imagerie calcique permettant d'étudier l'activité du réseau dans des conditions contrôlée, d'acidose ou suite à l'application d'agents pharmacologiques.

Afin de comprendre plus en détail la façon dont l'oscillateur est intégré dans le réseau respiratoire, des enregistrements de l'activité électrique du nerf phrénique C4 ont été réalisés au stade E16.5/E18.5. A ce stade l'ensemble du CPG respiratoire est formé, fonctionnellement actif et rythmique.

Enfin, pour observer l'activité des réseaux constitutifs du preBötC et du RTN, ces structures ont été étudiées sur des préparations de tranche transverse de tronc cérébral au stade E15.5 (*Thoby-brisson et al., 2005, 2009*).

1. Prélèvement des embryons et préparation des troncs cérébraux

Les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale. Après incision de la paroi abdominale, les cornes utérines sont prélevées et placées dans du liquide cérébro-spinal artificiel (aCSF) continuellement oxygéné avec du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) et de composition suivante (en mM) : 120 NaCl, 8 KCl, 1.26 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 21 NaHCO₃, 0.58 Na₂HPO₄ et 30 Glucose, pH 7.4. Les embryons sont ensuite extraits des sacs embryonnaires puis placés dans de l'aCSF à 20°C et oxygénés de manière continue jusqu'à leur utilisation.

La préparation *en-bloc* dérive de celle mise au point par Suzue en 1984. Elle a pour principal avantage de maintenir l'intégrité tissulaire du tronc cérébral permettant l'enregistrement électrophysiologique des activités motrices respiratoires et la visualisation, par imagerie calcique de la surface ventrale, de l'activité des neurones du noyau moteur facial et des neurones constitutifs du RTN. L'ensemble des étapes de microchirurgie est réalisé sous loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et de micro ciseaux (Moria, France). Dans le cadre d'une approche ventrale, la face de l'animal est coupée afin de donner accès au contenu crânien. L'embryon est par la suite positionné sur le dos et maintenu à l'aide de minuties. Une incision de l'abdomen est réalisée et les différents organes internes sont enlevés. Le plancher

MATÉRIELS & MÉTHODES

crânien est délicatement disséqué afin de laisser apparaître le tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière. Le tronc cérébral est ensuite séparé du reste du système nerveux grâce à une section rostrale faite à l'intersection méso-rhombencéphalique et une section caudale sous les racines cervicales C5-C6.

Pour la réalisation de tranches transversales, un protocole dérivant de l'étude de Smith (*Smith et al., 1991*) est réalisé. Le tronc cérébral disséqué est rapidement inclus dans un gel d'agarose à bas point de fusion concentré à 4% préalablement chauffé. Le bloc est ensuite rapidement refroidi sur glace, collé sur un support et immergé dans la cuve du vibratome (Leica VT1000S) contenant de l'aCSF oxygéné maintenu à 4 °C. Dans le cadre de la réalisation de préparations réduites transverses contenant l'oscillateur preBötC, le bloc est collé de sorte à avoir la partie rostrale orientée vers le haut. Des tranches coronales de 200 µm sont effectuées jusqu'à ce que les noyaux moteurs du facial puissent être observés. Dès l'obtention d'une tranche dépourvue de ces repères anatomiques, une tranche de 450 µm est réalisée. Cette tranche située approximativement 200 µm caudalement aux noyaux moteurs du facial contient le preBötC qui se retrouve accessible par sa surface rostrale. Dans le cadre de l'obtention de tranches contenant l'oscillateur RTN, les découpes sont exécutées dans le sens caudo-rostral. Des tranches fines de 100 µm sont réalisées jusqu'à apparition des noyaux moteurs faciaux. Ce repère anatomique marque l'apparition du RTN et est utilisé pour la découpe d'une tranche épaisse de 450 µm. Après incubation dans une solution contenant une sonde fluorescente sensible aux concentrations intracellulaires de calcium, ces deux préparations permettent de mettre en évidence des populations neuronales déchargeant de manière synchrone et rythmique.

2. Enregistrement des activités neuronales

Après dissection, les préparations sont placées dans la chambre du poste d'enregistrement (V_{total} = 2 ml) et maintenues grâce à une grille de nylon. Les préparations sont perfusées de manière continue avec de l'aCSF thermostaté à 30 °C et continuellement oxygéné (débit 7.5 ml/min). Un délai de récupération de 30 min est respecté avant toute manipulation.

2.1- Approches par imagerie calcique

Les approches par imagerie calcique sont extrêmement informatives pour l'étude des réseaux neuronaux. A faible grossissement, elles permettent de visualiser les zones actives sur

des préparations réduites (*en-bloc* ou tranches transverses) et permettent d'établir des corrélats entre différentes structures respiratoires. A plus fort grossissement elles permettent de suivre l'activité unitaire d'une petite population de neurones et nous informent sur les propriétés sous-tendant l'activité du réseau. Afin de diagnostiquer la présence d'un RTN fonctionnel, les expériences sont réalisées sur des troncs cérébraux prélevés au stade E14.5. Ceux-ci sont préalablement incubés dans une solution de CSF oxygénée contenant 2% de DMSO, 0.2% de crémosol et 10 μ M de l'indicateur calcique Calcium Green (CaG-1AM, Invitrogen) pendant 40 minutes. Le calcium green 1AM est une sonde calcique non ratiométrique portant un groupement acetomethoxyester lui conférant un caractère hydrophobe. Suite au passage à travers la paroi cellulaire, le groupement ester est clivé par les estérases endogènes piégeant la sonde dans le cytoplasme. L'étude des variations de fluorescence au cours du temps permet d'étudier, tant à l'échelle du réseau neuronal qu'à l'échelle cellulaire, l'activité électrophysiologique des neurones respiratoires aux stades embryonnaires (*Thoby-Brisson et al., 2005,2009*) et post-nataux (*Koshiya and Smith, 1999*). Après incubation, les préparations sont transférées dans la chambre d'enregistrement et positionnées de sorte à avoir la surface ventrale vers le haut. Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (E-600-FN, Nikon ©, Japon) équipé d'un filtre fluorescéine (Ex 465-495 /DM 505 / BA 515-555) grâce à une caméra CCD refroidie (200 ms d'exposition, mode simultané, Neo sCMOS, ANDOR Technology ©, Belfast, UK) pilotée par le logiciel PhysImage (ImageJ). Les variations de fluorescence sont capturées pendant des périodes de 1 à 3 minutes puis les séquences sont converties en pourcentage de variation de fluorescence ($\Delta F/F$) par l'application d'un filtre permettant de s'affranchir de la décroissance de fluorescence due au photobleaching (Kalman Stack Filter, ImageJ). Pour les illustrations, des pseudo-couleurs sont appliquées sur les images présentant soit une bouffée d'activité calcique enregistrée à un instant donné soit une projection représentant la somme des variations calciques (CTA : Cycle Trigger Average) observées durant une période.

2.2- Approches électrophysiologiques

Dans ces travaux trois types d'activités électriques ont été étudiés : i) l'activité résultante du réseau respiratoire obtenue par l'enregistrement du nerf phrénique C4, ii) l'activité macroscopique de populations neuronales sur des préparations *en-bloc* ou en tranche transverse et iii) l'activité électrique unitaire de neurones obtenus par la méthode du patch-clamp.

2.2.1- Enregistrement des nerfs

Le diaphragme, innervé par la racine ventrale du nerf phrénique C4, est le muscle inspiratoire principal. En conséquence, son activité électrophysiologique reflète, sur des préparations *en-bloc*, l'activité respiratoire. Dans le cadre de ces travaux de thèse, les enregistrements sont effectués au stade E16.5, date à laquelle le RTN est fonctionnellement couplé au preBötC et ainsi entraîne le réseau respiratoire de manière chémo-dépendante. Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'une électrode de succion placée sur des micro-manipulateurs. Les macro-électrodes sont fabriquées à partir de tubes de verre borosilicatés (CEI, Harvard apparatus ©, 120F-10, Massachusetts, USA) étirés (étireuse Flaming-Brown P97, Sutter Instruments ©) puis cassés afin d'obtenir un diamètre de pointe de 100 à 150 μm . La racine ventrale C4 est délicatement aspirée dans l'électrode préalablement remplie de CSF. Cette étape permet d'assurer le continuum électrique entre le nerf et le fil d'argent chloruré. Le signal brut acquis, représentant la somme algébrique des activités nerveuses générées par les motoneurons respiratoires, est par la suite amplifié (high-gain AC, 7P511 ; Grass Instruments ©, USA) et filtré (bande passante 3Hz-3KHz). Pour faciliter l'analyse des données, le signal est intégré (constante de temps 100ms, Neurolog System, Digitimer ©, UK) avant d'être digitalisé (fréquence d'échantillonnage 10KHz, Digidata A322A, Molecular devices) et enregistré sur ordinateur grâce au logiciel d'acquisition pClamp9 (Axon Instrument ©). Le poste est équipé de deux circuits d'enregistrement permettant l'étude de l'activité nerveuse de deux racines distinctes ou de deux préparations de manière simultanée.

2.2.2- Enregistrement des populations neuronales

L'étude des activités électriques macroscopiques de populations neuronales utilise le même système d'enregistrement que celui précédemment décrit. La pipette est, dans cette configuration, cassée pour obtenir un biseau. Cette forme particulière permet d'optimiser l'acquisition des signaux électriques en augmentant la résistance électrique entre le tissu et l'électrode d'enregistrement. Elle est positionnée sur la surface de la structure neuronale qu'on veut enregistrer.

2.2.3 Enregistrement de cellule unitaire

Les enregistrements de cellule unitaire ont été utilisés pour caractériser les réponses neuronales obtenues suite à la stimulation de neurones exprimant des canaux photo-sensibles.

Ces expériences ont été réalisées sur des préparations *en-bloc* de tronc cérébral ou sur tranches transverses contenant des neurones du RTN ou du preBötC. Les cellules sont choisies, lorsque cela est rendu possible par la construction génétique utilisée pour générer la lignée transgénique, grâce à l'expression de protéines rapporteurs fluorescentes (GFP ou R26^{TdTomato}). Les enregistrements sont effectués en patch-clamp configuration cellule-entière sous contrôle visuel en lumière infrarouge par la méthode de contraste d'interférence différentielle (DIC). Les électrodes de patch sont fabriquées à partir de tubes de verre borosilicatés (Havard apparatus ©, 150F-10, Massachusetts, USA) étirés (résistance 4-6 M Ω) et remplis avec une solution de composition (en mM) : 123 K-Gluconate, 21 KCl, 0.5 EGTA, 3 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 10 HEPES, pH7.2 contenant 1mg/ml de biocytine (Molecular Probes ©, Eugene, OR). Les signaux sont recueillis à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices) et enregistrés sur ordinateur à l'aide de l'interface pClamp9. Post acquisition, les préparations sont placées dans une solution fixatrice afin de vérifier par immuno-histochimie l'expression des canaux membranaires photo-sensibles et de s'assurer de la nature neuro-anatomique des neurones enregistrés.

3. Expériences de sections

Dans le cadre des études *in vitro*, nous avons cherché à connaître l'implication des projections inhibitrices en provenance des structures pontiques sur la réponse hypercapnique. L'utilisation des lignées conditionnelles *Atoh1*^{AFRTCre} ; *Phox2b*^{lox/lox} et *Phox2b::CreBAC1* ; *Atoh1*^{lox/lox} permet de sous-spécifier les délétions des gènes *Phox2b* / *Atoh1* aux neurones constitutifs du RTN ainsi qu'à une petite population de neurones localisée autour du noyau moteur du trijumeau. Afin de nous assurer que la modification de patron d'expression de ces gènes au sein de cette structure ne modifie pas les réponses hypercapniques observées sur les préparations *en-bloc*, la préparation est sortie de la chambre d'enregistrement et une section rostrale au noyau moteur du facial est réalisée. Par la suite, la préparation est replacée dans la chambre, laissée au repos pendant 20 minutes avant d'être de nouveau enregistrée.

III. Investigations anatomiques

Au cours de nos études, l'utilisation de marqueurs multiples nous a permis de mieux comprendre les effets anatomiques induits par la délétion de certains facteurs de transcription sur la mise en place du RTN.

3.1- Préparation des tissus

Pour les expériences effectuées aux stades E14.5-E18.5, les animaux sont disséqués comme précédemment décrit. Les tronc prélevés sont incubés sur la nuit dans une solution de fixation composée de paraformaldéhyde dilué à 4% (vol/vol) dans du tampon Phosphate-Sodium (PBS) à 4°C. Pour les expériences aux stades E10.5-E12.5, les animaux sont, après prélèvement dans les cornes utérines, brièvement disséqués : une section rostrale effectuée au niveau mésencéphalique ainsi qu'une incision de la paroi abdominale assure une bonne pénétration du fixateur. La fixation (2 à 4 heures sous agitation légère à 4°C) est réalisée dans une boîte de dissection dans laquelle les embryons sont maintenus à plat à l'aide de minuties. A l'issue de cette étape, les tissus sont rincés dans du PBS (3 x 5 minutes) avant d'être incubés sur la nuit dans une solution de cryopréservation (PBS- 30% sucrose). Les tissus sont ensuite positionnés dans des cuves en plastique contenant du milieu de montage (OCT-TissusTeck ©) et rapidement congelés à -40°C dans une solution d'isopentane refroidie sur carboglace. Les cubes obtenus peuvent être conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Pour la découpe au cryostat, les tissus congelés sont démoulés et positionnés sur le porte-objet de sorte à obtenir des coupes coronales ou para-sagittales en fonction des besoins du marquage. L'ensemble du tronc cérébral est découpé à partir de l'extrémité rostrale ou latérale en sections de 12 (pour les protocoles d'hybridation *in situ*) ou 20 µm (protocole d'immunohistomarquage). Les sections sont récupérées alternativement sur 2 jeux de lames de façon à ce que deux coupes successives soient espacées de 40 µm. La réalisation de plusieurs jeux de lames permet d'effectuer un plus grand nombre de marquages sur un même animal et ainsi réduire le nombre d'animaux sacrifiés. Après découpe, les lames sont rapidement séchées à l'air en vue de la réalisation du protocole d'immunomarquage, ou conservées à -80°C.

3.2- Protocole d'immunomarquage

Le protocole utilisé découle d'un protocole classique d'immunomarquage indirect par fluorescence et se déroule de la manière suivante :

- Décongélation des sections à température ambiante (30 min).
- Rinçage en PBS sous agitation légère en chambre humide (3 x 10 min).
- Incubation dans le milieu bloquant (PBS-FBS) composé de PBS supplémenté par 5% (vol/vol) de sérum fœtal de veau (Fœtal Bovine Serum, FBS) pendant 15 minutes.

- Incubation dans le milieu de perméabilisation composé de solution de PBS-FBS supplémenté de 0.2% Triton X-100 pendant 40 minutes sous agitation douce, à température ambiante.
- Incubation dans les anticorps primaires préparés dans le milieu bloquant pendant 12 à 48 heures à 4°C.
- Rinçage en PBS (3x 10 minutes) sous agitation à température ambiante.
- Incubation dans l'anticorps secondaire 45-120 min sous agitation légère, à température ambiante et à l'obscurité.
- Rinçage en PBS (3 x 10 min) sous agitation
- Séchage à l'air ambiant (5 min) et montage entre lame et lamelle avec une solution stabilisatrice anti fading (Vectashield H1000, Vector Lab©) pouvant être supplémentée avec un marqueur nucléaire (DAPI, Vectashield H1200, Vector Lab©).
Si l'observation des lames ne peut être effectuée rapidement, les lames sont conservées à 4°C pendant quelques jours.

Les lames sont ensuite scannées à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8 possédant des raies lasers à 488, 561 et 633 nm. Le microscope possède un séparateur de faisceaux acoustico optique (Acousto-Optic Beam Splitter, AOBS) permettant de minimiser les interférences non spécifiques dues au débordement des fluorochromes dans des canaux autres que ceux qui leur sont dédiés. Le logiciel contrôlant le microscope (Leica Confocal Software) permet d'effectuer une acquisition séquentielle des canaux permettant de diminuer ces signaux non spécifiques. Pour chaque champ, des z-stacks sont acquis en prenant une photo tous les 2 µm. Les images capturées (1024 x 1024 pixel, 12bit) sont par la suite transférées dans ImageJ afin de réaliser des projections maximales. Les niveaux de couleurs et de luminosité sont optimisés dans Adobe Photoshop CS6. Lorsque la réalisation de mosaïques est rendue nécessaire, les photos sont manuellement reconstruites.

Pour certaines expériences, les images ont été acquises à l'aide d'un apotome (Zeiss ©) équipé de filtres 405/488/561/633 nm. Après ajustement du temps d'exposition, les photos ont été acquises avec les mêmes paramètres que ceux utilisés avec le microscope confocal.

Antigène reconnu	Espèce	Fabriquant, référence	Dilution finale
Ds-Red polyclonal	Lapin	632496	1:200
GFP	Poulet	Aves, GFP-1020	1:1000

MATÉRIELS & MÉTHODES

GFP	Lapin	Invitrogen, A11122	1:2000
Islet 1,2	Souris	DHSB, 39, 4D5s	1:40
Lbx1	Cochon d'Inde	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:800
NKR1	Lapin	Sigma, S8305	1:500
Phox2b	Lapin	Coll. JF. Brunet	1:400
Phox2b	Cochon d'Inde	Coll. JF. Brunet	1:400
Sst (somatostatine 14)	Lapin	Peninsula Lab, T-4103	1:500
β -Galactosidase	Poulet	Abcam, Ab9361	1:1000

Tableau 2 : Liste des principaux anticorps primaires utilisés. Tous les anticorps sont conservés à -20°C et aliquotés pour un usage 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 711-176-155
Souris	Chèvre	Alexa 488	Abcam, ab6785-1
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
Lapin	Ane	Alexa 405	Jackson IR 711-475-152
Chèvre	Ane	Alexa 405	Jackson IR 705-475-147
Biotine	Streptavidine	Alexa 649	Jackson IR 016-490-084

Tableau 3 : Liste des principaux anticorps secondaires utilisés. Tous les anticorps sont conservés à -20°C et aliquotés pour un usage unique à une concentration finale de 1:400

3.3- Protocole de marquage par hybridation *in situ*

Les protocoles d'immunomarquage permettent la détection et la localisation de protéines d'intérêt au sein d'un tissu cellulaire. Bien que cette méthode soit extrêmement informative et résolutive notamment d'un point de vue spatial, elle ne permet de mettre en évidence que le produit final de l'expression d'un gène. A cause du temps de dégradation lent (ou *turn-over*) la protéine peut, dans certains cas, être détectée bien après l'expression du gène. Un exemple illustrant ce propos est l'utilisation des lignées rapporteurs. Ainsi, dans le cas de la lignée *Dbx1^{nlsLacZ}* précédemment décrite (voir partie II.1.2.2), bien que l'expression de ce facteur de transcription soit restreinte au stade E9-E10, la protéine LacZ peut, grâce à sa stabilité, être observée jusqu'aux stades post-nataux. Bien que ces propriétés inhérentes à chaque protéine représentent un avantage dans le cadre d'études histologiques, elles se révèlent défavorables dans le cadre des études de l'expression dynamique des facteurs de transcription. De plus, il est important de noter que malgré la forte augmentation du nombre de séquences protéiques pouvant être détectées il existe encore actuellement de nombreuses protéines pour lesquelles aucun anticorps primaire n'a pu être obtenu. C'est dans ce contexte que furent développées les méthodes d'Hybridation *in situ* (ou H.I.S). Ces techniques de biologie moléculaire permettent de localiser et d'identifier des séquences d'acides nucléiques messagers (ARNm) dans des cellules ou des tissus. Pour cela, on associe par hybridation une sonde d'acides nucléiques (ADN ou ARN monocaténaire) de séquence connue complémentaire à celle d'acides nucléiques que l'on cherche à localiser.

Au cours de ce protocole, des coupes fines de 12 µm sont obtenues par section au cryostat. Après séchage, ces coupes subissent trois étapes de lavage au PBS (10 min), suivies de trois étapes d'incubation dans une solution RIPA (10 min, composition 150 mM de NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0). Puis les lames sont post fixées (PFA 4% pendant 15 minutes à température ambiante) et rincées au PBS (3 x 10 min). Les peroxydases endogènes sont inactivées par incubation pendant 30 minutes dans une solution de 0.5% H₂O₂. Puis les lames sont transférées dans une solution de triethanolamine (100 mM) supplémentée avec 0.25% d'anhydride acétique avant d'être rincées dans du PBS-T (0.05% Tween) et incubées brièvement dans un mélange de pré-hybridation (50% forlamide, 5x SSC, 5x Denhardt's, 500µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 250 µg/ml d'ARN de levure).

MATÉRIELS & MÉTHODES

L'hybridation est réalisée à 70°C sur la nuit. Pour la détection des sondes couplées à la digoxygénine (kit de synthèse ROCHE), les lames sont rincées et incubées dans une solution contenant un anticorps primaire (α DIG ; Boehringer Mannheim, Indianapolis). Les signaux sont révélés à l'aide d'une réaction colorimétrique utilisant la NBT (4-nitrobleu tetrazolium chloride, Boehringer Mannheim ; 4.5ml/ml). La réaction est réalisée dans le noir à 4 °C pendant la nuit et stoppée avec du PBS-T. Dans le cadre d'un couplage avec un immunomarquage, les lames sont bloquées pendant 30 minutes avec du HI FCS (heat-Inactivated fetal calf serum) puis on réalise le protocole tel qu'il a été décrit dans la partie 3.2.

IV. Investigation fonctionnelle *in vivo*

Notre recherche des conséquences fonctionnelles d'altération développementale de l'oscillateur RTN requiert l'analyse du phénotype respiratoire chez l'animal intact. Seule cette approche intégrée *in vivo* nous permet de confirmer les résultats obtenus lors des approches *in vitro* quant à la perte fonctionnelle du chémoréflexe central engendrée par la modification des programmes développementaux induite chez les mutants. Cette étape est réalisée à l'aide de la méthode de pléthysmographie globale telle qu'elle a été décrite par Bartlett et Tenney en 1970. Dans cette méthode expérimentale, l'animal entier est placé dans une chambre hermétiquement close reliée à une chambre de référence de même volume grâce à une sonde différentielle sensible à la pression. La méthode repose sur le principe de réchauffement et d'enrichissement en vapeur d'eau de l'air expiré au cours des cycles respiratoires. Ainsi pour un volume constant, l'air expiré étant plus chaud que l'air contenu dans la chambre, on observe de faibles variations de pression pouvant être détectées grâce à la sonde. Ces variations de pression sont converties en signaux électriques et numérisées dans l'ordinateur (fréquence d'échantillonnage 1KHz) avant d'être enregistrées grâce au logiciel ELPHY (Gérard Sadoc, UNIC, CNRS de Gif-sur-Yvette). Au cours de nos travaux nous avons cherché à voir comment évoluaient les paramètres respiratoires au cours du temps. Pour cela des enregistrements ont été effectués à différents âges allant du nouveau-né (P0) à l'âge adulte (P60).

4.1- Enregistrement des nouveau-nés

Pour les animaux nouveau-nés (E18.5 et P2.5), les chambres d'enregistrement et de référence sont constituées d'une seringue de 50 ml, mieux adaptée à la petite taille des animaux. Dans cette configuration, le protocole se compose de quatre séquences de 200

secondes : une première séquence d'enregistrement contrôle, une séquence pendant laquelle l'air contenu dans la seringue est remplacé par un mélange enrichi en CO₂ (8% CO₂, 21% O₂ et 71% Azote) puis deux séquences de récupération au cours desquelles la seringue est rincée. A la fin de chaque expérience une calibration est réalisée, la température de la chambre, la pression atmosphérique et le poids de l'animal sont mesurés. Une portion de queue est également prélevée afin de pouvoir génotyper l'animal, et un marquage effectué. Au cours des expériences à P0, les nouveau-nés sont enregistrés 30 minutes après leur naissance. D'une part ce délai permet à l'animal d'acquiescer une respiration stable et spontanée et, d'autre part, assure que la mère ait le temps de marquer son petit et continuera ainsi à allaiter suite à l'expérience. Dans le cas où l'animal maintient une activité irrégulière caractérisée par de rares activités respiratoires de fortes amplitudes associées à des mouvements de détresse respiratoires, il est enregistré avant le reste de la portée afin de disposer d'enregistrements avant sa mort éventuelle. Si son activité s'améliore par la suite, il fera l'objet d'un second enregistrement. S'il venait à mourir, l'animal est disséqué et fixé afin de réaliser une analyse anatomique du tronc cérébral.

4.2- Enregistrement des animaux adultes

Pour les animaux juvéniles et adultes, les chambres d'enregistrement et de référence ont un volume de 900 ml. Le protocole est le suivant : les animaux libres de leurs mouvements sont placés dans la chambre et laissés au calme pendant 10 minutes. La chambre est continuellement perfusée avec de l'air ambiant. Puis les entrées et sorties de la chambre sont fermées et la respiration de l'animal est mesurée pendant 100 secondes. Suite à cela, la chambre est perfusée avec le mélange enrichi en CO₂ pendant 3 minutes et un nouvel enregistrement effectué. A la fin de l'enregistrement, l'animal est sorti de la boîte et une période de 25 minutes est respectée avant la réalisation d'un enregistrement de récupération. Puis l'animal est pesé et la température mesurée à l'aide d'une sonde rectale. Les données sont analysées, post acquisition, grâce au logiciel ELPHY. Les paramètres respiratoires accessibles sont : la durée des cycles respiratoires (T_{TOT}), le volume inspiratoire (V_T), le temps d'inspiration (T_i), d'expiration (T_e) et le volume minute (V_m). Dans ce travail ne seront considérées que les périodes pendant lesquelles l'animal est calme et immobile afin d'éviter tout artefacts.

RÉSULTATS

Publication 1: Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditional *Phox2b* mutants

Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J, Goridis C.

Journal of Neuroscience. 2011 Sep 7;31(36):12880-8

Résumé :

L'enjeu de cette première publication était de comprendre l'implication de la chémosensibilité au CO₂ pour l'acquisition d'un comportement respiratoire fonctionnel à la naissance. Depuis près d'un siècle il était postulé que le chémoréflexe au CO₂ permettant d'accroître l'activité ventilatoire en réponse à une augmentation de la PaCO₂ sanguine était indispensable pour la rythmicité respiratoire. Dans cette étude, nous revisitons ce postulat de la physiologie respiratoire. Pour cela, grâce à la création d'un nouveau mutant conditionnel, nous avons ciblé l'expression de l'allèle toxique *Phox2b*^{27Ala} à l'origine du CCHS au sein du RTN. Cette lignée permet, suite à l'action d'une protéine Cre-recombinase, le remplacement de l'exon 3 sauvage de l'ADNc du gène *Phox2b* par la séquence mutante portant la mutation 27Ala. Une expression ubiquitaire (*PGK::Cre*), ou ciblée au SNC (*Brn4::Cre*), provoque la mort des animaux confirmant de fait que le phénotype léthal observé chez les mutants *Phox2b*^{27Ala} découle d'un défaut neuronal central. La restriction de la mutation au sein du lignage neuronal issu de r3/r5 (*Egr2*^{Cre}; *Phox2b*^{27AlaCKI}) provoque la délétion du RTN et l'abolition du chémoréflexe central au CO₂ *in vitro* et *in vivo*. Cependant, et de manière surprenante, ces mutants survivent jusqu'à l'âge adulte. Nous démontrons que la perte de l'entraînement respiratoire par le CO₂ observable jusqu'au stade P9 n'empêche pas le maintien d'une homéostasie gazeuse sanguine. Nous mettons en évidence, en compensation de la perte des réponses ventilatoires hypercapniques, une exacerbation des afférences périphériques

RÉSULTATS

hypoxiques. Ces afférences sont nécessaires et suffisantes pour stimuler le comportement respiratoire au cours des stades post-nataux précoces comme en attestent les expériences de chémo-dénervations physiologiques qui abolissent l'activité ventilatoire. Par la suite nous démontrons une récupération partielle du chémoréflexe central CO_2 chez l'adulte. En conclusion, au cours des stades post-nataux précoces, les afférences excitatrices engendrées suite à une élévation de la PaCO_2 ne sont pas cruciales pour un maintien d'une activité ventilatoire permettant la survie des animaux.

Breathing without CO₂ Chemosensitivity in Conditional *Phox2b* Mutants

Nelina Ramanantsoa,^{1,2} Marie-Rose Hirsch,^{3,4,5} Muriel Thoby-Brisson,⁶ Véronique Dubreuil,^{3,4,5} Julien Bouvier,⁶ Pierre-Louis Ruffault,⁶ Boris Matrot,^{1,2} Gilles Fortin,⁶ Jean-François Brunet,^{3,4,5} Jorge Gallego,^{1,2} and Christo Goridis^{3,4,5}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U676, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France, ²Université Denis Diderot, 75013 Paris, France, ³Ecole normale supérieure, Institut de Biologie, 75005 Paris, France, ⁴CNRS UMR8197, 75005 Paris, France, ⁵INSERM U1024, 75005 Paris, France, and ⁶Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Breathing is a spontaneous, rhythmic motor behavior critical for maintaining O₂, CO₂, and pH homeostasis. In mammals, it is generated by a neuronal network in the lower brainstem, the respiratory rhythm generator (Feldman et al., 2003). A century-old tenet in respiratory physiology posits that the respiratory chemoreflex, the stimulation of breathing by an increase in partial pressure of CO₂ in the blood, is indispensable for rhythmic breathing. Here we have revisited this postulate with the help of mouse genetics. We have engineered a conditional mouse mutant in which the toxic *PHOX2B*^{27Ala} mutation that causes congenital central hypoventilation syndrome in man is targeted to the retrotrapezoid nucleus, a site essential for central chemosensitivity. The mutants lack a retrotrapezoid nucleus and their breathing is not stimulated by elevated CO₂ at least up to postnatal day 9 and they barely respond as juveniles, but nevertheless survive, breathe normally beyond the first days after birth, and maintain blood PCO₂ within the normal range. Input from peripheral chemoreceptors that sense PO₂ in the blood appears to compensate for the missing CO₂ response since silencing them by high O₂ abolishes rhythmic breathing. CO₂ chemosensitivity partially recovered in adulthood. Hence, during the early life of rodents, the excitatory input normally afforded by elevated CO₂ is dispensable for life-sustaining breathing and maintaining CO₂ homeostasis in the blood.

Introduction

Ever since Haldane and Priestley wrote a century ago that “the regulation of the rate of alveolar ventilation depends under normal conditions exclusively on the CO₂ pressure in the respiratory center” (Haldane and Priestley, 1905), the stimulation of breathing by CO₂ has been considered as an indispensable drive to breathe. Cells that sense CO₂ (PCO₂) and O₂ (PO₂) partial pressure in the blood and interstitial fluid provide excitatory input to the respiratory rhythm generator (RRG) (Nattie, 1999). Elevated PCO₂, through the attendant decrease in pH, is thought to be sensed principally by chemosensors in the brain while the carotid bodies (CBs) in the periphery are the main sensors of PO₂ and provide a substantial fraction of the CO₂ response in some species (Forster et al., 2000). In man, dysfunction of respiratory control

is seen in a variety of genetic diseases. It is most common in preterm infants, and immaturity of the CO₂-sensing mechanisms has been regarded as a major cause of central apnea in neonates (Gaultier and Gallego, 2005). In anesthetized and mechanically ventilated rats, apnea results if PCO₂ falls below a critical threshold (Boden et al., 1998), suggesting that CO₂ chemical drive is indeed essential for breathing. Evidence for the Haldane and Priestley postulate in conscious animals and under physiological conditions has been hard to obtain and is nonexistent in rodents. In conscious dogs, goats, and lambs, artificially lowering PCO₂ caused life-threatening apneas (Mitchell et al., 1966; Phillipson et al., 1981; Praud et al., 1997; Nakayama et al., 2003), with the caveat that in two of the studies, PCO₂ is lowered by mechanical hyperventilation, which can inhibit respiration by itself through stimulation of lung stretch receptors (Hayashi et al., 1996; Kubin et al., 2006; Subramanian et al., 2007).

Recent evidence from studying a human genetic disease and from mouse genetics seems also to support Haldane’s statement (Haldane and Priestley, 1905). In man, congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is characterized by a lack of ventilatory response to inhaled CO₂ and to elevated PCO₂. Most patients require respiratory assistance from birth; as they age, they still need respiratory assistance during sleep to avoid lethal sleep apneas (Weese-Mayer et al., 2010). Mice harboring the most frequent CCHS-causing mutation, an expansion of a 20-residue poly-alanine stretch in *PHOX2B* (termed *PHOX2B*^{27Ala} mutation) (Amiel et al., 2009) do not respond to elevated CO₂ and die at birth from respiratory failure, as do several other mouse mutants with loss of CO₂ chemosensitivity (Goridis et al.,

Received April 6, 2011; revised July 2, 2011; accepted July 7, 2011.

Author contributions: G.F., J.-F.B., J.G., and C.G. designed research; N.R., M.-R.H., M.-T.B., V.D., G.F., and J.G. analyzed data; C.G. wrote the paper.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (to J.F.B. and G.F.), Association Française du Syndrome d’Ondine (to J.G.), and Fondation pour la Recherche Médicale (to J.F.B.), and by institutional support from CNRS, INSERM, and Ecole normale supérieure. We thank Alexandre Pattyn for help in the initial stages of this work, and Carmen Le Moal and Séverine Larney for expert animal husbandry. The founders of the mutant line were produced by the Mouse Clinical Institute, Illkirch, France.

M. Thoby-Brisson’s present address: Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d’Aquitaine, Université Bordeaux, CNRS UMR 5287, 33076 Bordeaux, France.

V. Dubreuil’s present address: UMR7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, CNRS, Université Paris Diderot, 75013 Paris, France.

Correspondence should be addressed to Christo Goridis or Jean-François Brunet, Institut de Biologie de l’Ecole normale supérieure, 46 Rue d’Ulm, 75005 Paris, France. E-mail: goridis@biologie.ens.fr or jfb@brunet@biologie.ens.fr; or to Jorge Gallego, Inserm U676, Hôpital Robert Debré, 48 bd Séverin, 75019 Paris, France. E-mail: jorge.gallego@inserm.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1721-11.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/3112880-09\$15.00/0

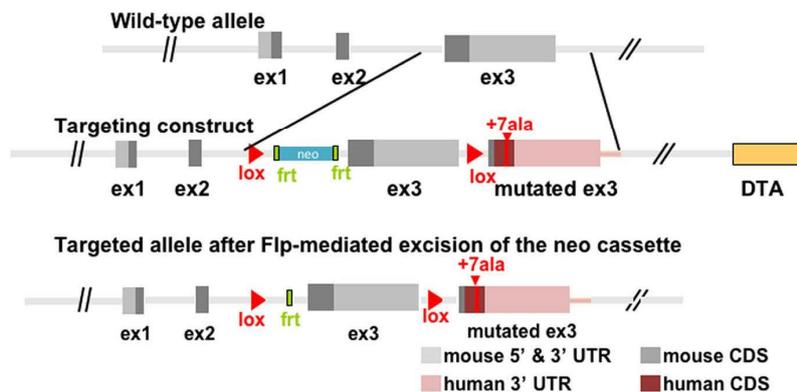


Figure 1. Schematic of the wild-type *Phox2b* gene, the targeting construct, and the targeted *Phox2b* locus. From 5' to 3', the targeting vector contained a 5' homology arm of 3.7 kb, a loxP site inserted into the second intron followed by a neomycin resistance cassette flanked by frt sites and mouse exon 3, a loxP site inserted 3' of the mouse polyA signal followed by the mutated human *PHOX2B* exon 3, and a 3' homology arm of 6.9 kb followed by a diphtheria toxin A chain (DTA) cassette. CDS, coding sequence; Ex1, exon1; UTR, untranslated region.

2010). However, in none of these cases can one exclude additional defects that contribute to the fatal apnea, and there still is no definitive answer to the question of whether CO₂ chemosensitivity is crucial for life-sustaining respiration. In this study, we have reexamined the Haldane and Priestley postulate using a conditional mouse mutation that targets the CCHS-causing *PHOX2B*^{27Ala} allele to the retrotrapezoid nucleus (RTN), a major brain site for integrating chemosensory information (Guyenet et al., 2009).

Materials and Methods

Mice. To generate a mutant line expressing a CCHS-causing expansion of the 20-residue poly-alanine stretch in *Phox2b*, we flanked the normal mouse exon 3 with loxP sites and inserted 3' of the polyA signal the human *PHOX2B* exon 3 bearing the seven-residue expansion. Upon cre recombinase-mediated recombination, mouse *Phox2b* exon 3 is replaced by the mutated human exon 3. Because human and mouse *Phox2b* proteins are identical in sequence, the encoded protein is identical to mouse *Phox2b* except for the extension of the poly-alanine stretch. The targeting vector (Fig. 1), constructed by conventional cloning methods, was electroporated into 129S2/SvPas ES cells. Correctly targeted ES cells were injected into C57BL/6 blastocysts. ES cell manipulation and blastocyst injection were done at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). Chimeric founders giving germ line transmission were mated with *Flpe* deleter mice (Lallemand et al., 1998) to remove the neomycin cassette. After crossing with C57BL/6 × DBA/2 F1 mice for several generations, the resulting *Phox2b*^{27Ala/LoxP/+} (*P2b*^{27Ala/LoxP/+}) mice were intercrossed to produce *P2b*^{27Ala/LoxP/27Ala/LoxP} homozygotes. Offspring with the recombined locus were produced by crossing *Egr2*^{cre/+} (Voiculescu et al., 2000), *Pgk::cre* (Rodriguez et al., 2000), or *Brn4::cre* (Zechner et al., 2003) males with *P2b*^{27Ala/LoxP/27Ala/LoxP} females. The day on which a vaginal plug was detected was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). Genotyping was done on tail DNA. To detect the presence of the *P2b*^{27Ala/LoxP} allele, the primers GCCACAGTGCCTCTTAAC and CTCTTAAACGGGCGTCTCA were used, yielding bands of 330 kb for the wild-type, 474 kb for the mutated, and 380 kb for the recombined allele. To detect *cre*, the primers TGATGGACATGTTTCAGGGATC and GAAATCAGTGCCTCGAAGCTAGA were used, yielding a band of 347 kb. For the estimation of mutant survival, we counted the number of mutants that survived beyond the first week and compared this number to the Mendelian proportion expected from the crossings from which they were derived. All animal studies were done in accordance with the guidelines issued by the French Ministry of Agriculture and have been approved by Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris.

Histology. The methods for immunohistochemistry and *in situ* hybridization combined with immunohistochemistry on transverse 16 μm cryosections have been described (Hirsch et al., 1998; Dubreuil et al., 2009). Riboprobes for *Atoh1* were synthesized using a DIG RNA labeling kit (Roche) as specified by the manufacturer. The primary antibodies used were as follows: rabbit anti-*Phox2b* (Pattyn et al., 1997), guinea pig anti-*Phox2b* (Dubreuil et al., 2009), mouse anti-*Islet1,2* (40.2D6 and 39.4D5; Developmental Studies Hybridoma Bank), rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH; Millipore Bioscience Research Reagents), rabbit anti-peripherin (Abcam). The primary antibodies were revealed for fluorescent staining by Alexa 488-, Cy3-, or Cy5-labeled secondary antibodies of the appropriate specificity (Jackson ImmunoResearch) or, for bright field observation, by biotin-labeled secondary antibodies and Vectastain ABC kit (Vector) revealed with 3,3'-diaminobenzamide. Pictures were captured with either a Hamamatsu ORCA-ER or a Leica DFC420C camera mounted on a Leica DM5500B microscope for

observation through fluorescence or bright field optics, respectively. RTN neurons, defined either as *Atoh1*⁺;*Phox2b*⁺ (Dubreuil et al., 2009) or as *Phox2b*⁺, TH-negative, *Islet1,2*⁻, or peripherin-negative cells (Takakura et al., 2008), were counted throughout an area delimited by the ventral borders of the facial nucleus (nVII) visualized by *Islet1,2* or peripherin labeling and the medullary surface, starting rostrally with the first section containing nVII neurons and stopping 64 μm (at E14.5) or 96 μm [at postnatal day 1 (P1)] caudal to the caudal end of nVII. Cells responding to these criteria were counted on every fourth section on both sides. The Abercrombie correction was applied to cell (*Atoh1*⁺;*Phox2b*⁺) or nuclear (*Phox2b*⁺, *Islet1,2*⁻, TH⁻) profile counts to estimate total cell numbers essentially as described previously (Lazarenko et al., 2009). Statistical analysis was done using a two-tailed *t* test and XLSTAT software with α set at 0.05.

Electrophysiology. Brainstem–spinal cord preparations and transverse medullary slices were obtained from E16.5 embryos and incubated in oxygenated artificial CSF at pH 7.4 and 7.2, as described previously (Dubreuil et al., 2009). The methods used for calcium imaging and for recording phrenic nerve and local population activity have been described previously (Dubreuil et al., 2009; Bouvier et al., 2010). Calcium imaging was done on brainstem–spinal cord preparations and transverse medullary slices loaded with Calcium Green-1 AM. Phrenic nerve activity was recorded using suction electrodes positioned at the C4 roots and local population activity was recorded on the surface of transverse slices through the pre-Bötzing complex (pre-BötC) region. Values are given as mean ± SEM. Statistical significance was tested using a difference Student's *t* test to compare frequencies obtained from different mutants and a paired difference Student's *t* test to compare the same preparation in two different conditions.

Plethysmography. Breathing variables of P2–P9 pups were measured noninvasively in unanesthetized, unrestrained pups using whole-body flow barometric plethysmography as described previously (Matrot et al., 2005; Ramanantsoa et al., 2006). Breathing variables of P22 and adult mice were measured using a larger whole-body flow barometric plethysmograph (Dauger et al., 2003). Gas flow through the plethysmograph was adjusted to deliver highly similar hypercapnic challenges in adult and newborn mice. After 10 min in room air, the pups were exposed to hypercapnic air (8%CO₂/21%O₂/71%N₂) for 5 min, followed by 10 min in room air. Breathing variables were continuously monitored after a 7 min familiarization period in the plethysmograph chambers. Activity periods, which typically included exploratory movements, grooming, and sniffing, were detected based on large disturbances in the respiratory signal caused by the combined effects of positional changes and changes in breathing pattern (Matrot et al., 2005). Breathing variables were analyzed over activity-free periods, which represented >80% of recording

time in both groups. Apneas, defined as ventilatory pauses longer than twice the duration of the preceding breath, were determined using an automatic classification method (Matrot et al., 2005). To measure the ventilatory responses to hypoxia and hyperoxia, after 10 min in room air, P4 pups were first exposed to 100% O₂ for 3 min, then after 10 min in room air they were exposed to hypoxic air (10%O₂/90%N₂) for 3 min, and finally to room air again for 10 min. Breathing variables [breath duration (TTOT), tidal volume (VT), and ventilation (VE) calculated as VI/TTOT] were measured in apnea-free periods, except when stated otherwise. Statistical analysis was done using standard ANOVAs with genotype group as a between-subject factor. The total significance was set at $p < 0.05$ with individual tests corrected for multiple comparisons using Bonferroni adjustment.

Blood gas analysis. PCO₂ and pH were analyzed in P9 mutant and control mice. The pups were decapitated and mixed blood samples collected from the neck in heparinized capillary tubes as previously described for infant rats (Dingley et al., 2008). PCO₂ and pH were measured immediately using a clinical blood gas analyzer (ABL 80; Radiometer).

Results

Loss of retrotrapezoid nucleus neurons is compatible with survival

The RTN, a loose collection of neurons that reside in the rostral medulla close to the medullary surface, ventral and immediately caudal of nVII, has emerged as a site crucial for CO₂ sensing in the brain (Guyenet et al., 2009). These neurons are glutamatergic and express the Phox2b and Atoh1 transcription factors but, in contrast to other Phox2b⁺ neurons nearby, they express neither catecholaminergic (TH) nor motoneuronal (Islet1,2 or peripherin) markers (Stornetta et al., 2006; Takakura et al., 2008; Dubreuil et al., 2009). Initially identified in cats (Smith et al., 1989) and then in adult rats (Nattie and Li, 1994; Mulkey et al., 2004), chemosensitive neurons with similar properties have since been identified at the same location in neonatal rats (Onimaru et al., 2008) and in mouse embryos (Dubreuil et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009).

Massive depletion of RTN neurons was the only discernable defect found in *Phox2b*^{27Ala/+} mice that express the most frequent CCHS-causing mutation, an expansion of a poly-alanine stretch by seven residues, and the likely cause of their lack of CO₂ chemosensitivity (Dubreuil et al., 2008). The heterozygous offspring of chimeric founders all died at birth from respiratory failure. To derive a mutant mouse line, we generated mice expressing the *PHOX2B* exon 3 harboring the human mutation conditionally upon cre recombinase action (*P2b*^{27Ala/ck} mice) (Fig. 1). In the absence of cre recombinase, the homozygous mutants had a normal life span and did not display any overt defects. However, like the constitutive *Phox2b*^{27Ala/+} mutants, *Pgk::cre;P2b27Ala/ck/+* mice, in which recombination occurs in the germ line, did not survive beyond the first day after birth (no survivors instead of the expected number of 49 mu-

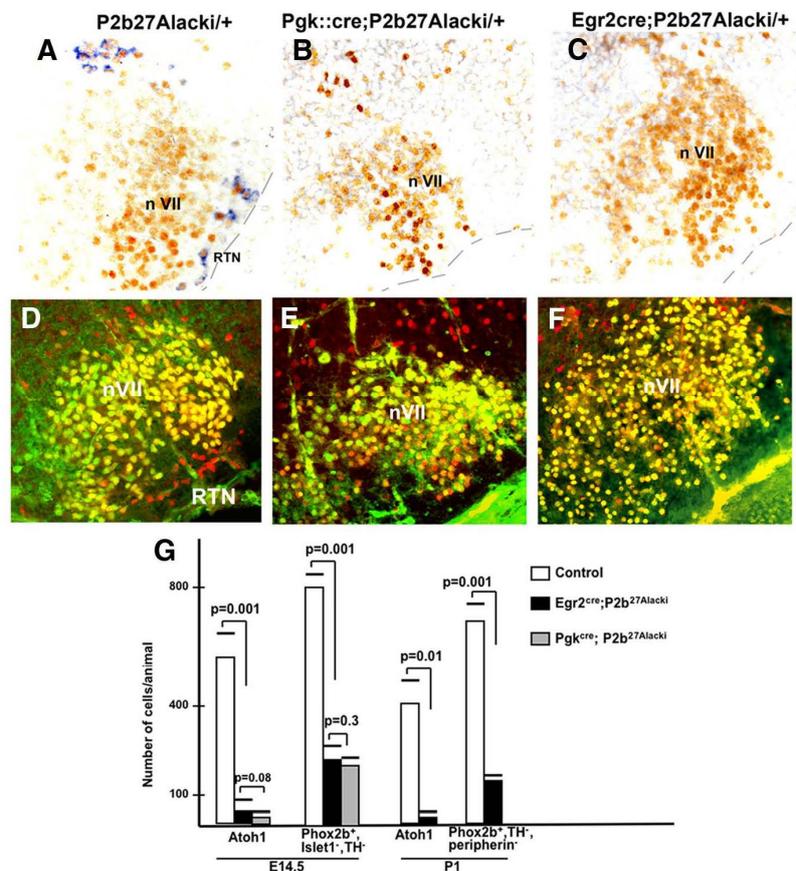


Figure 2. Loss of RTN neurons in conditional *Phox2b*^{27Ala/ck} mutants. **A–C**, Combined *in situ* hybridization with an *Atoh1* probe and immunohistochemistry with anti-Phox2b antibodies on transverse sections showing the loss of differentiated RTN neurons in control *P2b*^{27Ala/ck}, *Pgk::cre;P2b*^{27Ala/ck}, or *Egr2*^{cre};*P2b*^{27Ala/ck} E14.5 embryos as indicated. A population of equally *Atoh1*;Phox2b double-positive cells dorsal of nVII (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009) has also disappeared in the mutants. **D–F**, Triple labeling for Phox2b (red), Islet1,2 and TH (green) showing depletion of Phox2b⁺, Islet1,2⁺, and TH⁺ cells in the RTN region in *Pgk::cre;P2b*^{27Ala/ck} or *Egr2*^{cre};*P2b*^{27Ala/ck} E14.5 embryos, as indicated. **G**, Quantification of RTN neuron loss in E14.5 and P1 *P2b*^{27Ala/ck} mutants expressing either *Egr2*^{cre} or *Pgk::cre* as cre drivers. RTN neurons were identified either by *Atoh1* expression or by positivity for Phox2b and absence of Islet1,2 or peripherin and TH. The horizontal lines above the bars indicate +SD of the means.

tants). *Pgk::cre;P2b*^{27Ala/ck/+} embryos also shared with the constitutive mutants a massive depletion of RTN neurons (Fig. 2*B,E,G*). Thus, the un-recombined *P2b*^{27Ala/ck} allele is functionally equivalent to the wild-type allele and the recombined allele is functionally equivalent to the constitutive *Phox2b*^{27Ala} allele. Similarly, *Brn4::cre;P2b*^{27Ala/ck/+} mice, in which recombination is limited to the CNS (Zechner et al., 2003), did not survive (zero instead of the expected number of 15.5 mutants). The *Egr2*^{cre} (*Krox20*^{cre}) line drives cre expression specifically in rhombomeres 3 (r3) and 5 of the embryonic neural tube (Voiculescu et al., 2000). Previous studies have shown that virtually all RTN neurons are descended from the *Egr2* lineage and that RTN neurons are depleted in animals conditionally null for *Phox2b* in this lineage (Dubreuil et al., 2009). This cre driver thus provided the opportunity to target the *P2b*^{27Ala} mutation to RTN neurons with greater specificity. To our surprise, the great majority of *Egr2*^{cre/+}; *P2b*^{27Ala/ck/+} mice survived to adulthood. Of a total of 131 births, 48 mutants survived beyond the first week instead of the expected 52 from a Mendelian proportion, and all reached adulthood except for 12 that were killed at P9 for blood gas analysis.

As in the constitutive *Phox2b*^{27Ala/+} mutants or when *Pgk::cre* was used as cre driver, there was a massive loss of RTN neurons in

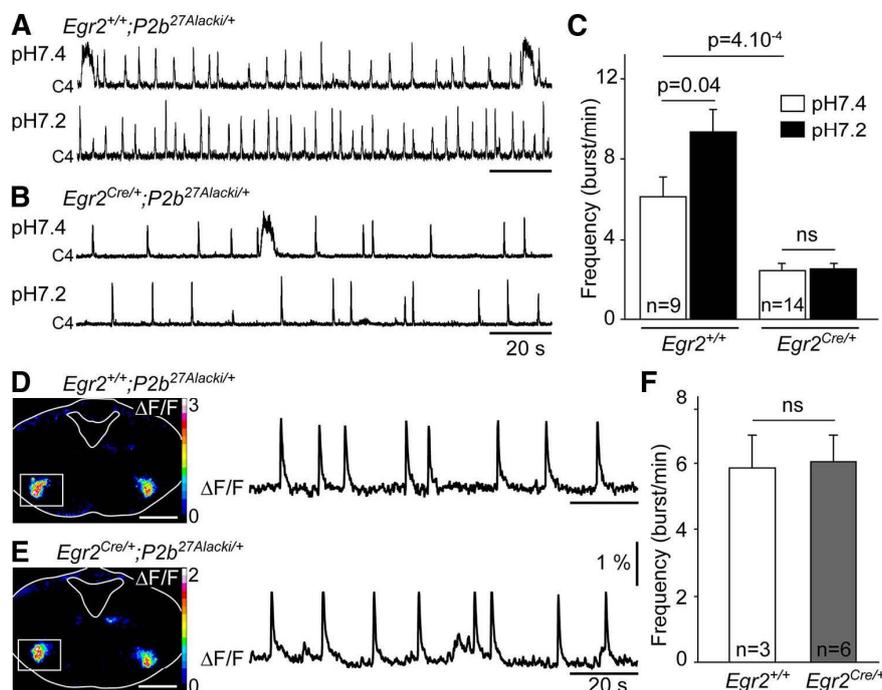


Figure 3. Slowed down respiratory-like rhythm unresponsive to a low pH challenge but a functional pre-BötC in hindbrain–spinal cord preparations from E16.5 *Egr2^{cre};Phox2b^{27Alacki}* embryos. **A**, Integrated phrenic nerve discharges (C4) at pH 7.4 and pH 7.2 for an *Egr2^{+/+};P2b^{27Alacki}/+* control embryo. **B**, Same as **A** for an *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* mutant embryo. **C**, Quantification of the burst frequencies for *Egr2^{+/+};P2b^{27Alacki}/+* (*Egr2^{+/+}*) and *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* (*Egr2^{Cre/+}*) embryos as indicated. **D**, Left, Calcium imaging showing bilateral peak fluorescence changes during one burst of activity of the pre-BötC in a *Egr2^{+/+};P2b^{27Alacki}/+* transverse medullary slice loaded with Calcium Green-1 AM. Scale bar, 25 μ m. Right, Trace showing rhythmic relative fluorescence changes ($\Delta F/F$). **E**, Same as **D** for an *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* mutant embryo. **F**, Quantification of the frequency of rhythmic bursts in the control (*Egr2^{+/+}*) and mutant (*Egr2^{Cre/+}*) pre-BötC as indicated. ns, Not significant.

Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+ embryos. Expression of *Atoh1*, which marks 85% of RTN neurons (Dubreuil et al., 2009), had virtually disappeared from the RTN region at E14.5 (Fig. 2C,G). To make sure that RTN neurons are absent and do not merely lack expression of *Atoh1*, we used positivity for Phox2b and absence of Islet1,2 or peripherin and TH as alternative criterion. The great majority of the neurons that met this criterion were lost from the RTN region in *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* embryos (Fig. 2F,G). Residual Phox2b⁺, Islet1,2⁺, and TH⁺ cells were depleted to a very similar extent whether *cre* was driven by *Pgk* or *Egr2*. The same proportion of RTN neurons was lost in *Egr2^{Cre};P2b^{27Alacki}* neonates (Fig. 2G), excluding the possibility that their differentiation was merely delayed.

Slowed-down respiratory-like rhythm and lack of response to acidification in brainstem–spinal cord preparations from *Egr2^{Cre};P2b^{27Alacki}* embryos

A population of spontaneously rhythmic neurons in the parafacial region termed e-pF constitutes the embryonic forerunner of the RTN (Thoby-Brisson et al., 2009). These neurons share location, marker gene expression, and origin from *Egr2⁺* precursors with RTN neurons and are activated by a pH challenge (Dubreuil et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009). The e-pF appears to entrain the pre-BötC when the latter becomes active at E15 (Thoby-Brisson et al., 2009). Mutants in which RTN development or function is compromised have a slowed-down fetal respiratory rhythm, which, when tested, has been found unresponsive to acidification used as proxy for elevated CO₂ (Pagliardini et al., 2008; Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009; Caubit et

al., 2010). By contrast, the pre-BötC, a core component of the RRG (Gray et al., 2001; Feldman et al., 2003; Bouvier et al., 2010), functioned normally when tested in isolation. Hence, a slower than normal respiratory-like rhythm and unresponsiveness to CO₂/pH seems a hallmark of a nonfunctional RTN. To investigate this in *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* embryos, we recorded phrenic nerve root activity as a measure of the motor outflow of the RRG in brainstem–spinal cord preparations. In control embryos, the rhythmic bursts recorded from C4 roots were accelerated by lowering the pH. In the mutant littermates, the frequency of rhythmic phrenic discharges was reduced and did not respond to acidification (Fig. 3A–C). As in other mutants with impaired RTN function (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009; Caubit et al., 2010), pre-BötC oscillator activity in transverse medullary slices was not affected (Fig. 3D–F). Hence, *Egr2^{Cre};P2b^{27Alacki}* embryos share with the other mutants lacking a functional RTN a slower than normal respiratory-like rhythm and unresponsiveness to CO₂/pH in brainstem–spinal cord preparations.

Egr2^{Cre};P2b^{27Alacki} mice lack CO₂ chemosensitivity at least up to postnatal day 9

We assessed breathing parameters in infant mice with whole-body plethysmography of unrestrained pups (Matrot et al., 2005; Ramanantsoa et al., 2006). In normoxia, mean ventilation (VE) of P2 *Egr2^{Cre/+};P2b^{27Alacki}/+* pups (henceforth called mutants) was reduced by 42 \pm 13% ($n = 10$) compared with control *Egr2^{+/+};P2b^{27Alacki}/+* littermates (henceforth called controls) because of longer breath duration (TTOT) (Fig. 4A,C). A striking defect was the complete absence of the normal response to hypercapnia, an

increase in ambient CO₂. Control littermates markedly increased VE when breathing a hypercapnic (8%CO₂) mixture, mainly because of an increase in breath volume (tidal volume VT). In the mutants instead, ventilation had a slight tendency to decline because of an increase in TTOT (Fig. 4C). Despite their breathing defects and the absence of a normal CO₂ response, perinatal lethality of mutant pups was very low (see above). At P9, mutant VE had increased to 77 ± 8% (n = 9) of that of the controls. However, the mutants still completely lacked the normal response to hypercapnia (Fig. 4B, D).

Although the P9 mutant pups did not respond to CO₂, PCO₂ in the blood was within the normal range (40.0 ± 4.5 and 39.8 ± 3.5 mmHg for mutants and controls, respectively) (Table 1). A potential caveat is that handling the pups before decapitation may have caused hyperventilation and an attendant drop in PCO₂ resulting in apparently normal values. However, the PCO₂ of the control littermates handled in exactly the same fashion was normal, implying that only the mutants but not the control littermates hyperventilate in response to handling, an unlikely possibility. The slight, but statistically significant increase in pH suggests that the mutants may use a mild metabolic alkalosis as a means to keep blood PCO₂ and pH within the normal range.

Partial recovery of the CO₂ response in adult mutants

At 3 weeks of age, the mutants displayed normal baseline ventilation in room air. When breathing a hypercapnic mixture, they responded with an increase in ventilation, but it amounted to a mere 20% of that of their control littermates (Fig. 4E). At 4 months, adult mutants had recovered a substantial, albeit incomplete (40% of that of the controls) CO₂ response (Fig. 4F). The possibility exists that the residual 15–20% Phox2b⁺;TH⁻; Islet1,2⁻;peripherin⁻ cells in the RTN region are able to compensate for the missing neurons in later life. However, not all such neurons are chemosensitive in the first place (Onimaru et al., 2008). Double-positivity for Phox2b and Atoh1 seems a more reliable criterion for chemoresponsive RTN neurons. It was virtually absent in the RTN area from *Egr2*^{cre/+}; *Phox2b*^{27Alacki/+} mutants. A more plausible scenario thus is that other chemosensitive sites inactive or without strong connections with the RRG in infant mice overcome, in part, the complete lack of a CO₂ response.

Input from PO₂-sensing peripheral chemoreceptors appears to compensate for the lost CO₂ response

One reason why the mutant pups can maintain adequate ventilation in the absence of CO₂ chemosensitivity could be that input

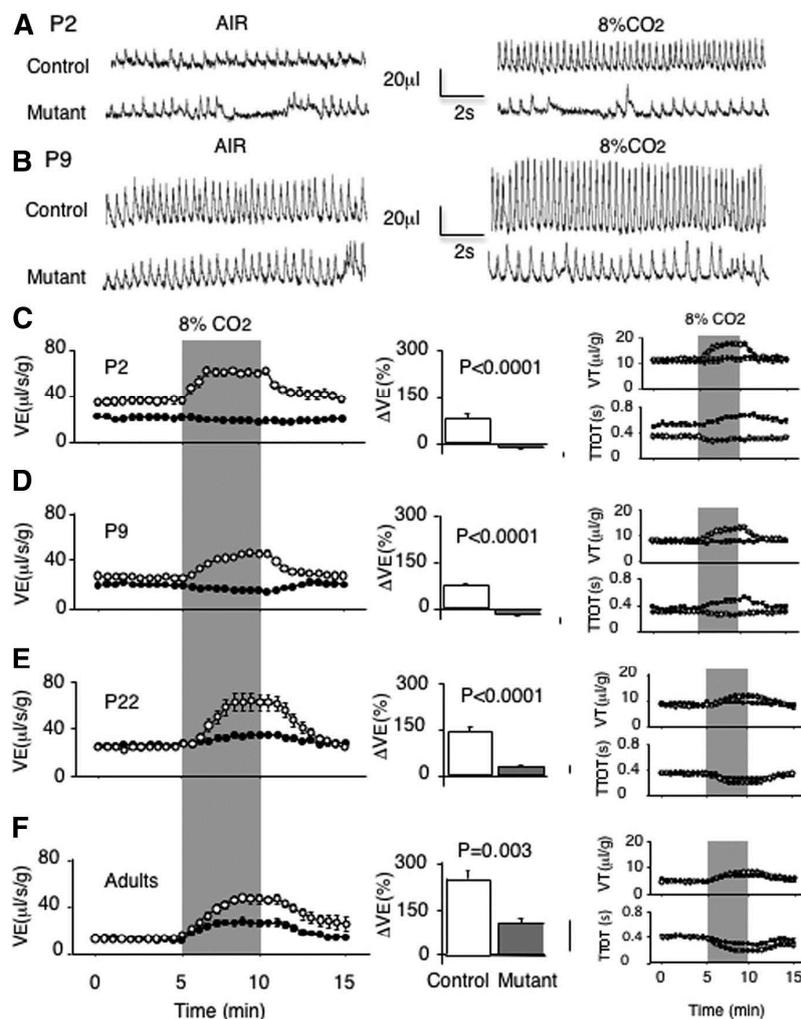


Figure 4. Lack of CO₂ chemosensitivity in young postnatal *Egr2*^{Cre}; *P2b*^{27Alacki} mice and partial recovery in adulthood. **A**, Representative examples of plethysmographic recordings of P2 mutant and control mice in air and in response to 8% CO₂. **B**, Same as **A** for P9 mice. **C–F**, Left, Mean values of ventilation (VE) in air or in response to 8% CO₂ (shaded area) in mutant mice (black circles) and their control littermates (white circles) on P2 (n = 10 and n = 13 for mutants and controls, respectively), P9 (n = 9 and n = 13, respectively), P22 (n = 12 and n = 8, respectively), and adulthood (4 months old, n = 9 for both conditions). Each circle represents the mean ± SEM over a 30 s period. Middle, Ventilatory responses to hypercapnia expressed as the percentage VE change relative to baseline average VE, using the formula 100 × (peak VE – baseline VE) / baseline VE. The peak VE response to hypercapnia was determined over the entire hypercapnic exposure. Right, Mean values of tidal volumes (VT) and breath durations (TTOT) in air or in response to 8% CO₂ (shaded area) in mutant mice (black circles) and their control littermates (white circles) from which the VE values in the left panels have been calculated. At P2, baseline ventilation was lower in mutants than in controls because of longer breath duration, but had almost normalized at P9. Mutants did not increase VE in response to hypercapnia until a small response appeared on P22 and consolidated in adulthood, still blunted compared with controls.

from the CBs that sense blood PO₂ compensates for the lack of a CO₂ response. The CBs should be intact in the conditional mutants, in which the mutation is targeted to the hindbrain. We verified this point by subjecting P4 pups to a decrease in ambient O₂. Hypoxia caused the biphasic response characteristic for newborn mammals (Saetta and Mortola, 1987) in both mutant and control pups (Fig. 5). Not only did the mutants respond to hypoxia, showing that PO₂-sensing chemoreceptors were functional, but they did so more vigorously. In the mutants, the increase in VE was more pronounced and lasted longer than in the controls because of a larger and more sustained increase in respiratory

Table 1. Determination of PCO₂ and pH in the blood of P9 *Egr2*^{+/+}; *Phox2b*^{27Alacki/+} (control) and *Egr2*^{cre/+}; *Phox2b*^{27Alacki/+} (mutant) pups

	Control ± SD (n = 15)	Mutant ± SD (n = 14)	p value
PCO ₂ (mmHg)	39.8 ± 3.5	40.0 ± 4.5	0.895
pH	7.47 ± 0.04	7.52 ± 0.05	0.008
Body weight (g)	5.01 ± 0.66	4.04 ± 0.06	0.0001
Body temperature (°C)	34.2 ± 0.6	33.6 ± 0.6	0.01

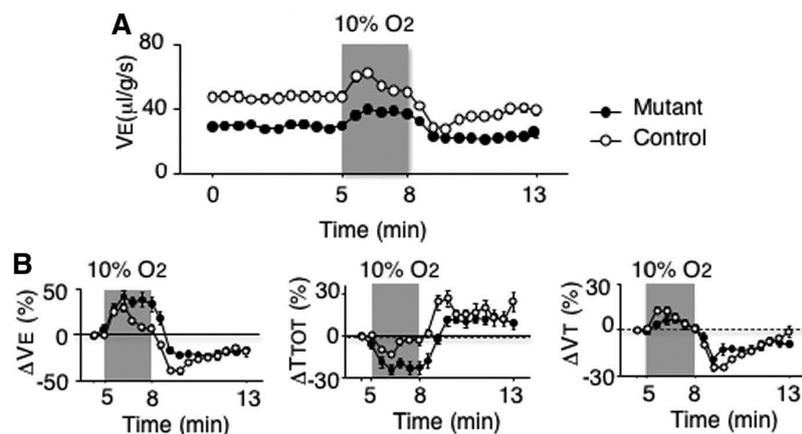


Figure 5. Ventilatory responses of *Egr2*^{cre}; *P2b*^{27Alacki} mice to hypoxia. *A*, Mean values of ventilation (VE) in air and in response to hypoxia (10% O₂, shaded area) of P4 mutant mice (black circles; *n* = 10) and their control littermates (white circles; *n* = 13). Each circle represents the mean ± SEM over a 30 s period. *B*, VE, TTOT, and VT values expressed as percentage change relative to baseline ventilation as indicated. The mutants show a more vigorous and sustained ventilatory response, mainly due to a decrease in breath duration.

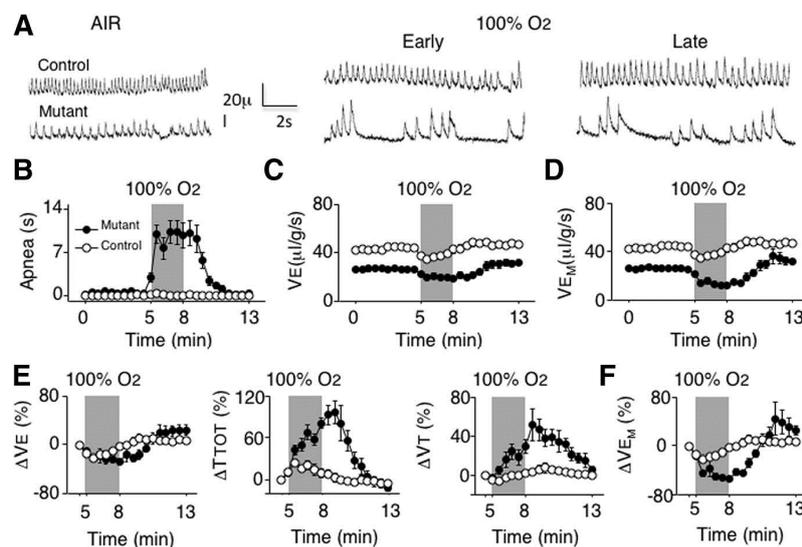


Figure 6. Enhanced dependence of *Egr2*^{cre}; *P2b*^{27Alacki} mice on O₂ chemosensitivity. *A*, Representative examples of plethysmographic recordings of P4 mutant and control mice in air and in response to 100% O₂. Early and late phases correspond to the first and the second half of the 3 min 100% O₂ exposure, respectively. *B*, Total apnea time in mutants (black circles) and controls (white circles) in air or in response to 100% O₂ (shaded area). Each circle represents the mean ± SEM over a 30 s period. *C*, Mean values of ventilation in air or in response to 100% O₂ measured in apnea-free periods (noted as VE_M). *D*, Mean values of ventilation in air or in response to 100% O₂ averaged over the entire 30 s period, including apneas (VE_M). *E*, ΔVE, ΔTTOT, and ΔVT values expressed as percentage of baseline values in apnea-free periods. *F*, ΔVE_M values when including apnea periods. In 100% O₂, the mutants, but not the controls, showed a massive increase in the time spent in apnea. The ventilatory depression caused by 100% O₂ was more sustained in the mutants than in the controls in apnea-free periods. This difference was greatly enhanced when the calculation of mean ventilation included apnea periods.

frequency (Fig. 5*B*). The latter result suggested already that the mutants rely more on input from the CBs than the controls do. This interpretation was amply confirmed when we tested their response to pure O₂, known to inhibit peripheral chemoreceptor input (a manipulation called physiological chemodenerivation) (Dejours, 1962; Hertzberg et al., 1990; Blain et al., 2010). Strikingly, this maneuver triggered periodic breathing—a series of deep breaths interrupted by prolonged apneas (Darnall, 2010)—in all mutants but not in controls. As a result, apnea duration increased massively in the mutants breathing pure O₂, but remained negligible in the control littermates (Fig. 6*A,B*). Mean ventilation of the controls showed the normal biphasic response to hyperoxia, an initial decrease followed by a return to baseline levels. The mutants also responded with decreased VE caused by a large increase in TTOT, which lasted throughout and even beyond the hyperoxic episode (Fig. 6*C,E*). Inspection of the individual traces revealed that the increased VT of the mutants in hyperoxia reflected the deep breaths caused by periodic breathing (Fig. 6*A,E*). The decrease in VE measured in apnea-free periods greatly underestimated the breathing deficit of the mutants because of the vast increase in time spent in apnea. Taking into account the periods spent in apnea revealed a 46 ± 11% drop of VE for the mutants compared with 21 ± 12% for control littermates (*n* = 10 and *n* = 13, respectively; *p* = 0.00001) and equivalent decreases in ΔVE during the first minute in 100% O₂. Together, these results indicate that the newborn mutants rely on peripheral chemosensation as tonic respiratory drive much more than the control littermates do.

One may argue that a 42% decrease in ventilation in normoxia (Fig. 4*A,C*) will not drop PO₂ in the blood sufficiently to activate the O₂ sensors in the CBs. However, CB sensitivity to O₂ is highly plastic and substantially enhanced by intermittent (Peng et al., 2004) and chronic (Powell, 2007) hypoxia. In addition, the CBs may exert a tonic excitatory drive to the RRG even in normoxia. This is suggested both by our results showing an immediate drop in VE after switching to 100% O₂, which was stronger in the mutants (Fig. 6*E,F*), and by evidence from the literature obtained in rat pups after intermittent hypoxia or lung injury (Peng et al., 2004; Jacono et al., 2006), after CB resection in man (Dahan et al., 2007), or by extracorporeal CB perfusion in dogs (Blain et al., 2009).

Discussion

All existing models of respiratory control postulate that to oscillate properly, the

RRG requires excitatory inputs, among which that afforded by CO₂ has been considered as crucial (Phillipson et al., 1981; Takakura et al., 2008; Guyenet et al., 2009; Spyer and Gourine, 2009). In previous work, we have produced mice with different mutations in *Phox2b*—either the toxic *Phox2b*^{27Aia} mutation that causes CCHS in man or conditional null mutations—both of which compromise RTN neuron differentiation (Dubreuil et al., 2008, 2009). In line with the eminent role proposed for the RTN in central chemosensitivity, CO₂/pH sensitivity was abrogated when tested in fetal hindbrain preparations or at birth *in vivo*. A common trait of these mutants was neonatal lethality because of respiratory failure. Our previous results could thus be interpreted as evidence in favor of the vital importance of the CO₂ response. However, the possibility remained that as yet undetected defects in other sites involved in respiratory control contributed to the lethal breathing deficits.

We have now produced an additional genetic background, in which RTN development is disrupted. This was made possible by the engineering of a mouse mutant that expresses the CCHS-causing *Phox2b*^{27Aia} mutation conditionally upon cre recombinase action. Partnering the *Egr2*^{cre} and *P2b*^{27Alacki} alleles allowed us to target the RTN more specifically than has been possible with the constitutive *Phox2b*^{27Aia}, but also with a conditional *Phox2b*-null mutation because of the selective toxicity of the *Phox2b*^{27Aia} mutation for certain types of neurons (Amiel et al., 2009). As anticipated, differentiated RTN neurons were depleted in the resulting *Egr2*^{cre};*Phox2b*^{27Alacki} mice to the same extent as in constitutive mutants. In contrast to the latter, however, the *Egr2*^{cre};*Phox2b*^{27Alacki} mutants survived to adulthood and maintained physiological levels of CO₂ in the blood, despite the fact that they lacked the respiratory drive exerted by acidification of fetal brainstem preparations or by inhaled CO₂. Hence, neither the RTN nor a functional respiratory chemoreflex are necessary to maintain CO₂ homeostasis in the blood. Like other mutants with defective RTN development, *Egr2*^{cre};*P2b*^{27Alacki} mutants had a slowed-down respiratory rhythm as neonates. This could reflect the loss of CO₂ chemical drive, but also the lack of entrainment of the pre-BötC by the embryonic RTN (Thoby-Brisson et al., 2009), as indicated by the slower than normal respiratory-like rhythm in late gestation. The breathing deficit normalized with age, probably because of maturation or plasticity of the respiratory system (Mitchell and Johnson, 2003). Similarly, CO₂ chemosensitivity had partly recovered in adult mutants. This recovery was a protracted process, since as juveniles, the mutants, whose baseline ventilation was completely normal, increased their ventilation only slightly in hypercapnia. These results raise several major questions that will be discussed in turn.

First, which mechanisms enable the mutants to breathe and to maintain normal blood PCO₂ in the absence of the excitatory input by elevated CO₂? One possibility is that CB stimulation by hypoxia compensates for the lack of CO₂ chemosensitivity. When the excitatory input from the CBs was inhibited by pure oxygen breathing, *Egr2*^{cre};*Phox2b*^{27Alacki} pups, but not control littermates, switched to periodic breathing with long apneic pauses. In mechanically ventilated rodents, apnea results when the PCO₂ falls below the apneic threshold, i.e., the PCO₂ below which excitatory input from the CO₂ sensors to the respiratory network ceases (Boden et al., 1998; Takakura et al., 2008). The underlying cause of the apneas may be the same in these animals mechanically hyperventilated with a hyperoxic gas mixture and in our mutants breathing pure oxygen: the cessation of all chemosensory drive to the respiratory network by silencing the input from both PCO₂ and PO₂ sensors. In any case, our results strongly suggest that

tonic stimulation by the peripheral chemoreceptors compensates for the missing CO₂ response to maintain rhythmic breathing. Less clear, however, is how the animals are able to preserve normal levels of CO₂ in the blood. The near normal ventilation achieved by the input from the PO₂-responsive CBs may suffice, but nonrespiratory mechanisms, e.g., modulation of HCO₃⁻ retention or acid excretion by the kidneys (Cogan, 1984; Widener et al., 1986), may also be involved.

Second, why are the CBs unable to compensate for the lack of central CO₂ sensitivity, despite the fact that they contribute a still debated, but probably substantial fraction to the overall CO₂ response (Forster et al., 2000; Blain et al., 2009)? One possibility is that in the newborn period, the CBs still respond poorly to CO₂/pH while the response to hypoxia is already well developed, although in the rat, there is evidence for a well developed peripheral CO₂ chemosensitivity at birth (Saetta and Mortola, 1987). A perhaps more plausible explanation emerges by considering that RTN neurons are strongly activated by CB stimulation and provide powerful excitatory input to the RRG (Takakura et al., 2006). They may thus be obligatory intermediates for relaying the CO₂ response of the CBs, hence the loss of it when RTN neurons are missing. This hypothesis entails that the excitatory input afforded by hypoxia, but not that caused by hypercapnia, is also transmitted by pathways that bypass the RTN. In fact, such connections between the CBs and the respiratory neurons in the lower medulla have been identified (Finley and Katz, 1992) that may become strengthened in the mutants. They may convey information about PO₂, but not PCO₂ in the blood, although the existence of separate afferences for the two modalities is controversial (Bisgard et al., 1986; Niu et al., 1990).

Third, what are the mechanisms that lead to the improved CO₂ response in adults? Possibilities include strengthening of the CO₂-responsive input from the CBs or compensation by one or the other of the multiple sites postulated to function as CO₂ sensors in the brain (Nattie and Li, 2009; Nattie, 2011), which may be inactive or without strong enough connections with the RRG in early life. Another possibility is that the RTN is an obligatory intermediate for funneling input from other central chemoreceptors to the RRG early but not later in life, although experimental evidence for this is still lacking. Candidate chemoreceptor sites are serotonergic neurons that have been reported to be virtually pH-insensitive at birth and to become fully operational only beyond the newborn period (Wang and Richerson, 1999; Corcoran et al., 2009) but also glial cells (Gourine et al., 2010; Wenker et al., 2010). The latter respond to low pH already in young postnatal rats and may act mainly via RTN neurons, but additional pathways may come into play in adulthood.

Fourth, the tight correlation between impaired RTN development and CO₂ chemosensitivity shown by previous work (Goridis et al., 2010) is amply confirmed in the mutants analyzed here that completely lack any response to elevated CO₂ at least up to P9, and provide the first evidence that genetic ablation of the RTN abolishes the hypercapnic response beyond the first day after birth.

Finally, it becomes clear that loss of CO₂ chemosensitivity alone cannot be the cause of the fatal central apnea of the other *Phox2b* mutants with impaired RTN development, either the conditional *Phox2b*-null mutants or the *Phox2b*^{27Aia} mutants that express the CCHS-causing human mutation constitutively (Dubreuil et al., 2008, 2009). Why, then, do the other *Phox2b* mutants die at birth of respiratory failure? At present, all we can say is that the defect must be in neurons that are located in the CNS, express *Phox2b*, and depend on it for proper development.

In mice expressing the *Phox2b*^{27Aia} mutation constitutively, the only anatomical defect found was loss of RTN neurons, but in principle, any *Phox2b*-expressing cell could be affected by the toxic mutation, with the restriction that the lethal breathing defect of the *Brn4cre::P2b*^{27Aia} mice shows that the critical deficiency is in the CNS. More telling is a comparison between the *Egr2*^{cre}; *P2b*^{27Aia} mice and *Egr2*^{cre}; *Phox2b*^{lox/lox} mice that do not (Dubreuil et al., 2009). In both cases, the mutation, either the *Phox2b*^{27Aia} or a *Phox2b*-null mutation, has been targeted to r3/5-derived cells. In the *Egr2*^{cre}; *Phox2b*^{lox/lox} mutants, the additional defect must be in neurons with a history of *Egr2*^{cre} expression that are not affected by the *Phox2b*^{27Aia} mutation, but depend on *Phox2b* for proper differentiation.

A key tenet in respiratory physiology states that arterial PCO₂ is the essential drive to breathe, and sentences abound in the recent literature such as “CO₂ provides the major tonic drive to breathe” (Spyer and Gourine, 2009) or “we have known for more than a century that the levels of CO₂ in the systemic circulation and in the brain are the major determinants of breathing in humans and other mammals” (Blain et al., 2010). Here we have revisited this dogma using a new mouse mutant. Our results do not support the notion that CO₂ chemosensitivity is indispensable for breathing. We show that a complete lack of the respiratory chemoreflex, classically revealed as ventilatory stimulation by an increase in inspired CO₂, is compatible with breathing adequate for survival and maintaining normal CO₂ levels in the blood. There are precedents for life-sustaining breathing in the absence of CO₂ chemical drive in some situations. In rodents, some (Serra et al., 2001; Stunden et al., 2001) but not all (Wickström et al., 2002) investigators reported a blunted hypercapnic response in 1-week-old rats, but a similar transient drop in CO₂ responsiveness has not been found in mice (Renolleau et al., 2001; this paper). In humans, pronounced hypocapnia induces apnea in sleep, but not in wakefulness during which a still enigmatic “wakefulness drive” is supposed to replace that afforded by CO₂ (Dempsey, 2005; Duffin, 2010).

The breakdown of rhythmic breathing in mutant mice breathing pure O₂, i.e., when both the O₂ and CO₂ response are missing, reveals that, in accordance with virtually all models of respiratory control, proper functioning of the RRG requires some form of chemosensory input. Our results suggest that the response to hypoxia of the CBs provides the required stimulation. Beyond the first days after birth, this drive appears sufficient for near-normal baseline respiration. The fact that most CCHS patients harboring the *PHOX2B*^{27Aia} mutation require life-long ventilatory assistance during sleep in order not to die from central apnea suggests that additional defects caused by the constitutive *PHOX2B*^{27Aia} mutation are involved. Revealing such defects in our mouse models may lead to a better understanding of the etiopathology of CCHS and perhaps to new modes of therapeutic intervention.

References

- Amiel J, Dubreuil V, Ramanantsoa N, Fortin G, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2009) PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. *Respir Physiol Neurobiol* 168:125–132.
- Bisgard GE, Busch MA, Daristotle L, Berssenbrugge AD, Forster HV (1986) Carotid body hypercapnia does not elicit ventilatory acclimatization in goats. *Respir Physiol* 65:113–125.
- Blain GM, Smith CA, Henderson KS, Dempsey JA (2009) Contribution of the carotid body chemoreceptors to eupneic ventilation in the intact, unanesthetized dog. *J Appl Physiol* 106:1564–1573.
- Blain GM, Smith CA, Henderson KS, Dempsey JA (2010) Peripheral

- chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J Physiol* 588:2455–2471.
- Boden AG, Harris MC, Parkes MJ (1998) Apneic threshold for CO₂ in the anesthetized rat: fundamental properties under steady-state conditions. *J Appl Physiol* 85:898–907.
- Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chédotal A, Fortin G (2010) Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci* 13:1066–1074.
- Caubit X, Thoby-Brisson M, Voituren N, Filippi P, Bévengut 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.
- Cogan MG (1984) Chronic hypercapnia stimulates proximal bicarbonate reabsorption in the rat. *J Clin Invest* 74:1942–1947.
- Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 168:49–58.
- Dahan A, Nieuwenhuijs D, Teppema L (2007) Plasticity of central chemoreceptors: effect of bilateral carotid body resection on central CO₂ sensitivity. *PLoS Med* 4:e239.
- Darnall RA (2010) The role of CO₂ and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. *Respir Physiol Neurobiol* 173:201–212.
- Dauger S, Ferkdadjji L, Saumon G, Vardon G, Peuchmaur M, Gaultier C, Gallego J (2003) Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice. *Chest* 123:530–538.
- Dejours P (1962) Chemoreflexes in breathing. *Physiol Rev* 42:335–358.
- Dempsey JA (2005) Crossing the apnoeic threshold: causes and consequences. *Exp Physiol* 90:13–24.
- Dingley J, Hobbs C, Ferguson J, Stone J, Thoresen M (2008) Xenon/hypothermia neuroprotection regimes in spontaneously breathing neonatal rats after hypoxic-ischemic insult: the respiratory and sedative effects. *Anesth Analg* 106:916–923.
- Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2008) 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 (2009) Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in *Phox2b* mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J Neurosci* 29:14836–14846.
- Duffin J (2010) The role of the central chemoreceptors: a modeling perspective. *Respir Physiol Neurobiol* 173:230–243.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239–266.
- Finley JC, Katz DM (1992) The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* 572:108–116.
- Forster HV, Pan LG, Lowry TF, Serra A, Wenninger J, Martino P (2000) Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals. *Respir Physiol* 119:199–208.
- Gaultier C, Gallego J (2005) Development of respiratory control: evolving concepts and perspectives. *Respir Physiol Neurobiol* 149:3–15.
- 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* 21:814–822.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329:571–575.
- 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.
- Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Fortuna MG, Abbott SB, DePuy SD (2009) Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. *Respir Physiol Neurobiol* 168:59–68.
- Haldane JS, Priestley JG (1905) The regulation of the lung-ventilation. *J Physiol* 32:225–266.
- Hayashi F, Coles SK, McCrimmon DR (1996) Respiratory neurons mediating the Breuer-Hering reflex prolongation of expiration in rat. *J Neurosci* 16:6526–6536.
- Hertzberg T, Hellström S, Lagercrantz H, Pequignot JM (1990) Develop-

- ment of the arterial chemoreflex and turnover of carotid body catecholamines in the newborn rat. *J Physiol* 425:211–225.
- Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C (1998) Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125:599–608.
- Jacono FJ, Peng YJ, Nethery D, Faress JA, Lee Z, Kern JA, Prabhakar NR (2006) Acute lung injury augments hypoxic ventilatory response in the absence of systemic hypoxemia. *J Appl Physiol* 101:1795–1802.
- Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, McCrimmon DR (2006) Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol* 101:618–627.
- Lallemant Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P (1998) Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res* 7:105–112.
- Lazarenko RM, Milner TA, Depuy SD, Stornetta RL, West GH, Kievits JA, Bayliss DA, Guyenet PG (2009) Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 517:69–86.
- Matrot B, Durand E, Dauter S, Vardon G, Gaultier C, Gallego J (2005) Automatic classification of activity and apnea using whole body plethysmography in newborn mice. *J Appl Physiol* 98:365–370.
- Mitchell GS, Johnson SM (2003) Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 94:358–374.
- Mitchell RA, Bainton CR, Edelist G (1966) Posthyperventilation apnea in awake dogs during metabolic acidosis and hypoxia. *J Appl Physiol* 21:1363–1367.
- 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.
- Nakayama H, Smith CA, Rodman JR, Skatrud JB, Dempsey JA (2003) Carotid body denervation eliminates apnea in response to transient hypoxemia. *J Appl Physiol* 94:155–164.
- Nattie E (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59:299–331.
- Nattie E (2011) Julius H. Comroe, Jr., Distinguished Lecture: Central chemoreception: then and now. *J Appl Physiol* 110:1–8.
- Nattie EE, Li A (1994) Retrotrapezoid nucleus lesions decrease phrenic activity and CO₂ sensitivity in rats. *Respir Physiol* 97:63–77.
- Nattie E, Li A (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol* 106:1464–1466.
- Niu WZ, Engwall MJ, Bisgard GE (1990) Two discharge patterns of carotid body chemoreceptors in the goat. *J Appl Physiol* 69:734–739.
- 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.
- Pagliardini S, Ren J, Gray PA, Vandunk C, Gross M, Goulding M, Greer JJ (2008) Central respiratory rhythmogenesis is abnormal in *lbx1*-deficient mice. *J Neurosci* 28:11030–11041.
- Pattyn A, Morin X, Cremer II, Goridis C, Brunet JF (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* 124:4065–4075.
- Peng YJ, Rennison J, Prabhakar NR (2004) Intermittent hypoxia augments carotid body and ventilatory response to hypoxia in neonatal rat pups. *J Appl Physiol* 97:2020–2025.
- Phillipson EA, Duffin J, Cooper JD (1981) Critical dependence of respiratory rhythmicity on metabolic CO₂ load. *J Appl Physiol* 50:45–54.
- Powell FL (2007) The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 157:154–161.
- Praud JP, Diaz V, Kianicka I, Chevalier JY, Canet E, Thisdale Y (1997) Abolition of breathing rhythmicity in lambs by CO₂ unloading in the first hours of life. *Respir Physiol* 110:1–8.
- Ramanantsoa N, Vaubourg V, Dauter S, Matrot B, Vardon G, Chettouh Z, Gaultier C, Goridis C, Gallego J (2006) Ventilatory response to hypoxia in newborn mice heterozygous for the transcription factor Phox2b. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1691–R1696.
- Renolleau S, Dauter S, Autret F, Vardon G, Gaultier C, Gallego J (2001) Maturation of baseline breathing and of hypercapnic and hypoxic ventilatory responses in newborn mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1746–R1753.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLP is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139–140.
- 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.
- Saetta M, Mortola JP (1987) Interaction of hypoxic and hypercapnic stimuli on breathing pattern in the newborn rat. *J Appl Physiol* 62:506–512.
- Serra A, Brozoski D, Hedin N, Franciosi R, Forster HV (2001) Mortality after carotid body denervation in rats. *J Appl Physiol* 91:1298–1306.
- Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, Otto MR, Feldman JL (1989) Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J Comp Neurol* 281:69–96.
- Spyer KM, Gourine AV (2009) Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2603–2610.
- 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 intergration in the adult rat. *J Neurosci* 26:10305–10314.
- Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW (2001) Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol* 127:135–155.
- Subramanian HH, Balnave RJ, Chow CM (2007) Ventilation induced apnea and its effect on dorsal brainstem inspiratory neurones in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 157:252–261.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombani 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.
- Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwill JM, Guyenet PG (2008) Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J Physiol* 586:2975–2991.
- Thoby-Brisson M, Karlén M, Wu N, Charnay P, Champagnat J, Fortin G (2009) Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the pre-Bötzinger complex. *Nat Neurosci* 12:1208–1235.
- Voiculescu O, Charnay P, Schneider-Maunoury S (2000) Expression pattern of a *Krox-20*/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* 26:123–126.
- Wang W, Richerson GB (1999) Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience* 90:1001–1011.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA, Trang H (2010) An official ATS clinical policy statement: congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. *Am J Respir Crit Care Med* 181:626–644.
- Wenker IC, Krémeis O, Nishiyama A, Mulkey DK (2010) Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H⁺ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. *J Neurophysiol* 104:3042–3052.
- Wickström R, Hökfelt T, Lagercrantz H (2002) Development of CO₂-response in the early newborn period in rat. *Respir Physiol Neurobiol* 132:145–158.
- Widener G, Sullivan LP, Clancy RL, Gonzalez NC (1986) Renal compensation of hypercapnia in prolonged hypoxia. *Respir Physiol* 65:341–350.
- Zechner D, Fujita Y, Hülsken J, Müller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB 3rd, Birchmeier W, Birchmeier C (2003) beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* 258:406–418.

Publication 2: The retrotrapezoid nucleus is essential for the respiratory response to CO₂

Pierre-Louis Ruffault, Fabien D'Autréaux, John A. Hayes, Marc Nomaksteinsky, Tomoyuki Fujiyama, Mikiyo Hoshino, Gilles Fortin, Jean-François Brunet & Christo Goridis

Article en review au journal eLife

Résumé :

Cette étude questionne sur l'implication du RTN pour l'établissement d'un chémoréflexe central au CO₂, principal processus permettant le maintien des concentrations de CO₂ et H⁺ constant dans le sang artériel chez les mammifères. De nombreuses études, dont les nôtres, ont permis de mettre en évidence une perte -- complète ou partielle-- de ce chémoréflexe suite à la délétion ou la mise sous silence de cette structure chémosensible (*Dubreuil et al., 2008, 2009 ; Takakura et al., 2013 ; Marina et al., 2010*). Cependant, faute de spécificité, des preuves directes de son implication manquaient. Dans cette étude, nous utilisons des stratégies de génétique intersectionnelle afin de cibler les neurones du RTN définis grâce à une combinatoire d'expression des facteurs de transcription *Atoh1* et *Phox2b*. Ces approches nous ont permis de léser, bloquer ou activer les neurones du RTN avec une sélectivité neuronale jamais atteinte. Nous démontrons que la photostimulation de ces neurones permet l'entraînement du rythme respiratoire. Inversement, suite à l'abrogation de l'expression de *Atoh1* ou *Phox2b*, nous mettons en évidence une perte ciblée du RTN et une diminution dramatique de l'entraînement moteur dans des conditions de faible pH à E16.5. Ces déficits s'aggravent jusqu'à engendrer une perte complète du réflexe hypercapnique à la naissance. Des résultats similaires peuvent être observés suite à une abrogation de la neurotransmission glutamatergique au sein des neurones constitutifs de l'oscillateur. L'ensemble de ces mutants survivent et récupèrent un chémoréflexe central partiel à l'âge adulte. En conclusion nous démontrons que les neurones du RTN exprimant, ou ayant exprimé, *Atoh1* et *Phox2b* sont une composante nécessaire du circuit chémoréflexe à la

RÉSULTATS

naissance et forment l'un des contributeurs principal de la réponse hypercapnique chez l'adulte.

The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO₂

Pierre-Louis Ruffault¹, Fabien D'Autréaux², John A. Hayes¹, Marc Nomaksteinsky², Sandra Autran¹, Tomoyuki Fujiyama^{3,4}, Mikio Hoshino³, Martin Hägglund⁵, Ole Kiehn⁵, Gilles Fortin¹, Jean-François Brunet², and Christo Goridis²

¹Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR 3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France,

²Ecole normale supérieure, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), Inserm U1024 and CNRS UMR 8197, 75005 Paris, France,

³Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan,

⁴International Institute for Integrative Sleep Medicine (WPI-IIIS), University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai Tsukuba Ibaraki 305-8575, Japan,

⁵Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm, Sweden

Correspondence should be addressed to G. Fortin Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR 3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France (fortin@inaf.cnrs-gif.fr) or to J-F. Brunet, Institut de Biologie de l'Ecole normale supérieure, 46 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France (jfbrunet@biologie.ens.fr).

F. D'Autréaux's present address: Institut de Biologie Valrose, Université Nice, 06108 Nice cedex 2, France, M. Hägglund's present address: Kavli Institute for Systems Neuroscience/Centre for Neural Computation, NTNU, 7491 Trondheim Norway

Abstract (150 words)

Maintaining constant CO₂ and H⁺ concentrations in the arterial blood is critical for life. The principal mechanism through which this is achieved in mammals is the respiratory chemoreflex whose circuitry is still elusive. A candidate element of this circuitry is the retrotrapezoid nucleus (RTN), a collection of neurons at the ventral medullary surface that are activated by increased CO₂ or low pH and project to the respiratory rhythm generator. Here, we use intersectional genetic strategies to lesion the RTN neurons defined by *Atoh1* and *Phox2b* expression and to block or activate their synaptic output. Photostimulation of these neurons entrains the respiratory rhythm. Conversely, abrogating expression of *Atoh1* or *Phox2b* or glutamatergic transmission in these cells curtails the phrenic nerve response to low pH in embryonic preparations and abolishes the respiratory chemoreflex in behaving animals. Thus, the RTN neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are a necessary component of the chemoreflex circuitry.

Funding

This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-BALN1410-02 to J.-F.B. and G.F. and ANR-32-BSV5-0011-02 to G.F.), Fondation pour la recherche médicale (DEQ20130326472 to J.-F.B. and DEQ20120323709 to G.F.) and Investissement d'Avenir (ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE and ANR11-IDEX-0001-02 PSL Research University to J.-F.B.).

Author contributions: G.F., J.-F.B. and C.G. conceived the work, designed the experiments, analyzed the data, supervised all experiments and wrote the manuscript, P.-L. R. did and analyzed all physiological experiments, F.D., M.N. and C.G. did all histology, T.F and M. Hoshino constructed the *Atoh1Cre^{ERT2}* line, M. Hägglund constructed the *Vglut2::Chr2* line, J.H. wrote the software for image analysis, S.A. performed online genotyping for physiological experiments.

INTRODUCTION

In mammals, breathing is the prime homeostatic process that regulates CO₂ partial pressure (PCO₂) in the blood. The respiratory chemoreflex modulates ventilation in response to deviations in arterial or brain PCO₂, mainly through the detection of changes in pH (Feldman et al., 2003; Guyenet et al., 2010). These changes are sensed by central chemosensors located in the brainstem and by the carotid bodies (CB) in the periphery, but most of the CO₂ chemosensory drive to breathe is thought to arise centrally (Smith et al., 2006; Duffin, 2010). The number, location and cellular nature of the central chemosensors are still controversial (Guyenet et al., 2010; Huckstepp and Dale, 2011; Nattie, 2011; Guyenet et al., 2013). Two sites have been proposed to play a dominant role in the central CO₂ response: serotonergic neurons in the medulla (Ray et al., 2011; Teran et al., 2014) and the retrotrapezoid nucleus (RTN), a loose collection of neurons located ventral and immediately caudal to the facial nucleus (nVII) (Goridis et al., 2010; Guyenet et al., 2013). RTN neurons —defined by their location, the expression of Phox2b and the vesicular glutamate transporter-2 Vglut2 (also known as Slc17a6) and by the absence of markers for the nearby motor or catecholaminergic neurons— are vigorously activated by increases in CO₂ (Mulkey et al., 2004; Onimaru et al., 2012a; Wang et al., 2013). Impairment of RTN development or function correlates with a blunted response to hypercapnia or acidification (Nattie and Li, 2002; Dubreuil et al., 2009; Marina et al., 2010; Ramanantsoa et al., 2011; Takakura et al., 2013; Takakura et al., 2014), and mouse models of congenital central hypoventilation syndrome (CCHS), which phenocopy the blunted or absent chemoreflex of the patients (Weese-Mayer et al., 2010; Rossor et al., 2014), have an atrophic RTN (Dubreuil et al., 2008; Ramanantsoa et al., 2011). However, the part played by the RTN in the respiratory chemoreflex —either as CO₂ sensor or as an essential element of its

circuitry— is still highly debated, and a recent study concluded that it was dispensable for CO₂/pH sensitivity at birth (Huang et al., 2012).

To resolve the issue of the requirement for RTN neurons in the respiratory chemoreflex, we impaired RTN development or function using intersectional genetic strategies (Dymecki et al., 2010). To target RTN neurons with utmost specificity, we exploited the fact that an important subset belongs to the small number of neurons that co-express the *Phox2b* and *Atoh1* transcription factors in the embryo (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009b). We found that invalidation of *Atoh1* in *Phox2b*⁺ cells, of *Phox2b* in *Atoh1*⁺ cells or of glutamatergic transmission in *Phox2b*⁺/*Atoh1*⁺ cells curtailed the response to acidification in embryonic brainstem preparations and eliminated the CO₂ response in newborn pups. Optogenetic activation of these cells entrained ongoing respiratory rhythm. Together our findings imply that the RTN neurons that express or have expressed *Phox2b* and *Atoh1* are essential for the activation of breathing by increased CO₂ or low pH, and that other contributors to the chemoreflex must act via the RTN or in partnership with it.

RESULTS

***Atoh1* is essential for CO₂/pH sensitivity.**

Atoh1 null mutants (hereafter *Atoh1*^{-/-}) do not establish a proper respiratory rhythm and die at birth of respiratory failure (Rose et al., 2009b), but their CO₂ chemosensitivity has not been examined. In embryonic day 14.5 (E14.5) *Atoh1*^{+/-} embryos, calcium imaging shows rhythmically active RTN neurons that increase their bursting frequencies in response to acidification (Thoby-Brisson et al., 2009). These cells were absent in the *Atoh1*^{-/-} mutants and could not be revealed by low pH (Figure 1A,B). At E16.5, the mutants displayed a slowed-down respiratory-like rhythm in the C4 phrenic nerve roots (hereafter C4) and a complete lack of response to acidification (Figure 1C,D). We then monitored breathing parameters by plethysmography in E18.5 pups delivered by Caesarean section. In the mutants, respiratory patterns ranged from hardly any breathing

RÉSULTATS

movements to slow rhythmic breathing that were completely unresponsive to hypercapnia (Figure 1E-I and Table1). Together, the results show that *Atoh1* is essential for the formation of a functional RTN and for CO₂ chemical drive to breathe before and at birth.

The malformation of the RTN in the mutants may underpin the lack of CO₂ responsiveness. In *Atoh1*^{-/-} embryos, most RTN precursors, whether defined by expression of the *Atoh1* locus and *Phox2b* or by co-expression of *Lbx1* and *Phox2b*, fail to migrate to the medullary surface and accumulate instead dorso-laterally of nVII (Figure 2A-F,I), consistent with previous findings (Rose et al., 2009b). By contrast, the cells co-expressing the *Atoh1* locus and *Phox2b* that surround the trigeminal motor nucleus (nV) are present in the mutants at their normal location (Figure 2G,H,J).

Designing a genetic strategy to target RTN neurons

The lack of CO₂ responsiveness of *Atoh1*^{-/-} embryos could be caused by malfunction of the RTN or some other *Atoh1*-dependent structure (Rose et al., 2009a). Similarly, the *Phox2b* mutant backgrounds analyzed so far, in which the RTN was deleted and CO₂/pH chemosensitivity abrogated, suffered to various extents from a lack of specificity (Dubreuil et al., 2008; Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011). We therefore sought to design genetic strategies to make the *Atoh1* or *Phox2b* mutations more selective.

In the E15.5 brainstem, co-expression of *Atoh1* and *Phox2b* is restricted to neurons located around nVII (hereafter periVII neurons) and around (nV) (hereafter periV neurons) (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009b) (Figure 3A,B). They are the only cells in the brain with this transcriptional signature, since *Atoh1* and *Phox2b* are absent from more rostral regions (Rose et al., 2009a; Hirsch et al., 2013). To monitor these cells specifically, we constructed the *Atoh1*^{FRTCre} line (Supplement figures 1), which expresses Cre recombinase from the *Atoh1* locus conditionally to the action of FLP recombinase, and partnered it with the *P2b::FLPo* allele that expresses *FLP* from the *Phox2b* promoter (Hirsch et al., 2013). In mice harboring the *Atoh1*^{FRTCre} and *P2b::FLPo* alleles, Cre

recombinase will thus be active selectively in cells with a history of both *Atoh1* and *Phox2b* expression (Figure 3A). Indeed, in triple transgenic *Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo;Tau^{GFPnLacZ}* embryos, brainstem expression of the *Tau^{GFPnLacZ}* reporter was specific for periV and periVII cells (Figure 3C), verifying that these cells are the only ones with a history of *Phox2b* and *Atoh1* expression (hereafter *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells).

In the embryo, the *Atoh1*-expressing cells represent an important subgroup of RTN neurons as defined by *Phox2b* and *Vglut2* expression and the absence of catecholaminergic markers (Dubreuil et al., 2009). However, the functional characteristics of these cells have not been examined. In E14.5 *Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo;R26^{tdTomato}* embryos, where *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells specifically express the fluorescent reporter tdTomato (Figure 3A), we used calcium imaging to show that most tdTomato⁺ cells ventral of nVII were intrinsically rhythmic and responded to acidification by increasing their bursting frequencies (Figure 3D-F). This behavior functionally identifies them as embryonic RTN cells, previously termed embryonic parafacial (e-pF) cells (Thoby-Brisson et al., 2009). We then tested the capacity of these cells to elicit C4 activity upon optogenetic stimulation, as was previously reported in adult rats of neurons in the RTN region defined by *Phox2b* expression alone (Abbott et al., 2009; Abbott et al., 2011). In *Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo;Ai32* embryos, where expression of a channelrhodopsin-2-YFP fusion protein (Chr2-YFP, Ai32 line) (Madisen et al., 2012) is specific for *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells, single light pulses delivered to the RTN region systematically triggered a motor burst response in C4 and nVII neurons (Figure 3G).

A conditional genetic strategy that combines the criteria of *Atoh1* and *Phox2b* expression will thus target selectively periV and periVII neurons. Among those, we found that periV neurons are not essential to CO₂ chemosensitivity. To show this, we compared phrenic nerve activity in a standard brainstem-spinal cord preparation with one from which the pons and thus periV cells have been removed by sectioning (Figure 4A). At E16.5, in baseline conditions, sectioning accelerated C4 discharges by suppressing the inhibitory influence on the

RÉSULTATS

respiratory rhythm generator (RRG) exerted by pontine neurons (Ito et al., 2000; Hilaire et al., 2004). However, the response to a pH challenge was fully preserved (Figure 4B,C). Hence, at least in vitro, periV neurons do not seem to contribute to the CO₂/pH response. Conversely, affecting periVII cells, but leaving periV neurons intact, suffices to eliminate the CO₂ response. Indeed, our previous results showed that conditional inactivation of *Phox2b* or activation of the toxic *P2b^{27Alacki}* allele using *Egr2^{Cre}* as Cre driver resulted in the lack of CO₂ responsiveness (Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011), despite the fact that *Egr2^{cre}* directs recombination in periVII (Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011) but not in periV cells (Figure 4D-G).

Inactivation of *Atoh1* in *Phox2b^{on}* neurons abrogates CO₂ chemosensitivity.

We restricted the *Atoh1* null mutation to *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells by partnering a floxed *Atoh1* locus with *Cre* expressed from the *Phox2b* promoter (*P2b::CreBAC1*) (D'Autreaux et al., 2011). Like *Phox2b*, *Cre* was switched on in the dB2 progenitor domain (Figure 5A) from which RTN neurons arise (Dubreuil et al., 2009; Hirsch et al., 2013). In *P2b::CreBAC1; Atoh1^{lox/lox}* embryos, *Atoh1* expression will be lost selectively in cells that express or have expressed *Phox2b*, that is in *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells. Indeed, *Atoh1* expression was abrogated in the ventrolateral medulla at E15.5 and as early as E12.5 (Figure 5B,C) attesting to an efficient recombination. Predictably, *Atoh1* expression was preserved outside of the *Phox2b* lineages, i.e. in the rhombic lip and the migrating cells of the anterior extramural stream. In *P2b::CreBAC1; Atoh1^{lox/lox}* embryos, as in *Atoh1^{-/-}* embryos, the normally *Atoh1*-expressing periVII cells that can be detected in these mutants by double *Phox2b/Lbx1* labeling (Pagliardini et al., 2008; Rose et al., 2009b) were quantitatively preserved. However, their distribution was massively shifted from ventral to dorsal, in agreement with previous results (Huang et al., 2012) (Figure 5D-F).

In *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants, we looked for cells displaying the functional hallmarks of the embryonic RTN: intrinsic rhythm, acid-sensitivity, entrainment of the RRG (Thoby-Brisson et al., 2009). In E14.5 brainstem preparations,

calcium activity in the RTN region of the conditional mutants was similar to that observed in *Atoh1*^{-/-} embryos: few active cells (though more numerous), absence of synchronized rhythmic fluorescent changes and unresponsiveness to acidification (Figure 6A,B). At E16.5, the frequency of C4 discharges was reduced as in other mutants with impaired RTN function (Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011). The mutant preparations retained a residual response to a pH challenge, which, however, was much attenuated (an increase in C4 frequency by $51 \pm 10\%$ above the pH 7.4 value vs $106 \pm 17\%$ in the controls) and remained below the baseline value of the controls (Figure 6C,D).

We then examined the C4 response to photostimulation of the RTN region in brainstem-spinal cord preparations from embryos harboring the Chr2-YFP allele expressed from the *Vglut2* promoter. In the transgenic embryos, cells co-expressing Chr2-YFP and *Phox2b* were concentrated at the medullary surface ventral to the Chr2-YFP-negative nVII neurons, thus well accessible to light delivered from the ventral surface (Figure 6E-G). We then introduced the Chr2-YFP allele (*Vglut2::Chr2-YFP*) (Hagglund et al., 2010) in a *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* background and its *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/+}* control. In the controls, stimulation of the RTN region by single light pulses elicited a synchronized calcium response in the RTN neurons, systematically followed by a nVII and a C4 motor burst (Figure 6H). Neither nVII nor C4 motor bursts were observed when the pre-Bötzinger complex (preBötC) was silenced by an opiate agonist (Mellen et al., 2003) or its development impaired genetically (Bouvier et al., 2010) (Figure 6I,J) showing that both motor outputs require the integrity of the preBötC, a key rhythmogenic center for respiration (Feldman et al., 2013). In the *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* background, the same light stimulus resulted in the activation of only a few RTN neurons and failed to trigger C4 and nVII bursts (Figure 6K). Therefore, the *Lbx1* and *Phox2b* co-expressing RTN precursors that make it to the medullary surface (see Figure 5F) are unable to mount a motor response.

Reasoning that the dorsally misrouted periVII cells may underlie the residual chemoresponse in E16.5 preparations, we compared the functional status of ventral and dorsal cells in E15.5 slice preparations (Figure 7A). In control

RÉSULTATS

preparations, the full complement of rhythmic cells was located ventral of nVII. In the *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants, by contrast, rhythmic cells were massively depleted ventrally, but a population of neurons with synchronized rhythmic activity was now found dorso-laterally of nVII (Figure 7B,C). The dorsally located mutant periVII cells are thus distinct from wild-type dorsal cells and functionally resemble wild-type ventral cells. The ectopic periVII cells in the *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants that have conserved their glutamatergic nature (Figure 7E) accelerated their rhythm in low pH conditions (Figure 7C) and may thus be responsible for the attenuated C4 response to acidification in the brainstem-spinal cord preparations. In *Atoh1^{-/-}* embryos, the dorso-laterally located rhythmic cells were fewer and less synchronized (Figure 7D), which may explain the complete absence of chemosensitivity.

Finally, we examined *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* animals, 60% of which survive to adulthood, at birth and postnatally by plethysmography. In newborn mutants at the day of birth (P0), mean ventilation (VE) in normal air was slightly reduced. Hypercapnic air increased VE of the controls by $60 \pm 13\%$ but had no effect on the mutants (Figure 8A and Table 1), and this was true also at P2.5 (Figure 8B-D). Adult mutants breathing hypercapnic air responded with a 30% increase in VE, corresponding to a 42% recovery of the CO₂ response with respect to the adult controls.

In conclusion, *Atoh1* inactivation in *Phox2b^{on}* cells disrupts the RTN anatomically and functionally, severely curtails CO₂ chemosensitivity in embryonic brainstem preparations and abrogates it at birth, with only a partial recovery at later stages.

Inactivation of *Phox2b* in *Atoh1^{on}* neurons abrogates CO₂ chemosensitivity.

RTN neuron development depends on *Phox2b* (Dubreuil et al., 2009). In a second strategy to genetically impair the RTN, we targeted the inactivation of *Phox2b* to *Atoh1^{on}* cells by partnering a floxed *Phox2b* locus (*Phox2b^{lox}*) with *Cre* expressed constitutively from the *Atoh1* promoter (the *Atoh1^{Cre}* allele). In embryos

homozygous for the *Phox2b^{lox}* allele and expressing at the same time Cre from the *Atoh1* locus, *Phox2b* will be inactivated selectively in periVII and periV cells. *Atoh1* and thus *Cre* are switched on in the migrating RTN precursors only at E12.5 (Dubreuil et al., 2009), well after *Phox2b*, which is already expressed in their progenitors (Hirsch et al., 2013). Therefore, early differentiation of RTN neurons is expected to proceed normally in *Atoh1^{cre};Phox2b^{lox/lox}* embryos and functional defects to appear only during late gestation. At E15.5, most RTN neurons, identified by *Atoh1* expression and their location ventral of nVII, had already lost *Phox2b*, but their number had dropped by only 34% (Figure 9A-C). In brainstem-spinal cord preparations from E16.5 *Atoh1^{cre};Phox2b^{lox/lox}* mutants, the baseline frequency of C4 discharges was reduced by 50% but the response to hypercapnia was preserved (Figure 9D,E). At E18.5, however, the number of *Atoh1⁺* RTN neurons had dropped by 62 % (Figure 9F-H) and the newborn pups did not significantly increase their ventilation in hypercapnic air, while baseline ventilation was slightly reduced (Figure 9I and Table 1). Thus inactivating *Phox2b* in periVII and periV cells eliminates the CO₂ response at birth.

Inactivation of glutamatergic synaptic transmission in *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* neurons abrogates CO₂ chemosensitivity

Previous data suggested that RTN neurons are glutamatergic and may thus activate the RRG by releasing glutamate (Mulkey et al., 2004; Bochorishvili et al., 2012). Proper functioning of the RRG requires glutamatergic synaptic transmission since mice with germline inactivation of *Vglut2*, in which the synaptic release of glutamate is blocked, die at birth from respiratory failure (Wallen-Mackenzie et al., 2006). To restrict *Vglut2* inactivation to *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells, we partnered the floxed *Vglut2* locus (*Vglut2^{lox}*) with the *Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo* genotype (Figure 10A). In mice homozygous for *Vglut2^{lox}* and harboring at the same time the *Atoh1^{FRTCre}* and *P2b::FLPo* alleles, *Vglut2* inactivation will be targeted selectively to periVII and periV cells. *Vglut2^{lox/lox};Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo* pups did not significantly increase their ventilation in response to hypercapnia (Figure 10B and Table 1) while baseline ventilation was only slightly reduced. Thus the RTN mediation of the CO₂

RÉSULTATS

response is glutamatergic and the chemoreflex abrogated by blocking glutamatergic transmission specifically in *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells.

DISCUSSION

In the mammalian CNS, localized networks of interneurons play critical roles in controlling behavior. It has, however, proved difficult to pinpoint the contribution of individual classes of neurons to defined behaviors. One example is the RTN. The RTN neurons have been implicated in breathing regulation by CO₂, but their roles in the respiratory chemoreflex remains controversial (Huckstepp and Dale, 2011; Nattie, 2011; Guyenet et al., 2013). Here we reexamined this issue using novel genetic backgrounds inspired by prior evidence that RTN neurons express and require the *Atoh1* and *Phox2b* transcription factors (Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009b). We first established that the *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* neurons of the RTN region are (i) rhythmically active, (ii) sensitive to low pH, and (iii) both necessary and sufficient for optogenetic entrainment of the phrenic nerve, thus have the functional signatures of developing RTN neurons. We then show that an *Atoh1* constitutive null mutation and three conditional mutations specifically targeting *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* neurons and disrupting RTN formation or function abolish the CO₂-evoked ventilatory response in neonates. Finally, we provide evidence that periV neurons, the only other group of neurons targeted by the conditional mutations, are not involved in the chemoreflex. We conclude that the neurons of the RTN region that have a history of both *Phox2b* and *Atoh1* expression are obligatory elements of the circuitry for breathing regulation by CO₂ at and after birth.

Our results contrast with those of Huang et al. (Huang et al., 2012) who used a *Phox2b::Cre* line distinct from ours to delete *Atoh1* in *Phox2b* lineage cells. These authors reported a slowed down basal respiratory rhythm (a hallmark of RTN impairment (Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011)) but a fully preserved response to acidification in embryonic brainstem-spinal cord preparations at late gestation. They did not test the chemoreflex in behaving

pups, but it is only in the latter that we find a complete abrogation of the reflex. A possible explanation is that in vitro, but not in vivo, the RTN precursors misrouted to the dorsal site of nVII in the conditional *Atoh1* mutants are able to mount a motor response to bath acidification whose magnitude may depend on the precise experimental conditions. In support of this, we found that the ectopic dorsal cells in the mutants respond to low pH by accelerating their firing rate.

Our data demonstrate that the blunted CO₂ response at later postnatal stages in *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mice is a recovery from an absent chemoreflex at birth, not a secondary deterioration as proposed by Huang et al. We found a very similar recovery of the chemoreflex in adult *Egr2^{Cre/+};Phox2b^{27Alacki/+}* mutants (Ramanantsoa et al., 2011). The partial recovery of the CO₂ response in adults could be due to late compensation by residual RTN neurons, to a strengthening of peripheral chemoreceptor input bypassing the RTN or to some of the multiple sites proposed to function as CO₂ sensors in the brain (Nattie and Li, 2009). The lack of the chemoreflex in many human CCHS patients (Straus et al., 2010; Weese-Mayer et al., 2010) suggests that these putative compensatory sites also have a history of *Phox2b* expression.

Our data are compatible with two explanations for the loss of the chemoreflex: the *Phox2b⁺/Atoh1⁺* RTN neurons could be the main CO₂ sensors in the brain or obligatory relays funneling the chemosensory input from other cells to the RRG— or both. On the one hand, RTN neurons are exquisitely sensitive to small changes in CO₂/pH (Mulkey et al., 2004; Onimaru et al., 2008; Wang et al., 2013) and, in close apposition to numerous capillaries (Onimaru et al., 2012b), well positioned to sense PCO₂ in the blood. On the other, they receive afferences from many brainstem sites that contain putative chemosensors (Rosin et al., 2006) and respond with depolarization to activation of nearby acid-sensitive astrocytes (Gourine et al., 2010). In addition, RTN neurons receive excitatory connections from the CBs via the nucleus of the solitary tract and increase their firing rates in response to CB stimulation by hypoxia (Takakura et al., 2006). The CBs are not only the main PO₂ sensors, but provide also a substantial fraction of the overall CO₂ response (Forster et al., 2000; Smith et al., 2006). Still, we observed a

RÉSULTATS

complete loss of the chemoreflex in neonates with impaired RTN function. The implication is that the RTN is required perinatally for all forms of respiratory chemoreception whether mediated by central or peripheral chemoreceptors.

Because of its extensive connections with other chemosensory sites and the observation that its stimulation activates breathing, the RTN has been suggested to be a crucial hub for respiratory chemoreception (Guyenet et al., 2013).

However, the results of previous loss-of-function experiments to assess the part played by RTN neurons in the chemoreflex circuitry are not entirely conclusive. In previous work, we have monitored the chemoreflex in mice in which subsets of *Phox2b* expressing neurons including the RTN were genetically lesioned. In these genetic backgrounds, RTN neurons were deleted and the chemoreflex lost, but the effect could not be unambiguously attributed to the RTN (Dubreuil et al., 2008; Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011). Others have impaired RTN function in behaving adult rats using pharmacological or pharmacogenetic approaches, but similar data are not available for the newborn period. Bilateral lesions of the neurokinin1 receptor-expressing neurons in the RTN region by injection of saporin conjugated to a substance P analogue have produced variable results, ranging from a modest attenuation of the chemoreflex in an earlier study (Nattie and Li, 2002) to a substantial decrease in recent work (Takakura et al., 2014). Silencing the neurons in the RTN region by the GABA_A agonist muscimol also yielded a large reduction of the hypercapnic response (Takakura et al., 2013). These experiments, however, lack specificity and the extent of the lesion or inhibition is difficult to control. Marina et al (Marina et al., 2010) used a pharmacogenetic approach to silence RTN neurons. Administration of allatostatin to rats which had received local injections of a lentivirus vector expressing the allatostatin receptor from an artificial *Phox2b* promoter reduced the hypercapnic response by an average of 60%. However, the approach used by Marina et al. targets the neurons in the rostral ventro-lateral medulla defined by *Phox2b* expression alone. They include C1 adrenergic and A5 noradrenergic neurons (Stornetta et al., 2006), whose contribution to the observed effect was not assessed.

RTN neurons express the vesicular glutamate transporter *Vglut2* and establish synapses with preBötC neurons that resemble classic glutamatergic synapses (Mulkey et al., 2004; Bochorishvili et al., 2012), but this does not prove that they use glutamate and not other transmitters such as galanin (Bochorishvili et al., 2012) to excite RRG neurons. Removal of *Vglut2* and thus glutamatergic synaptic transmission selectively from *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* neurons reduced baseline ventilation only slightly but eliminated the chemoreflex at birth. Therefore, glutamatergic excitatory drive by *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* neurons underlies the respiratory chemoreflex while normocapnic ventilation depends less on it.

A consensus about the sites and mechanisms that underlie the chemosensory control of breathing has yet to emerge. Our results establish that the subset of *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* RTN neurons, i.e. the RTN neurons that have expressed *Atoh1* in the embryo, lie at the core of the chemoreflex circuitry. They are absolutely necessary for the ventilatory response to hypercapnia at birth and are still the major contributors in the adult. Irregular or instable respiration at birth is characteristic for preterm infants and not uncommon in babies that are born at term (Gaultier and Gallego, 2005). The key role of the RTN for breathing regulation at birth that we show here suggests that defective development or immaturity of the human equivalent, apart from causing CCHS, could also underlie more common respiratory problems in the newborn period.

MATERIALS AND METHODS

Mice

The following mouse lines were used in this study:

1. *Atoh1^{FRTCre}*. To generate the *Atoh1^{FRTCRE}* allele, we inserted a neomycin resistance cassette with 3 consecutive SV40 polyadenylation sequences flanked by FRT sites at the 3' of the *Atoh1* CDS, which was followed by an IRES sequence and the Cre recombinase CDS (Figure 1). The targeting vector was assembled in the K667 plasmid and electroporated into BD10(MCI-C57BL/6N Tac) ES cells. Correctly targeted ES cells were injected into C57BL/6 blastocysts. Construction of the targeting vector, ES

RÉSULTATS

cell manipulation and blastocyst injection were done by the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). The *Atoh1^{FRTCre}* mice were genotyped for the presence of Cre by PCR (forward primer TGATGGACATGTTTCAGGGATC, reverse primer GAAATCAGTGCGTTCGAACGCTAG).

2. *Atoh1^{Cre}* expressing Cre recombinase from the *Atoh1* locus constitutively was derived from *Atoh1^{FRTCre}* by germ line expression of Flpe (Rodriguez et al., 2000). The *Atoh1^{cre}* mice were genotyped for the presence of Cre and the absence of the *neomycin* gene (using GATCTCCTGTCATCTCACCT and ATGGGTACGACGAGATCCT as PCR primers).
3. *Atoh1^{CreERT2}*. In the *Atoh1^{CreERT2}* allele, the *Atoh1* CDS is replaced by the *CreERT2* sequence thus creating a null allele (Fujiyama et al., 2009), preserving transcription of the *Atoh1* 3'UTR.
4. *P2b::CreBAC1*, a BAC transgenic line expressing Cre recombinase from the *Phox2b* promoter in a pattern mirroring expression of the endogenous *Phox2b* gene (D'Autreaux et al., 2011).
5. *Atoh1^{lox}* harboring a floxed *Atoh1* locus generating a null allele upon Cre recombinase action (Shroyer et al., 2007). The *Atoh1* 3'UTR is not expressed from the recombined *Atoh1^{lox}* allele.
6. *Tau^{GFPnLacZ}* (Srinivas et al., 2001) and *R26tdTomato* (Ai9) (Madisen et al., 2010), floxed STOP reporter lines expressing GFP and nuclear β galactosidase or tdTomato, respectively, in response to Cre recombinase action.
7. *P2b::FLPo*, a BAC transgenic line, expressing FLPo recombinase from the *Phox2b* promoter in a manner mirroring expression of the endogenous *Phox2b* gene (Hirsch et al., 2013).
8. *Ai32* expressing a channelrhodopsin2-YFP fusion protein driven by the *CAG* promoter in the *Rosa* locus (Madisen et al., 2012) in response to Cre recombinase action.
9. *Vglut2::Chr2*, a BAC transgenic line expressing a channelrhodopsin2-YFP fusion from the *Vglut2* promoter (Hagglund et al., 2010).
10. *Phox2b^{lox}* harboring a floxed *Phox2b* locus generating a null allele upon Cre recombinase action (Coppola et al., 2010).

11. *Vglut2^{lox}* harboring a floxed *Vglut2* locus generating a null allele upon Cre recombinase action (Wallen-Mackenzie et al., 2006).

12. *Egr2^{Cre}* expressing Cre from the *Egr2* locus (Voiculescu et al., 2000).

All lines have been crossed for at least 4 generations with C57BL/6 X DBA/2 F1 mice and were maintained on this background.

As there were no significant differences seen between mice that lacked one copy of the floxed *Atoh1* or *Phox2b* alleles or Cre and wild-type mice, these three types of littermates were grouped together as controls, except when stated otherwise.

All animal studies were done in accordance with the guidelines issued by the European Community and have been approved by the research ethics committees in charge (Comités d'éthique pour l'expérimentation animale) and the French Ministry of Research.

Histology and cell counting

The methods for immunofluorescence, combined bright field or fluorescent in situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC) have been described (Dubreuil et al., 2000; Hirsch et al., 2007; Dubreuil et al., 2008). Riboprobes for *Atoh1* or *Vglut2* were synthesized using a DIG RNA labelling kit (Roche) as specified by the manufacturer. *Atoh1* probes were derived either from the *Atoh1* 3'UTR to reveal the cells that would have expressed *Atoh1* protein normally in *Atoh1^{CreERT2/CreERT2}* embryos or from the *Atoh1* CDS in all other instances. The *Vglut2* signal was revealed by Cy5-tyramide working solution (PerkinElmer). The primary antibodies used were: rabbit anti-*Phox2b* (Pattyn et al., 1997), chicken anti-GFP (Aves), rabbit anti- β galactosidase (Cappel), guinea pig anti *Lbx1* (Muller et al., 2002) and mouse anti-*Islet1,2* (Developmental Studies Hybridoma Bank). They were revealed for fluorescent staining by Alexa 488- (Invitrogen) or by Cy3- or Cy5-labelled (Jackson ImmunoResearch) secondary antibodies of the appropriate specificity, for bright field observation by biotin-labeled secondary antibodies and Vectastain ABC kit (Vector) revealed with 3,3'-diaminobenzamide. The pictures were captured with either a Hamamatsu ORCA-ER or a Leica DFC420C camera mounted on a Leica DM5500B microscope for

RÉSULTATS

observation through fluorescence or bright field optics, respectively. Brightness and contrast were adjusted in Adobe Photoshop uniformly across entire images maintaining signal linearity.

PeriVII neurons, defined as *Phox2b*⁺/*Atoh1*⁺ or *Phox2b*⁺/*Lbx1*⁺ cells surrounding nVII, were counted throughout an area starting rostrally with the first section containing nVII neurons and stopping 70µm caudal to the caudal end of nVII.

PeriV neurons were defined as *Atoh1*⁺ cells surrounding nV. Cell numbers represent bilateral cell counts in a 1:4 series of sections multiplied by 4.

Statistical analysis of cell counts was done using a two-tailed t-test and XLSTAT software with alpha set at 0.05 and the results expressed as mean±SEM.

Calcium imaging and electrophysiology

The methods used for preparing brainstem–spinal cord and transverse slice preparations from embryonic day 14.5 (E14.5)-16.5 mouse embryos and maintaining them in oxygenated artificial cerebrospinal fluid have been described (Dubreuil et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009; Bouvier et al., 2010). E15.5 transverse slices for optically recording of dorsally located periVII neurons were obtained by cutting 100µm thick sections from caudal to rostral until a slice contained unambiguously nVII. Then a 600 µm slice was made and its caudal surface imaged.

Calcium imaging of the RTN region was done from the ventral surface on E14.5 brainstem–spinal cord preparations loaded with Calcium Green-1 AM (Life Technologies), or Fluo-8 AM (Teflabs) essentially as described (Dubreuil et al., 2009; Thoby-Brisson et al., 2009; Bouvier et al., 2010), using a conventional epifluorescence configuration with a FITC filter cube. Fluorescence images were captured with a cooled Neo sCMOS camera (Andor Technology Ltd.) using an exposure time of 100 ms and bin size of 4x4 for periods of 180 s using Micro-Manager software (<https://www.micro-manager.org/wiki/>). When calcium imaging was combined with photostimulation of *Vglut2::Chr2-YFP* preparations, the calcium imaging back-illumination was set at a minimal level using neutral

density filters in the light-path, which caused no noticeable changes in the rhythmic activity of the RTN.

Phrenic nerve activity was recorded on E16.5 brainstem-spinal cord preparations using suction electrodes positioned on the 4th cervical root as described (Thoby-Brisson et al. et al. et al., 2009; Bouvier et al., 2010). Raw signals were amplified (High-gain AC, 7P511, Grass Instruments), filtered (bandwidth 3-3kHz), integrated (time constant 50 ms, Neurolog System, Digitimer) before digital sampling at 6kHz and analysis using pClamp9 (Molecular Devices).

Values are given as mean \pm SEM. Statistical significance was tested using a difference Student's *t* test to compare data sets obtained from different mutants and a paired difference Student's *t* test to compare the measurements obtained in two different conditions.

Photostimulation

In optogenetic experiments, photostimulation was provided by either a 473nm laser connected to an optical fiber placed over the RTN region on one side, to illuminate a 250 x 500 μm elliptic area encompassing the RTN (laser power set at 8 mW) or by digital holography (Lutz et al., 2008) to target the RTN region defined by rhythmic calcium activity maps generated on-line (laser power density around 0.1 $\mu\text{l}/\mu\text{m}^2$). Individual light pulses of 70-150 ms duration were applied, at a fixed delay of 4 s following a spontaneous C4 motor burst detected by a threshold device, or randomly in C4 silent preparations.

Plethysmography

Breathing variables of E18.5–P60 animals were measured non-invasively in unanaesthetized, unrestrained pups using whole-body barometric plethysmography (Chatonnet et al., 2007). E18.5 pups delivered by Caesarean sections or P0 pups were placed under a heating lamp and were gently touched for 10 minutes until their breathing had stabilized. E18.5 to P2.5 animals were placed in a 30 ml chamber and their ventilation was recorded continuously for a

RÉSULTATS

period of 800 s composed sequentially of a 200 s exposure to normal air followed by a 200 s exposure to hypercapnic air (8%CO₂/21%O₂/71%N₂) before normal air was resumed for the remaining 400 s. Juvenile and adult animals were recorded in a larger chamber, first for 100 s in normal air, then the animals were exposed to the hypercapnic mix for 3 min before initiation of a 100 s period of recording prior to returning to normal air breathing. After a 7 min familiarization period in the plethysmograph chambers, breathing parameters [breath duration (T_{TOT}), tidal volume (V_T), and ventilation (V_E) calculated as V_T/T_{TOT}] were continuously monitored in apnea-free periods. Calibrations were performed at the end of each recording session by injecting 2.5–5 µl of air in the chamber with a Hamilton syringe. In plots showing the continuous evolution of respiratory parameters before, during and after the hypercapnic challenge, each circle represents the mean, across all animals of a given genotype, of the parameter values binned in 20 s intervals. To quantify breathing parameter changes induced by hypercapnia, we first calculated for each animal the ratio of the mean parameter value during the last 100 s of the hypercapnic period over that during the last 100 s of the preceding normocapnic period, and then calculated the mean of these ratios in the population of control and mutant animals and expressed them as percentage (ΔV_E graphs and Table 1). Values are given as mean ± SEM. Statistical significance was tested using a difference Student's *t* test to compare data sets obtained from different mutants and a paired difference Student's *t* test to compare the measurements obtained in two different conditions.

Image analysis

The time-series acquisitions were analyzed using a custom-made extended fork of the public domain ImageJ software (PhysImage [<http://physimage.sourceforge.net/>]). To determine the changes in calcium activity we first calculated a ΔF/F₀ time-series using a plugin of PhysImage that implements a running moving average for baseline subtraction. This tool calculates F₀ by taking the fluorescence image (F) at each time-step (t) as follows: $\Delta F(t)/F_0 = (F(t) - F_0(t))/F_0(t)$, where

$$F_0(t) = \frac{\sum_{i=t}^{i+w} F(i)}{w} \text{ and } w=100 \text{ and the last } w \text{ frames of the time-series are dropped.}$$

To identify rhythmic RTN cells and establish RTN maps of activity we performed cycle-triggered averages (CTAs) using the anatomical location of the RTN to define the region of interest (ROI) that represents broad RTN activity. Using the built-in ImageJ Z-project function, we calculated the image representing the standard deviation (SD) of the CTA and used an iterative thresholding algorithm to identify potential ROIs representing cells (Hayes et al., 2012). A trace representing each ROI's activity was extracted and then the ROIs were validated by calculating the power spectral density of these traces. If the peak power of each trace was not in the range 0.1-0.4 Hz the corresponding ROI was discarded. For mutant backgrounds with no discernable RTN activity, the same strategy of detection was used except that the SD image of the full $\Delta F/F_0$ time-series was taken into account rather than SD of the image after CTA.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Véronique Dubreuil for early data on periV cells, Marie-Rose Hirsch and Zoubida Chettouh for technical assistance, Guillaume Dabée, Christophe Auger and Carmen Le Moal for expert animal husbandry and T. Müller and C. Birchmeier for antibodies.

REFERENCES

- Abbott SB, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG (2011) Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. *J Neurosci* 31:16410-16422.
- 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.
- Bochorishvili G, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG (2012) Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *J Comp Neurol* 520:1047-1061.
- Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chedotal A, Fortin G (2010) Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci* 13:1066-1074.
- 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 Dev* 2:19.
- Coppola E, Rallu M, Richard J, Dufour S, Riethmacher D, Guillemot F, Goridis C, Brunet JF (2010) Epibranchial ganglia orchestrate the development of the cranial neurogenic crest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2066-2071.
- D'Autreaux F, Coppola E, Hirsch MR, Birchmeier C, Brunet JF (2011) Homeoprotein Phox2b commands a somatic-to-visceral switch in cranial sensory pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20018-20023.
- Dubreuil V, Hirsch M-R, Pattyn A, Brunet J-F, 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 (2008) 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 (2009) Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in *Phox2b* mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J Neurosci* 29:14836-14846.
- Duffin J (2010) The role of the central chemoreceptors: a modeling perspective. *Respir Physiol Neurobiol* 173:230-243.
- Dymecki SM, Ray RS, Kim JC (2010) Mapping cell fate and function using recombinase-based intersectional strategies. *Methods Enzymol* 477:183-213.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239-266.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol* 75:423-452.
- Forster HV, Pan LG, Lowry TF, Serra A, Wenninger J, Martino P (2000) Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals. *Respir Physiol* 119:199-208.
- Fujiyama T, Yamada M, Terao M, Terashima T, Hioki H, Inoue YU, Inoue T, Masuyama N, Obata K, Yanagawa Y, Kawaguchi Y, Nabeshima YI, Hoshino M (2009) Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, *Ptf1a* and *Atoh1*. *Development* 13:13.
- Gaultier C, Gallego J (2005) Development of respiratory control: evolving concepts and perspectives. *Respir Physiol Neurobiol* 149:3-15.
- 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* 21:814-822.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329:571-575.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2010) Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol* 518:3883-3906.

RÉSULTATS

- Guyenet PG, Abbott SB, Stornetta RL (2013) The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel? *Brain Res* 1511:126-137.
- Hägglund 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* 13:246-252.
- Hayes JA, Wang X, Del Negro CA (2012) Cumulative lesioning of respiratory interneurons disrupts and precludes motor rhythms in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8286-8291.
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bevençut M (2004) Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* 143:187-197.
- Hirsch MR, Glover JC, Dufour HD, Brunet JF, Goridis C (2007) Forced expression of Phox2 homeodomain transcription factors induces a branchio-visceromotor axonal phenotype. *Dev Biol* 303:687-702.
- Hirsch MR, d'Autreaux F, Dymecki SM, Brunet JF, Goridis C (2013) A Phox2b::FLPo transgenic mouse line suitable for intersectional genetics. *Genesis* 51:506-514.
- Huang WH, Tupal S, Huang TW, Ward CS, Neul JL, Klisch TJ, Gray PA, Zoghbi HY (2012) Atoh1 governs the migration of postmitotic neurons that shape respiratory effectiveness at birth and chemoresponsiveness in adulthood. *Neuron* 75:799-809.
- Huckstepp RT, Dale N (2011) Redefining the components of central CO₂ chemosensitivity--towards a better understanding of mechanism. *J Physiol* 589:5561-5579.
- Ito Y, Oyamada Y, Yamaguchi K (2000) Age-dependent chemosensitive pontine inhibition of medullary respiratory rhythm generation in the isolated brainstem of the neonatal rat. *Brain Res* 887:418-420.
- Lutz C, Otis TS, DeSars V, Charpak S, DiGregorio DA, Emiliani V (2008) Holographic photolysis of caged neurotransmitters. *Nature methods* 5 : 821-827
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-

- throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133-140.
- Madisen L et al. (2012) A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci* 15:793-802.
- Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF, Gourine AV (2010) Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci* 30:12466-12473.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37:821-826.
- 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.
- Muller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM, Birchmeier C (2002) The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34:551-562.
- Nattie E (2011) Julius H. Comroe, Jr., Distinguished Lecture: Central chemoreception: then ... and now. *J Appl Physiol* 110:1-8.
- Nattie E, Li A (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol* 106:1464-1466.
- 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.
- 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.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2012a) Postsynaptic mechanisms of CO₂ responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *J Physiol* 590:1615-1624.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2012b) Relationship between the distribution of the paired-like homeobox gene (*Phox2b*) expressing cells and blood

RÉSULTATS

- vessels in the parafacial region of the ventral medulla of neonatal rats. *Neuroscience* 212:131-139.
- 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.
- 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.
- Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson et al. M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J, Goridis C (2011) Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditional *Phox2b* mutants. *J Neurosci* 31:12880-12888.
- Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM (2011) Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* 333:637-642.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that *FLPe* is an alternative to *Cre-loxP*. *Nat Genet* 25:139-140.
- Rose MF, Ahmad KA, Thaller C, Zoghbi HY (2009a) Excitatory neurons of the proprioceptive, interoceptive, and arousal hindbrain networks share a developmental requirement for *Math1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22462-22467.
- Rose MF, Ren J, Ahmad KA, Chao HT, Klisch TJ, Flora A, Greer JJ, Zoghbi HY (2009b) *Math1* is essential for the development of hindbrain neurons critical for perinatal breathing. *Neuron* 64:341-354.
- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* 499:64-89.
- Rossor T, Soe A, Bhat R, Greenough A (2014) Congenital central hypoventilation syndrome and carbon dioxide sensitivity. *Eur J Pediatr*, in press.
- Shroyer NF, Helmrath MA, Wang VY, Antalffy B, Henning SJ, Zoghbi HY (2007) Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (*Math1*) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 132:2478-2488.

- Smith CA, Rodman JR, Chenuel BJ, Henderson KS, Dempsey JA (2006) Response time and sensitivity of the ventilatory response to CO₂ in unanesthetized intact dogs: central vs. peripheral chemoreceptors. *J Appl Physiol* 100:13-19.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4.
- 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.
- Straus C, Trang H, Becquemin MH, Touraine P, Similowski T (2010) Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. *Respir Physiol Neurobiol* 171:171-174.
- Takakura AC, Moreira TS, De Paula PM, Menani JV, Colombari E (2013) Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. *Exp Physiol* 98:304-315.
- Takakura AC, Barna BF, Cruz JC, Colombari E, Moreira TS (2014) Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol* 99:571-585.
- 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.
- Teran FA, Massey CA, Richerson GB (2014) Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: where are we now? *Prog Brain Res* 209:207-233.
- Thoby-Brisson M, Karlén, M., Wu, N. Charnay, P., Champagnat, J., Fortin, G. (2009) Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the pre-Bötzinger complex. *Nat Neurosci* 12:1208-1035.
- Voiculescu O, Charnay P, Schneider-Maunoury S (2000) Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* 26:123-126.

RÉSULTATS

- Wallen-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson et al. 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 S, Shi Y, Shu S, Guyenet PG, Bayliss DA (2013) Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci* 33:7756-7761.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA, Trang H (2010) An Official ATS Clinical Policy Statement: Congenital Central Hypoventilation Syndrome: Genetic Basis, Diagnosis, and Management. *Am J Respir Crit Care Med* 181:626-644.

Table 1. Relative changes (%) in breathing parameters in response to hypercapnia measured by plethysmography in E18.5 or P0 pups of the indicated genotypes

Genotypes	ΔV_E	p-value	ΔT_{TOT}	p-value	ΔV_T	p-value	n
<i>control</i>	60.9±8.9	<0.001	-19.5±2.8	<0.001	27.5±5.7	<0.001	51
<i>Atoh1^{-/-}</i>	-3.7±8.1	0.53	6.7±10.4	0.58	-1.3±4.9	0.62	8
<i>P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}</i>	-8.0±12.8	0.35	14.6±10.6	0.63	-0.4±10.9	0.55	13
<i>Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}</i>	18.7±13.5	0.91	-1.9±8.1	0.31	9.2±9.2	0.45	10
<i>Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo;Vglut2^{lox/lox}</i>	20.3±8.6	0.20	-3.6±6.1	0.31	16.7±9.2	0.25	12

RÉSULTATS

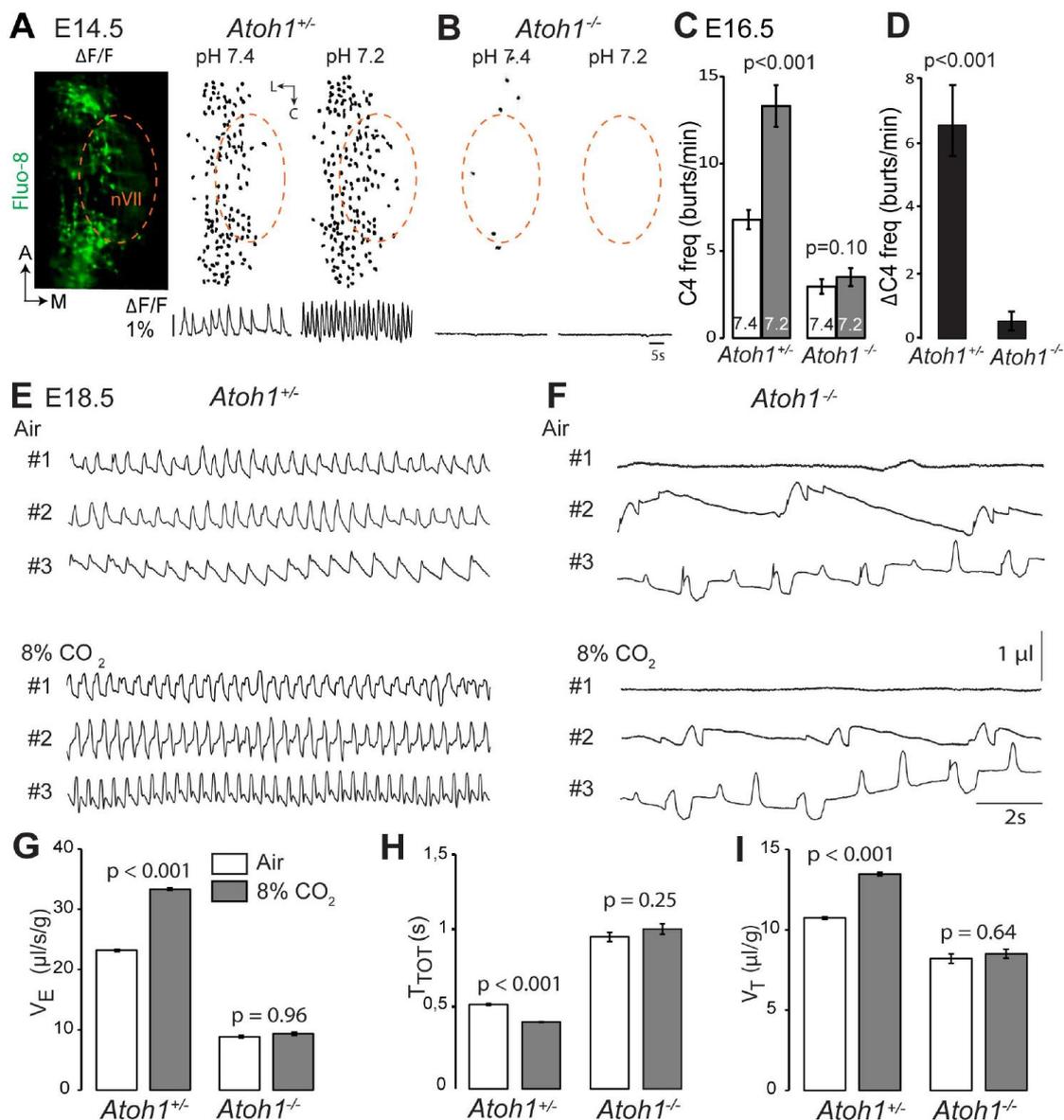


Figure 1.

Lack of CO₂ chemosensitivity and loss of RTN neurons in *Atoh1*^{-/-} (*Atoh1*^{CreERT2}/*CreERT2*) mice. **A**, Left, ventral view centered on nVII (dotted outline) showing Fluo-8 fluorescence changes ($\Delta F/F$) of RTN cells in an E14.5 *Atoh1*^{+/-} brainstem preparation. Right, RTN cell maps (top) and average population activity traces (bottom) at pH 7.4 and pH 7.2. The vertical black bar in front of the traces represents a 1% $\Delta F/F$ change as indicated. **B**, Corresponding maps and tracings for an *Atoh1*^{-/-} embryo attesting to the absence of a functional RTN. **C**, Quantification of C4 burst frequencies in baseline (white bar) and low pH (gray bar) conditions for *Atoh1*^{+/-} (n=11) and *Atoh1*^{-/-} (n=8) E16.5 preparations. Baseline frequency dropped by 56% in the mutants and was not affected by acidification. **D**, Change of C4 frequency ($\Delta C4$) induced by a pH challenge in *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} preparations. **E,F**, Representative examples of plethysmographic recordings of three live E18.5 *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} pups (#1-#3) delivered by Caesarean section and breathing normal or hypercapnic air as indicated. **G-I**, Mean values of ventilation (VE) (G), breath duration (T_{TOT}) (H) and tidal volume (V_T) (I) of control (n=31) and mutant (n=8) pups breathing normal or hypercapnic air, excluding periods of apnea.

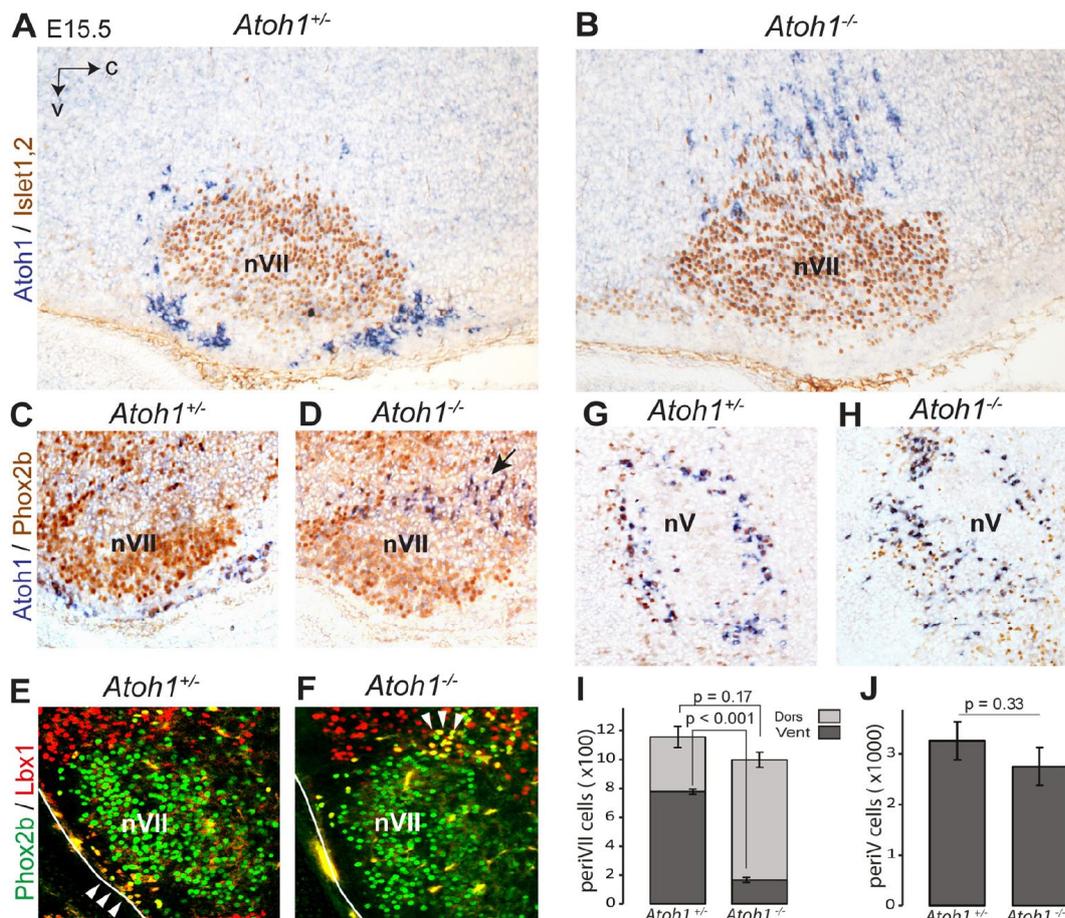


Figure 2.

Ventral to dorsal shift of periVII and normal location of periV cells in *Atoh1*^{-/-} embryos. **A,B**, Combined ISH with a 3'UTR probe of *Atoh1* (blue) and IHC with anti-Islet1,2 antibodies (brown) to visualize nVII on sagittal sections through the hindbrain from E15.5 *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} embryos. The *Atoh1*^{-/-} neurons identified by expression of the *Atoh1* 3'UTR, which is expressed from the *Atoh1*^{CreERT2} allele, are depleted ventral of nVII visualized by Islet1,2 labeling, but accumulate dorsally. **C-D**, Combined ISH with a 3'UTR probe for *Atoh1* and IHC for Phox2b on sagittal (C,D) (anterior at left) sections through the medulla of E15.5 *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} embryos as indicated. The arrow points to the dorsally shifted periVII cells that express the *Atoh1* 3'UTR and Phox2b. The PeriVII cells that would have normally expressed the *Atoh1* protein are depleted ventral of nVII in the mutants and accumulate dorsally. **E,F**, Immunofluorescence for Phox2b (green) and Lbx1 (red) and on coronal sections (lateral at left) through the medulla of E15.5 *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} embryos. The Lbx1⁺/Phox2b⁺ periVII cells (yellow) are depleted ventral of nVII but accumulate dorsally (arrowheads). **G,H** Combined ISH with a 3'UTR probe for *Atoh1* and IHC for Phox2b on coronal sections (lateral at left) through the pons of E15.5 *Atoh1*^{+/-} and *Atoh1*^{-/-} embryos showing the normal location of periV cells in the mutants. **I**, Quantification of the dorsal and ventral population of periVII cells identified by *Atoh1* 3'UTR expression at E15.5. Their total numbers were not significantly different from the controls in *Atoh1*^{-/-} embryos, but 83±2.6% are located dorsally in the mutants (n=3) vs 32±7% in the controls (n=3). **J**, Quantification of periV cells identified by *Atoh1* 3'UTR expression at E15.5.

RÉSULTATS

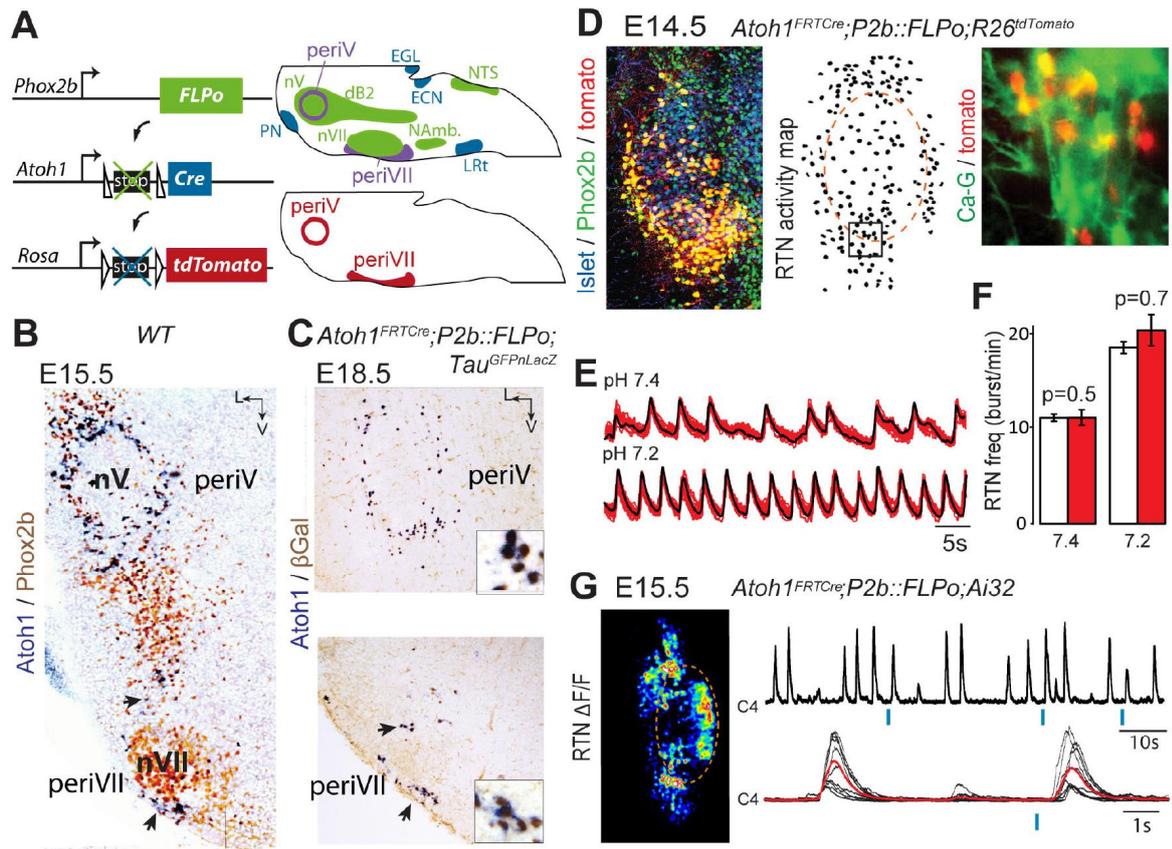


Figure 3.

Characterization of *Atoh1^{on}/Phox2b^{on}* cells accessed by intersectional genetics. **A** Left, schematic of the *P2b::FLPo* (above) and *Atoh1^{FRTCre}* (middle) alleles and the Cre recombinase-responsive *R26^{tdTomato}* indicator allele (below). Right above, sagittal brainstem cartoon schematizing the structures with a history of *Phox2b* (green) or *Atoh1* (blue) expression and the intersectional population expressing or having expressed both (purple). Below, the periV and periVII cells that will express *tdTomato* in *P2bFLPo;Atoh1^{FRTCre};R26tdTomato* embryos. The cells expressing *FLPo* recombinase from the *Phox2b* promoter will activate *Cre* expression from the *Atoh1* locus in the intersectional population, which in turn will activate *tdTomato* expression (or nuclear β galactosidase expression if *Tau^{GFPnLacZ}* is used as indicator allele). dB2, dB2-derived interneurons, EGL, external granular layer, ECN, external cuneate nucleus, LRt, lateral reticular nucleus, NAmb, nucleus ambiguus, NTS, nucleus of the solitary tract, PN, pontine nuclei. **B,C**, Combined ISH for *Atoh1* and IHC for *Phox2b* (B) or nuclear β galactosidase (C) on coronal sections through the hindbrain from E15.5 wild-type (WT) (B) or E18.5 *Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo;Tau^{GFPnLacZ}* (C) embryos. The periV and periVII cells are the only cells in the brainstem co-expressing *Atoh1* and *Phox2b* (B) and also the only cells with a history of both *Atoh1* and *Phox2b* expression (C). The arrows in panels B and C point to the periVII cells. The insets in panel C show close ups of periV (top panel) and periVII cells (bottom panel). **D**, Left, ventral view of triple immunofluorescence for

Islet1,2, Phox2b and tdTomato over the facial area in E14.5

Atoh1^{FRTCre};P2b::FLP;R26^{tdTomato} embryos showing *Atoh1^{on}/Phox2b^{on}* cells (yellow).

Middle, RTN activity map and right, close up of the boxed area showing

Atoh1^{on}/Phox2b^{on} cells (red) loaded with Calcium Green-1 AM (Ca-G) (yellow). **E**,

Superimposed individual *Atoh1^{on}/Phox2b^{on}* cell fluorescence changes (red traces) and average population activity (black trace) at pH7.4 (top) and pH7.2 (bottom) showing the frequency increase in low pH. **F**, Histogram showing that the burst frequencies of the

rhythmic RTN neurons in control embryos (white bars, n=27 preparations) are not significantly different from that of the tdTomato⁺ (thus *Atoh1^{on}/Phox2b^{on}*) cells in

Atoh1^{FRTCre};P2b::FLP;R26^{tdTomato} embryos (red bars, n=6 preparations) at pH7.4 and

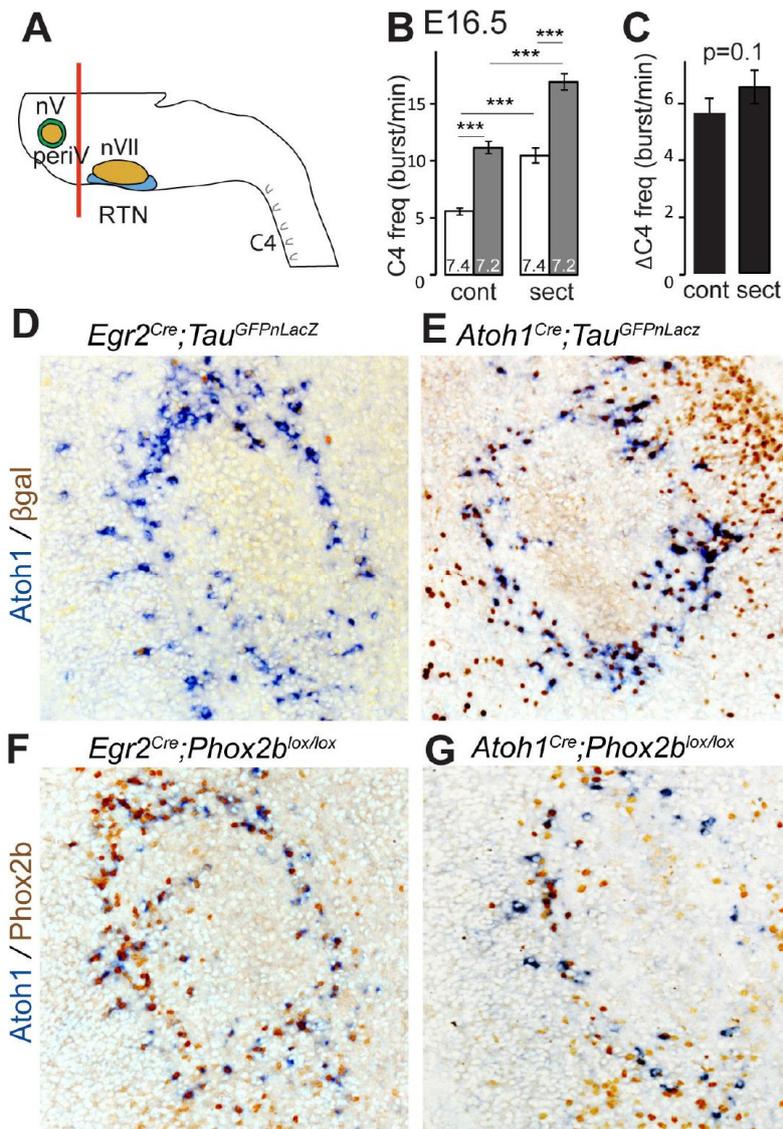
pH7.2. **G**, Optogenetic stimulation of *Phox2b^{on}Atoh1^{on}* cells expressing ChR2 at E15.5

evokes C4 motor responses. Left, $\Delta F/F$ changes in the RTN and adjacent nVII (dotted

line) following photostimulation of the RTN region. Right, at top, integrated activity of the C4 root showing spontaneous activity and bursts of activity evoked by light pulses

(blue bars). Bottom, set of 10 superimposed C4 activity traces, corresponding to 10

photostimulations (blue bar), triggered 4s after a spontaneous burst and time-locked to the photostimuli (individual traces in black and average trace in red).

**Figure 4.**

PeriV cells are not essential for the respiratory chemoreflex. **A**, Schematic of a standard brainstem-spinal cord preparation showing the level of the section (red line) to eliminate the pons. **B**, Comparison of C4 burst frequencies before and after sectioning in E16.5 wild-type preparations in normal and low pH conditions. The section (sect, n=34) increases baseline (white bar) frequency but preserves the response to acidification (grey bar); *** p<0.001. **C**, The changes of C4 frequency ($\Delta C4$) induced by the pH challenge before (cont) and after sectioning (sect) are not significantly different from each other. **D,E**, Combined ISH for *Atoh1* and IHC for nuclear localized LacZ with anti- β galactosidase antibodies on coronal sections through the E15.5 pons, in the indicated genotypes. With *Egr2* as Cre driver, expression of the Tau^{GFPnLacZ} reporter allele is not activated in periV cells (D), but it is expressed there when Cre is provided by *Atoh1^{cre}* (E). **F,G**, Combined ISH for *Atoh1* and IHC for Phox2b on coronal sections through the E15.5 pons in the indicated genotypes. In the presence of *Egr2^{Cre}*, Phox2b expression by the *Atoh1⁺* cells is preserved in *Phox2b^{lox/lox}* embryos (F), but not when Cre is provided by *Atoh1^{Cre}* (G). PeriV cells are not in the *Egr2* lineage and can thus not be affected in *Egr2^{Cre};Phox2b^{lox/lox}* or *Egr2^{Cre};P2b^{27Alacki}* mice, in which the respiratory chemoreflex is abrogated.

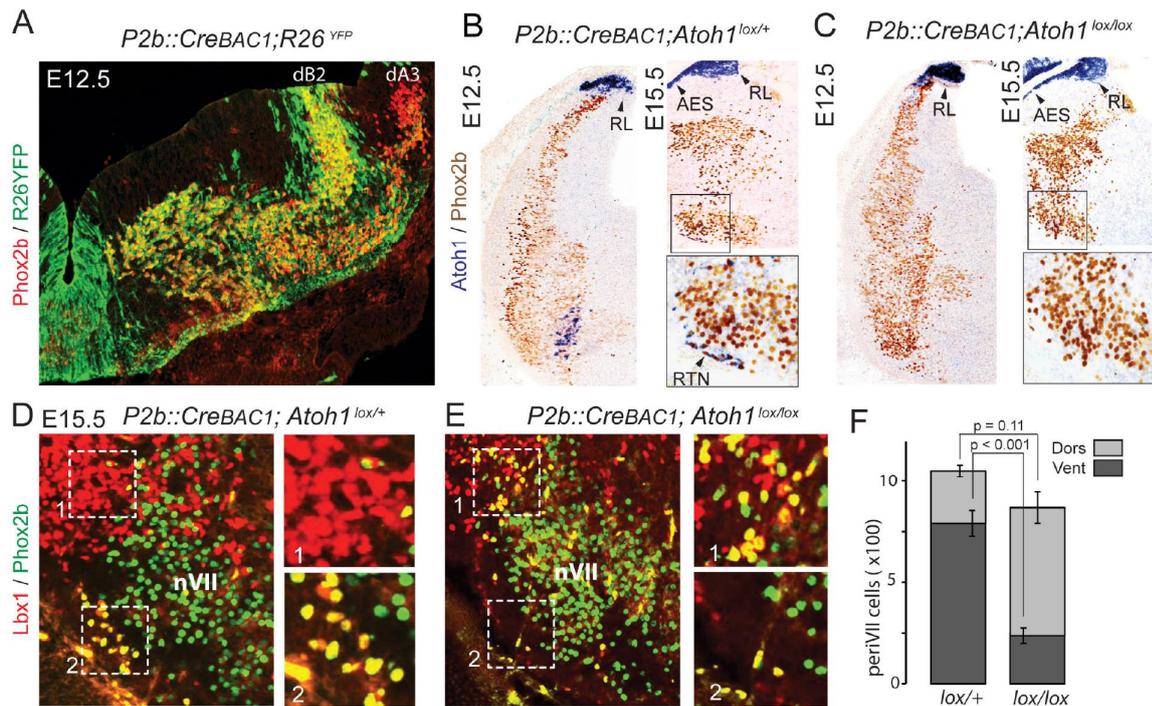


Figure 5.

Selective removal of *Atoh1* in RTN precursors produces a ventral to dorsal shift of periVII neurons. **A**, Combined Phox2b (red) and YFP (green) staining on a transverse section of an E12.5 *P2b::CreBAC1;R26^{YFP}* hindbrain showing efficient recombination of the reporter allele in dB2 progenitors. In the dA3 domain, where Phox2b and Cre are switched on postmitotically, newly born cells are still YFP⁻ but express it during their ventral migration. **B,C**, Combined *Atoh1* ISH with a CDS probe of *Atoh1* and Phox2b IHC on coronal hindbrain sections of *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/+}* (**B**) or *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* embryos (**C**) at E15.5 or E12.5 as indicated. *P2b::Cre* removes *Atoh1* message in the RTN precursors but not in the rhombic lip (RL) or the cells of the anterior extramural stream (AES) of *Atoh1^{lox/lox}* embryos. Higher magnifications of the boxed areas are shown in the lower right corner. **D,E**, Immunofluorescence for Lbx1 (red) and Phox2b (green) on coronal E15.5 hindbrain sections of the indicated genotypes (dorsal at top, lateral on the left). The double-labeled periVII cells are in yellow, the insets show close ups corresponding to the boxed areas. The Lbx1⁺/Phox2b⁺ cells accumulate dorso-laterally of nVII in *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants. **F**, Quantification of the Lbx1⁺/Phox2b⁺ periVII cells at E15.5 located ventrally (Vent) or dorsally (Dors) of nVII. In *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/+}* controls (n=3), 25±2.3% of the periVII neurons are located dorso-laterally of nVII versus 73±2.6% in *P2b::CreBac1;Atoh1^{lox/lox}* mutants (n=4).

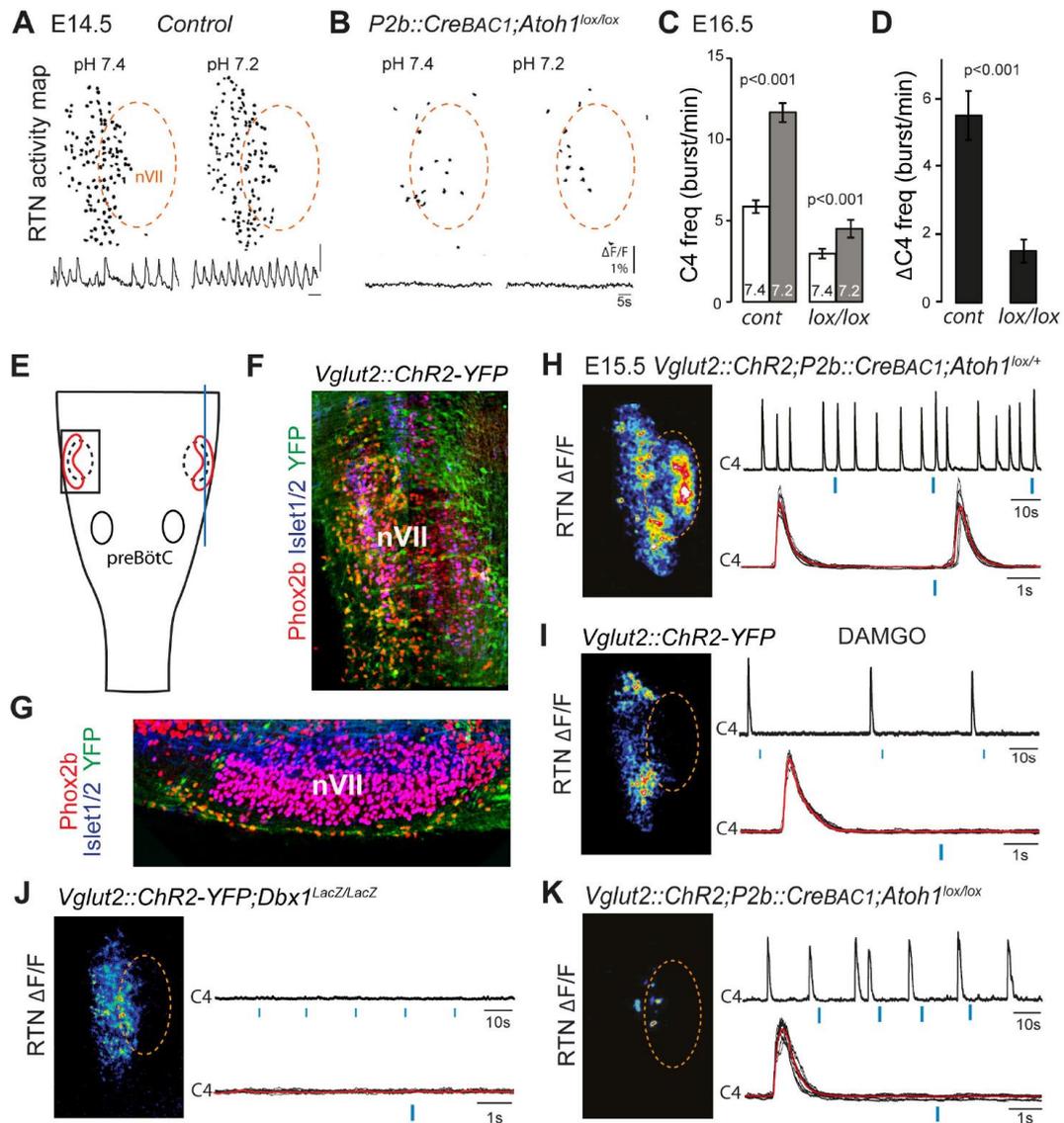


Figure 6.

Functional consequences of selective inactivation of *Atoh1* in *Phox2b^{on}* cells. **A,B**, RTN activity maps and average population activity traces at E14.5 in control and *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants at pH7.4 and pH7.2 showing absence of a functional RTN in the mutant. **C**, Quantification of C4 burst frequencies in baseline (white bars) and low pH (gray bars) conditions in control and mutant E16.5 preparations. Baseline frequency dropped by 49% in the *P2b::CreBac1;Atoh1^{lox/lox}* mutants and increased at pH 7.2 by $51 \pm 10\%$ above the pH7.4 value ($n=12$) vs $106 \pm 17\%$ in the controls ($n=15$). **D**, Corresponding change of C4 frequency ($\Delta C4$) induced by a pH challenge in *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* (lox/lox) compared to control (cont) preparations. **E**, Cartoon of a ventral view of the hindbrain showing the position of nVII (blue dotted line), RTN (red outline) and the preBötC. **F**, Ventral view corresponding to the boxed area in E (anterior at top, lateral on the left) of the RTN in a *Vglut2::Chr2-YFP* embryo, labeled for the indicated markers. **G**, Sagittal section (blue line in (A)), labeled for the indicated markers, showing the *Phox2b⁺/YFP⁺* cells ventral to nVII and optimally accessible to light. **H**, Left, photostimulation of the RTN region at E15.5 evokes $\Delta F/F$ changes in the RTN and adjacent nVII (dotted line) in *Vglut2::Chr2;P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/+}*

preparations. Right, above, integrated activity of C4 showing spontaneous bursts and bursts evoked by light pulses (blue bars). Bottom, set of 5 superimposed C4 activity traces, corresponding to 5 photostimulations (blue bar), triggered 4s after a spontaneous C4 burst and time-locked to photostimuli (individual traces in black and average trace in red). **I**, Same experiment in a *Vglut2::Chr2-YFP* background in the presence of DAMGO (n=10) that depresses the excitability of the preBötC, but not of the RTN. Photostimulation of the RTN region still evokes $\Delta F/F$ changes in the RTN but not in nVII (left). Right, above, integrated activity of C4 showing reduced frequency of the C4 rhythm and systematic failures of photostimulation to evoke C4 responses. **J**, Same experiment in *Vglut2::ChR2;Dbx1^{LacZ/LacZ}* mutants (n=5) in which the preBötC but not the RTN is disrupted. The mutation completely abrogates light-evoked nVII and C4 responses. **K**, In *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants, $\Delta F/F$ responses to light are limited to a few cells in the RTN and in nVII (left). Right, at top, integrated activity of C4 showing a reduced frequency of the C4 rhythm and systematic failures of photostimulation (blue bars) to evoke C4 responses. Bottom, set of 10 superimposed C4 activity traces, corresponding to 10 photostimulations (blue bar), triggered 4s after a spontaneous C4 burst and time-locked to photostimuli (individual traces in black and average trace in red).

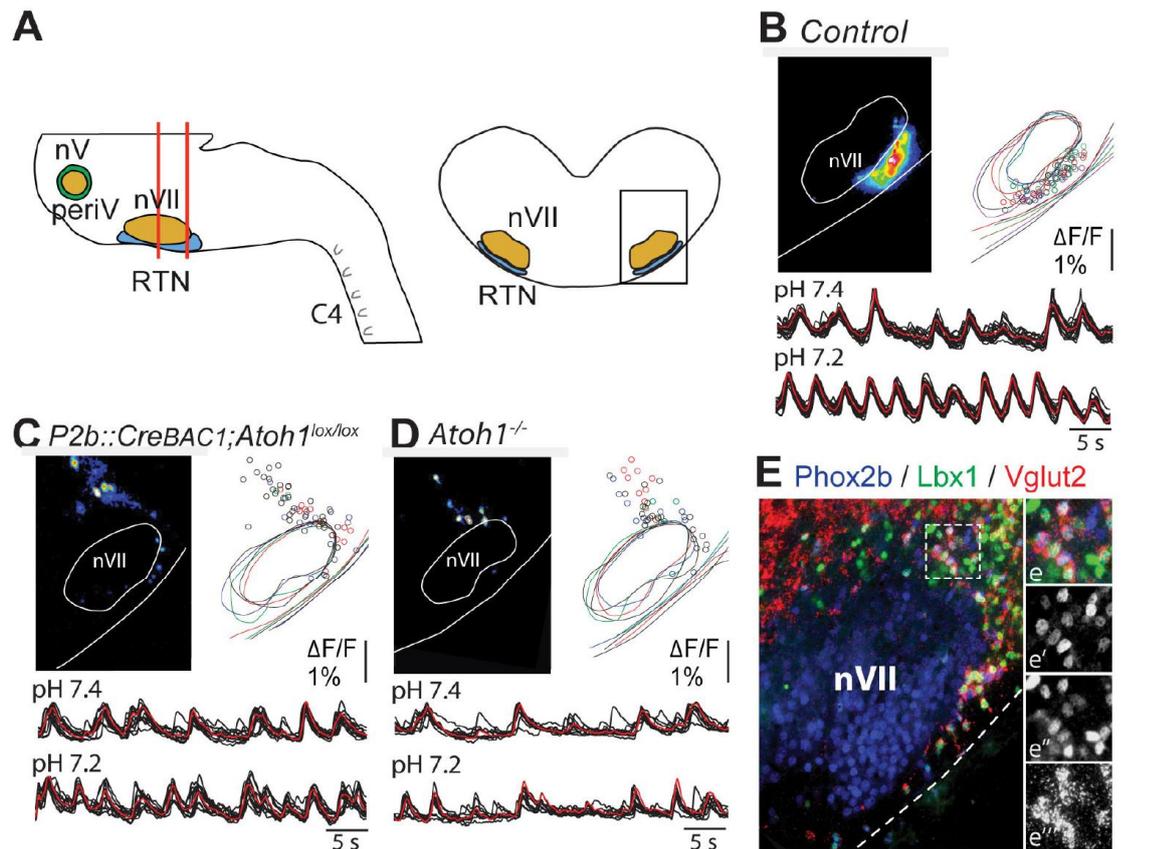


Figure 7.

The dorsally misplaced periVII cells in *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* embryos are intrinsically rhythmic and respond to a pH challenge. **A**, Cartoon of the medullary slice preparation (left, red lines) used for calcium imaging of dorsally misplaced mutant cells (black box) (right). **B,C**, Activity maps and traces (individual traces in black and average trace in red) of periVII cells in E15.5 transverse slices from control (B) or *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* (C) preparations showing rhythmic activity and pH response of dorsally located periVII cells in the mutants but not in wild-types (n=5). **D**, Same experiment for *Atoh1^{-/-}* preparations, showing fewer rhythmic cells that are less well synchronized. The matched colors of the circles and the outlines of nVII and the medullary surface in B-D represent individual experiments. **E**, Combined fluorescent ISH for *Vglut2* (red) and immunofluorescent staining of Phox2b (blue) and Lbx1 (green) on coronal section of an E15.5 *P2b::creBAC1;Atoh1^{lox/lox}* hindbrain showing *Vglut2* expression by the dorsally misplaced Phox2b+/Lbx1+ cells; (e-e'''), close ups of the boxed area showing the overlay (e), Phox2b (e'), Lbx1 (e'') and *Vglut2* (e''') expression.

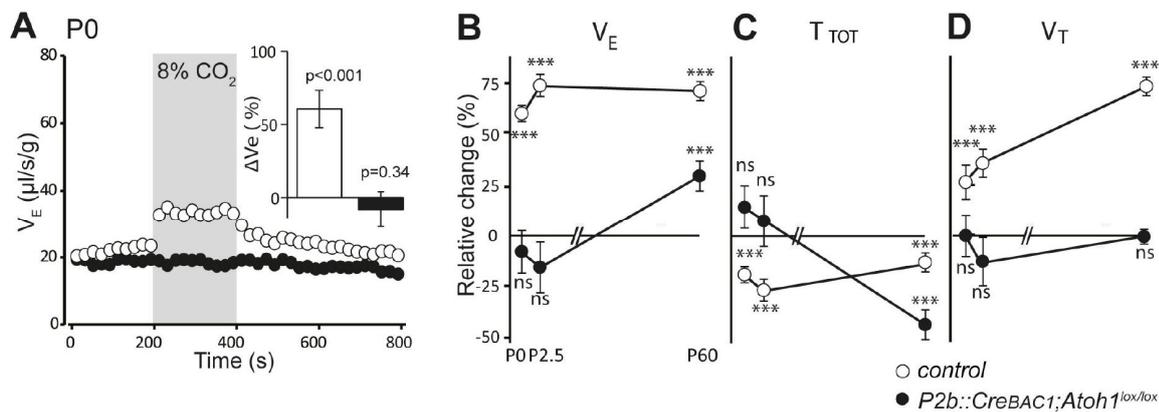


Figure 8.

Defective CO₂ chemosensitivity after inactivation of *Atoh1* in *Phox2b^{on}* cells. **A**, Plethysmographic recording of P0 pups. Shown are the mean values of V_E in air or in response to 8% CO₂ in *P2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* mutants (black circles) (n=13) and controls (empty circles) (n=31). Inset, ventilatory response to hypercapnia expressed as the percentage change relative to baseline for controls (white bar) and mutants (black bar). **B-D**, Mean relative changes of ventilation (V_E) (B), breath duration (T_{TOT}) (C) and tidal volume (V_T) (D) measured in P0 (control n=31; mutant N=13), P2.5 (n=17; N=9) and P60 (n=19; N=11) mice breathing normal or hypercapnic air (8% CO₂). ***p<0.001, n.s.=p>0.05 (hypercapnic vs. room air).

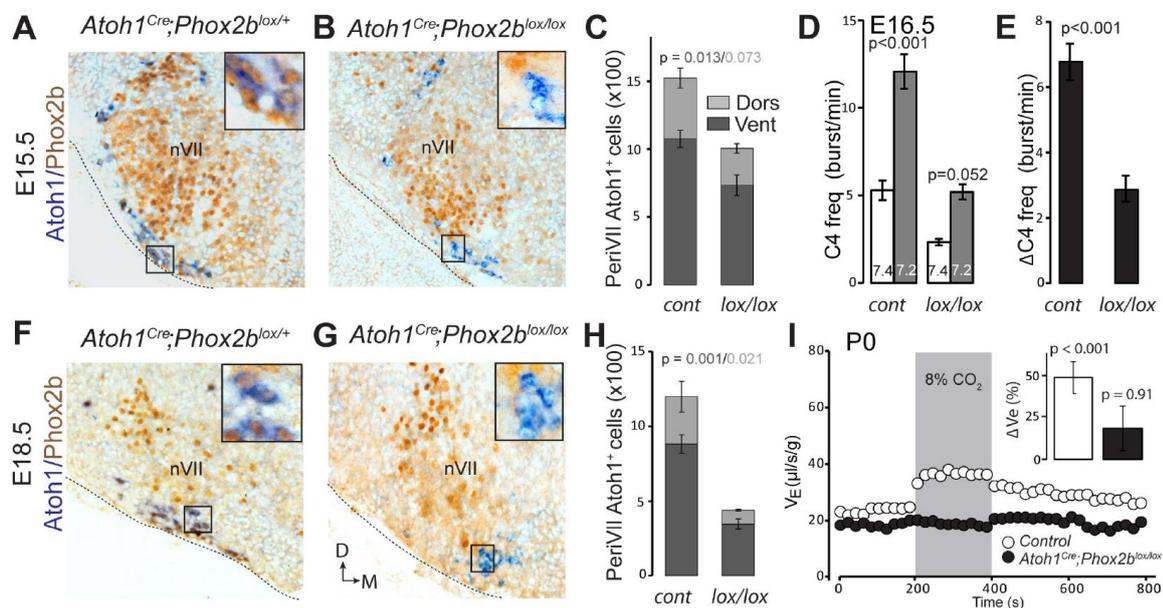
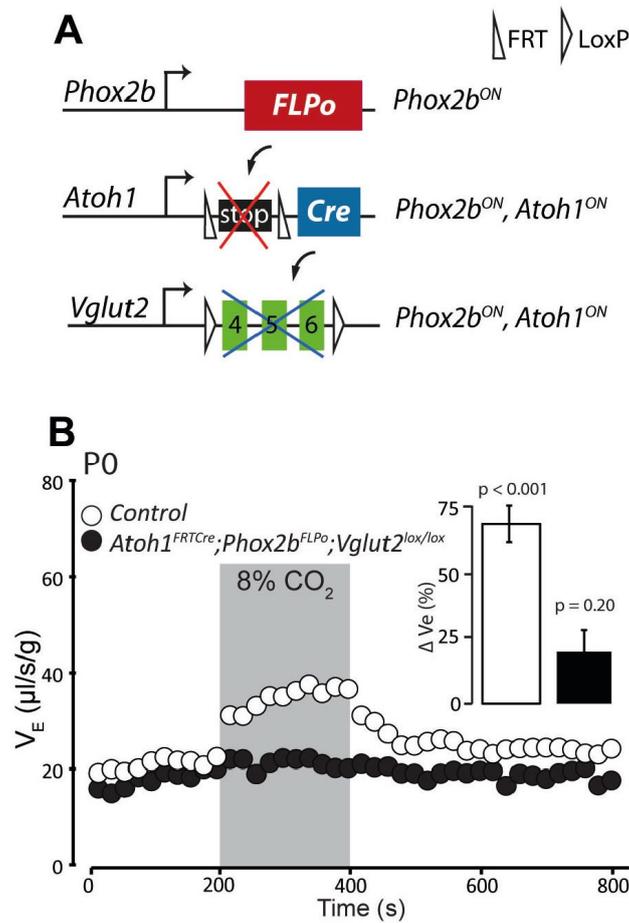


Figure 9.

Loss of RTN neurons and the respiratory chemoreflex after selective inactivation of *Phox2b* in *Atoh1^{on}* cells. **A,B,F,G**, Combined ISH for *Atoh1* (blue) and IHC for *Phox2b* (brown) on coronal hindbrain sections from E15.5 (**A,B**) and E18.5 (**F,G**) embryos of the indicated genotypes. The insets show high magnifications corresponding to the boxed areas. **C,H**, Counts of the *Atoh1*⁺ periVII cells in control (*Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/+}*) and mutant (*Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}*) embryos at E15.5 (**C**) and E18.5 (**H**). Total periVII cells represent $66 \pm 6.5\%$ of the controls at E15.5 (n=4) and drop to $38 \pm 2.3\%$ at E18.5 (n=3), while most *Atoh1*⁺ cells have lost *Phox2b* expression already at E15.5. There was no ventral to dorsal shift of periVII cells in the *Phox2b* mutants ($26 \pm 2.9\%$ and $21 \pm 0.3\%$ dorsally located cells in controls and mutants, respectively). **D**, Quantification of C4 burst frequencies in baseline (white bar) and low pH (gray bar) conditions in control (cont) and *Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}* (*lox/lox*) E16.5 preparations. Baseline frequency dropped by 56% in the *Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}* mutants. It increased by $127 \pm 20\%$ above the pH7.4 value in the mutants (n=5) vs $135 \pm 14\%$ in the controls (n=12). **E**, Corresponding change of C4 frequency (Δ C4) induced by a pH challenge in *Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}* (*lox/lox*) compared to control (cont) preparations. **I**, Plethysmographic recording of P0 pups. Shown are the mean values of *VE* in air or in response to 8%CO₂ in *Atoh1^{Cre};Phox2b^{lox/lox}* mutants (black circles) (n=10) and controls (empty circles) (n=10). The inset represents the ventilatory response to hypercapnia expressed as the percentage change relative to baseline for controls (white bar) and mutants (black bar) showing lack of a significant effect of hypercapnia.

**Figure 10.**

Disrupting the synaptic release of glutamate in *Atoh1^{on}/Phox2b^{on}* cells suppresses the CO₂ response. **A**, Schematic of the *P2b::FLPo* (above) *Atoh1^{FRTCre}* (middle) alleles and the floxed *Vglut2* locus (Wallen-Mackenzie et al., 2006) (below). The *Phox2b* lineage cells expressing FLPo recombinase from the *Phox2b* promoter will activate Cre expression from the *Atoh1* locus selectively in *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells. Inactivation of the floxed *Vglut2* locus will thus be restricted to *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* cells. **B**, Plethysmographic recording of P0 *Vglut2^{lox/lox};Atoh1^{FRTCre};P2b::FLPo* pups showing slightly slowed-down baseline ventilation in air and lack of response to 8% CO₂ (black circles) (n=12) compared to controls (empty circles) (n=9). The inset shows the ventilatory response to hypercapnia expressed as the percentage change of V_E relative to baseline for mutants (black bar) and controls (white bar).

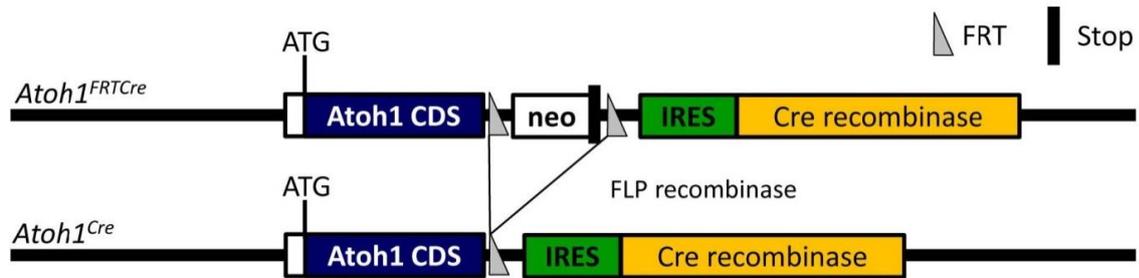


Figure supplement 1. Schematic of the *Atoh1^{FRTCre}* allele. The *Atoh1^{FRTCre}* allele was generated by homologous recombination in ES cells. The targeted *Atoh1* locus contains from 5' to 3' the *Atoh1* CDS up to and including the stop codon, a neomycin resistance cassette with 3 consecutive SV40 polyadenylation sequences flanked by FRT sites, an IRES sequence, the Cre recombinase CDS followed by a bovine growth hormone polyadenylation sequence and the *Atoh1* 3'UTR. FLP recombination-mediated recombination will remove the neomycin cassette with the polyadenylation signals allowing for expression of Cre from the *Atoh1* locus.

Publication 3: A new Lbx1 mutation disturbs RTN development and abrogate CO₂ chemosensitivity

Rodrigo Hernandez Miranda L, Pierre-Louis Ruffault, Gilles Fortin, Birchmeier C.

Article en préparation

Préambule :

Les résultats présentés dans ce chapitre sont l'objet d'une étude entamée avec le laboratoire de Carmen Birchmeier (Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC) ; Berlin). Nous discuterons des principaux résultats illustrant le rôle du RTN dans la chémoception centrale au CO₂ mais, par souci de confidentialité, nous ne présenterons pas l'ensemble des données et la description de la mutation ne sera pas détaillée.

De fait nous nous focaliserons principalement sur les approches physiologiques réalisées au sein de notre laboratoire et donnerons les quelques données anatomiques concernant les déficits cellulaires observés chez les mutants.

RÉSULTATS

Des études réalisées récemment ont permis d'isoler chez une famille hongroise une nouvelle mutation provoquant l'apparition du syndrome congénital d'hypoventilation central (CCHS). Bien que les parents ne présentaient aucun symptôme, les enfants ont rapidement développé, peu après leur naissance, de graves troubles respiratoires nécessitant une prise en charge médicale chronique. Suite à une étude de génétique humaine, une nouvelle mutation récessive affectant le gène *Lbx1* fut isolée. Il s'agit d'une mutation modifiant le cadre de lecture dite mutation frameshift (nommée par la suite *Lbx1^{fs/+}*).

La transposition de cette mutation chez la souris a permis de mettre en évidence que les mutants hétérozygotes (*Lbx1^{fs/+}*) ne présentent aucun défaut respiratoire, sont viables et fertiles. Les mutants homozygotes (*Lbx1^{fs/fs}*) se développent normalement mais meurent rapidement suite à la parturition à cause de défauts respiratoires. De manière surprenante, seuls les neurones du RTN sont anatomiquement déléétés chez ces mutants, contrairement aux mutants *Lbx1* nuls (*Lbx1^{-/-}*) qui présentent de lourdes modifications des réseaux neuronaux médullaires caractérisés notamment par une disparition du relai somatosensoriel trigéminal (SpV) associée à un important accroissement du noyau du tractus solitaire (NTS) (*Sieber et al., 2007*). Ces résultats, particulièrement étonnants, rappellent ceux observés suite à l'expression de l'allèle toxique *Phox2b^{27Ala}* et questionnent sur une possible sensibilité de ces neurones au cours de leur développement embryonnaire. Les études anatomiques réalisées au stade E18.5 mettent en évidence des défauts migratoires résultant en une accumulation anormale des neurones du RTN dorsalement au noyau moteur Facial (voir Figure 1), comme cela a pu être observé chez les mutants pour lesquels l'expression d'*Atoh1* a été constitutivement ou conditionnellement abrogée (voir Figure 1). Chez ces mutants, l'expression du facteur de transcription *Atoh1* n'est pas détectable au stade E12.5 au sein de la médulla ventro-latérale (nombre de cellules *Atoh1⁺/Phox2b⁺* par animal *Lbx1^{fs/+}* : 588±19, n=4 vs *Lbx1^{fs/fs}* : 31±4, n=4 ; t-test p < 0.001, Figure 2). Ces résultats peuvent en partie expliquer les défauts migratoires observés aux stades plus tardifs. Enfin, le fait qu'aucun défaut d'expression ne puisse être observé au sein de laèvre rhombique suggère que les effets de la mutation *Lbx1^{fs/fs}* sont de nature non autonome cellulaire.

Les études d'imagerie calcique sur tronc cérébral entier réalisées au stade embryonnaire E14.5 démontrent, chez les animaux contrôles, la présence d'une population rythmique, synchrone et dont la fréquence de décharge peut être accrue suite à l'acidification du bain de perfusion ($F_{pH7.4} : 10.4 \pm 0.8$ vs $F_{pH7.2} : 16.1 \pm 0.8$ bouffées par minute, t-test apparié, p < 0.001 Fig. 3a et données non montrées). Chez les mutants *Lbx1^{fs/fs}*, aucune activité rythmique ne peut être

observée, même en condition hypercapnique (Fig. 3b). A E18.5, les animaux contrôles obtenus suite à une césarienne présentent une activité ventilatoire rythmique et stable (Fig. 3c) se caractérisant par un faible nombre d'épisodes apnéiques (% d'apnée par enregistrement : 3.35 ± 0.81 , durée moyenne des apnées 2.93 ± 0.14 secondes, $n=44$; Fig3. e & f). Suite à l'injection dans la chambre pléthysmographique d'un mélange gazeux hypercapnique contenant 8% de CO₂, l'activité ventilatoire augmente fortement (V_E : 18.2 ± 0.3 en normocapnie vs 35.0 ± 0.3 $\mu\text{l/g/s}$ en hypercapnie ; t-test, $p < 0.001$; Fig. 3g) afin de rapidement adapter les échanges gazeux en fonction des besoins de l'organisme. Les mutants *Lbx1^{fs/fs}* présentent différents types de profils respiratoires s'échelonnant d'une respiration stable mais de faible fréquence à une respiration de type erratique (Fig. 3d et i). Ceci engendre une forte diminution du volume courant (11.02 ± 0.99 vs 18.8 ± 0.14 $\mu\text{l/g/s}$ chez le contrôle ; t-test, $p < 0.001$) ainsi qu'une forte augmentation du nombre et de la durée des épisodes apnéiques (% d'apnée par enregistrement : 69.55 ± 4.96 , durée moyenne des apnées 11 ± 1.17 secondes ; Fig3. e & f). Suite à la réalisation de tests hypercapniques, aucune adaptation ventilatoire n'est observée (V_E : 11.02 ± 0.99 en normocapnie vs 10.47 ± 0.57 $\mu\text{l/g/s}$ en hypercapnie ; t-test, $p = 0.63$; Fig. 3g) et les mutants finissent par mourir dans l'heure suivant leur naissance malgré la présence d'un preBötC normalement fonctionnel *in vitro* (fréquence des animaux contrôles 13.4 ± 0.96 vs 12.4 ± 1.21 bouffées d'activité par minute chez les mutants *Lbx1^{fs/fs}* ; test de Mann Whitney, $p = 0.58$, Fig. 4).

La stratégie conditionnelle a été appliquée ici aussi afin de mieux cibler l'oscillateur RTN. Pour cela nous avons cherché à exprimer de manière conditionnelle l'allèle *Lbx1^{fs}*. Utilisant le fait que la mutation est hétérozygote, nous avons pu cibler son expression au sein des territoires rhombomériques r3/5 en croisant une lignée transgénique *Krox20^{Cre} ; Lbx1^{fs/+}* avec une lignée *Lbx1^{fllox}*. Ainsi, chez les mutants *Krox20^{Cre} ; Lbx1^{fs/fllox}*, seules les populations neuronales dérivant de r3/5 expriment la protéine Cre-recombinase et peuvent exciser l'allèle sauvage floxé de *Lbx1*, tout en forçant l'expression de l'allèle muté *Lbx1^{fs}*. Cette recombinaison aboutit à l'expression d'une copie de l'allèle frameshift au sein de r3/5.

Dans les autres populations neuronales n'exprimant pas la Cre-recombinase, l'allèle sauvage de *Lbx1* toutes haplosuffisantes permettra de réaliser une complémentation fonctionnelle. Les mutants conditionnels ne présentent aucun RTN fonctionnel au stade E14.5 (Fig. 5 a & b). A la naissance, ces mutants présentent une activité ventilatoire stable et régulière, ayant toutefois une occurrence d'apnée plus importante. (% d'apnée : 10.1 ± 1.7 vs 3.7 ± 0.7 chez les contrôles, t-test , $p = 0.012$; durée des apnées : 3.7 ± 0.2 vs 3.2 ± 0.18 sec chez le contrôles ; t-

RÉSULTATS

test, $p = 0.062$; Fig. 5h & i). Comme pour les mutants $Lbx1^{fs/fs}$, la réalisation de tests hypercapniques n'induit aucune adaptation ventilatoire (V_E : $+2.7 \pm 10.0$, $n = 11$ mutants ; t-test apparié, $p = 0.5$ vs $+57.2 \pm 7.0$, $n = 17$ contrôles ; t-test apparié, $p < 0.001$; Fig. 5 e-g). Par la suite ces animaux survivent et on peut observer une récupération partielle de cette réponse hypercapnique à partir de P9 (V_E : $+39.5 \pm 13.2\%$ ($n=11$; t-test apparié, $p < 0.05$) à P21 et $+50.2 \pm 8.9\%$ (t-test apparié, $p < 0.01$) à P60 ; Fig. 5 j-l).

De manière intéressante, un phénotype respiratoire intermédiaire peut être obtenu lorsque la mutation est restreinte à un sous-domaine neuronal plus large. Ainsi chez les mutants $Phox2b::CreBAC1$ l'expression de l'allèle $Lbx1^{fs}$ est ciblée à l'ensemble du sous-domaine ventral dB2 ($Phox2b::CreBAC1 ; Lbx1^{fs/lox}$). Dans ce contexte, les mutants présentent une respiration plus lente et apnéique (V_E moyen : -24.5% du V_E des animaux contrôles ; % d'apnée : 18.8 ± 7.9 vs $3.3 \pm 1.1\%$ chez les contrôles ; t-test, $p < 0.05$; durée des apnées 4.7 ± 0.4 vs 3.1 ± 0.1 sec chez les contrôles ; t-test, $p < 0.001$; données non montrées et Fig. 6). Ces mutants meurent dans les heures suivant leur naissance, suggérant que chez ces mutants au moins une autre population neuronale possédant un rôle anti-apnéique crucial pour la survie peut être touchée.

Ces résultats démontrent, grâce à l'étude d'une nouvelle mutation humaine causant le développement de la pathologie CCHS, indépendante des effets de l'allèle toxique $Phox2b^{27Ala}$, l'importance du RTN dans la mise en place d'un chémoréflexe au CO_2 à la naissance.

Figure 1

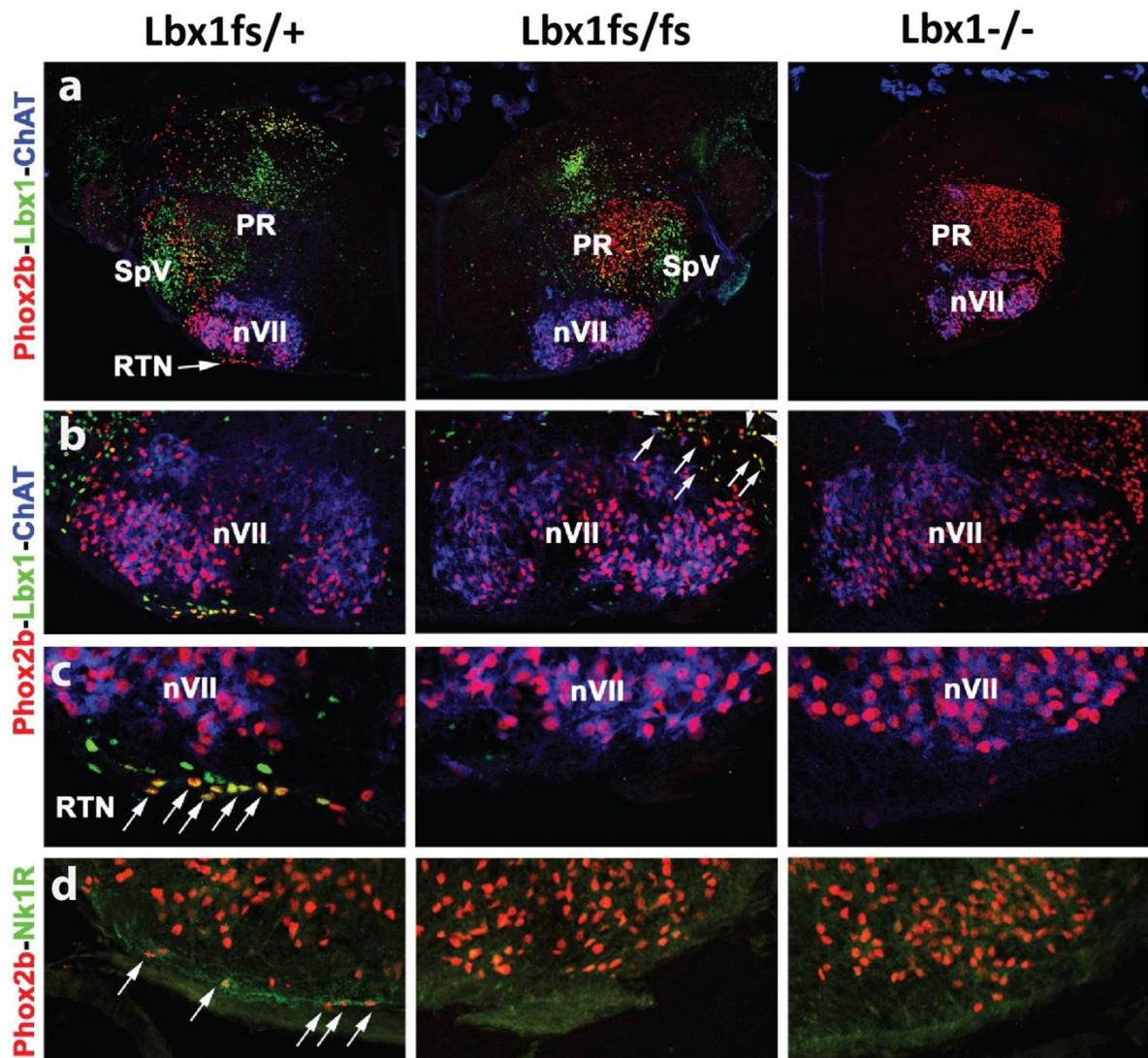


Figure 2

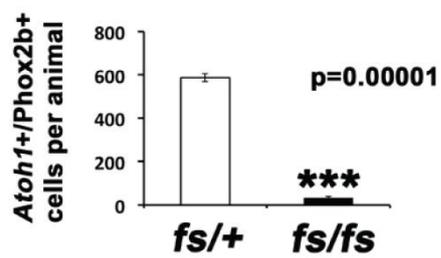
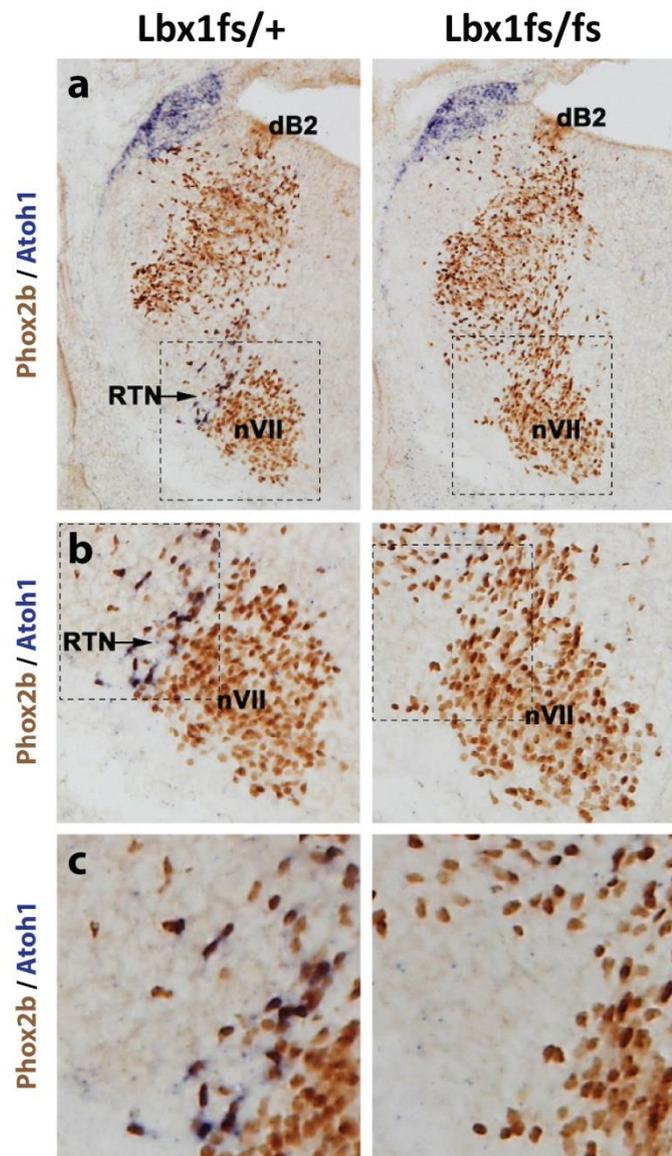


Figure 3

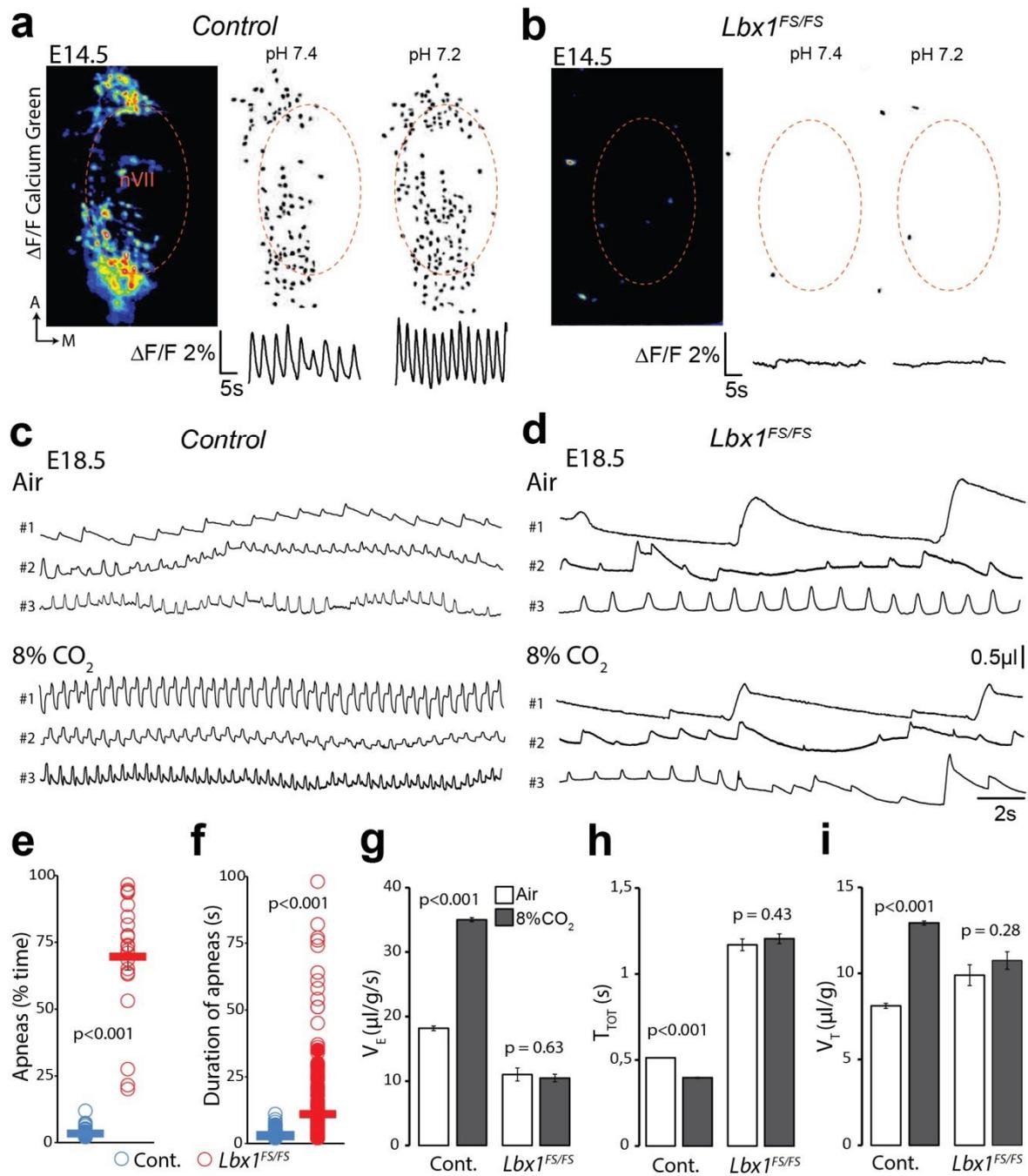


Figure 4

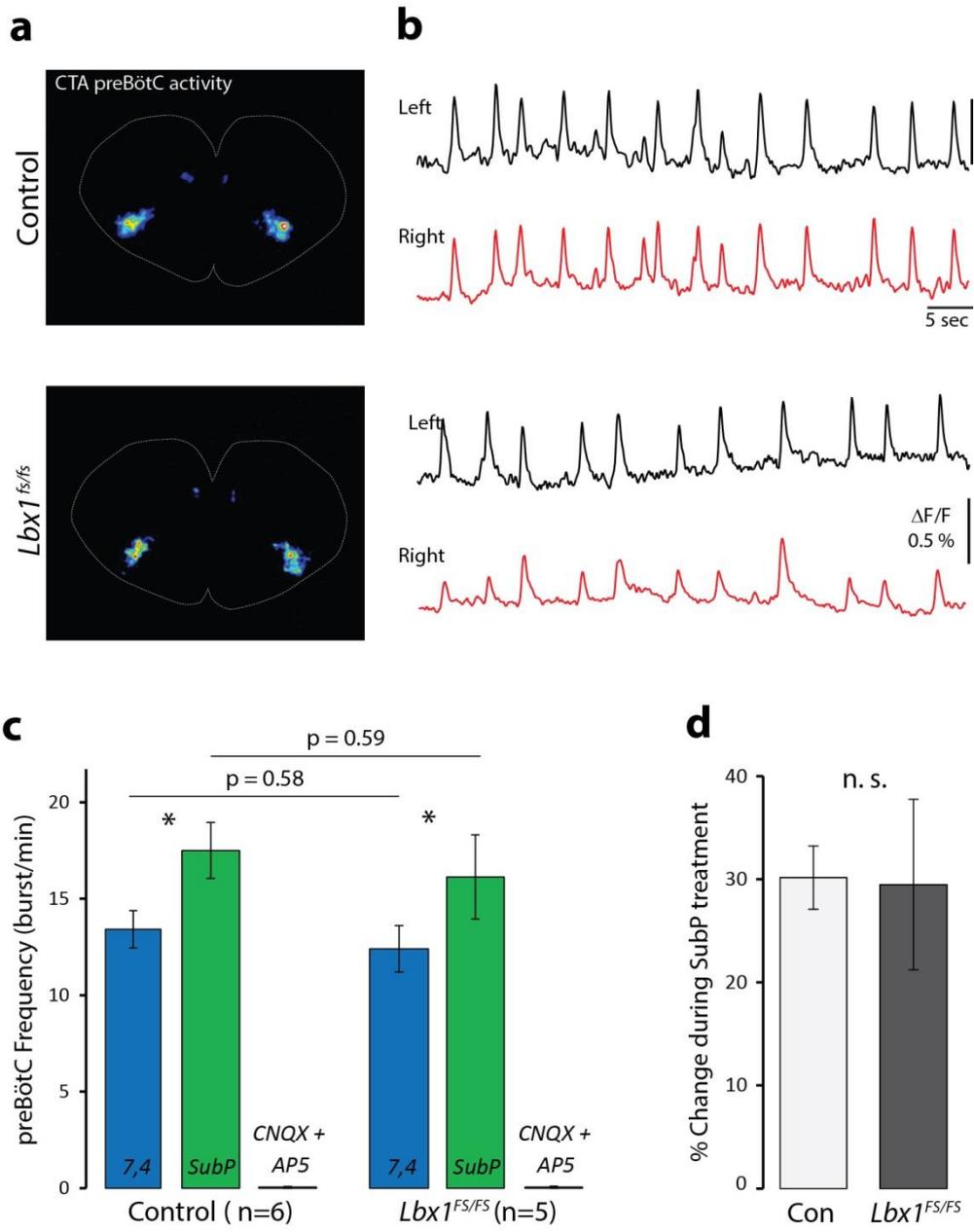


Figure 5

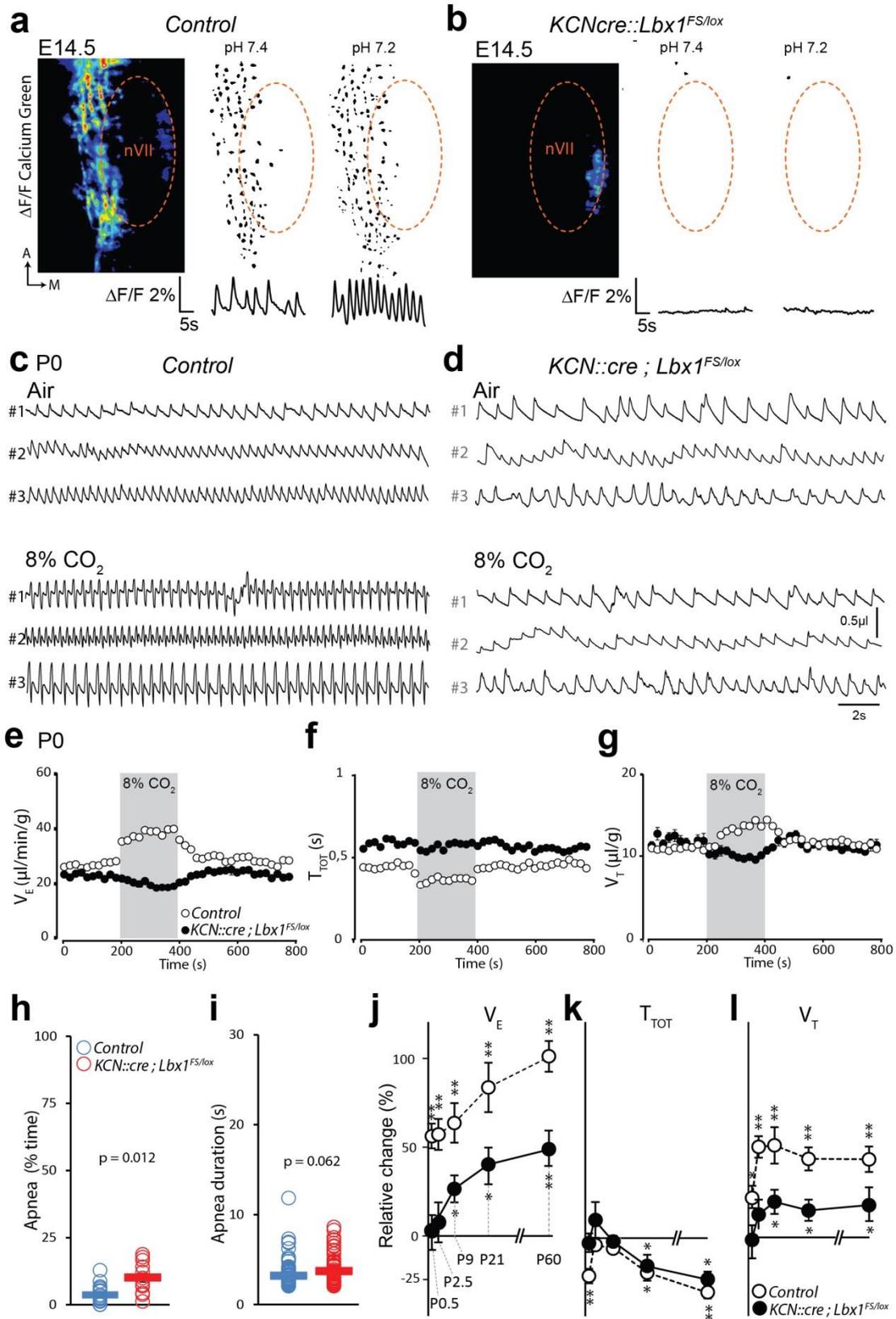
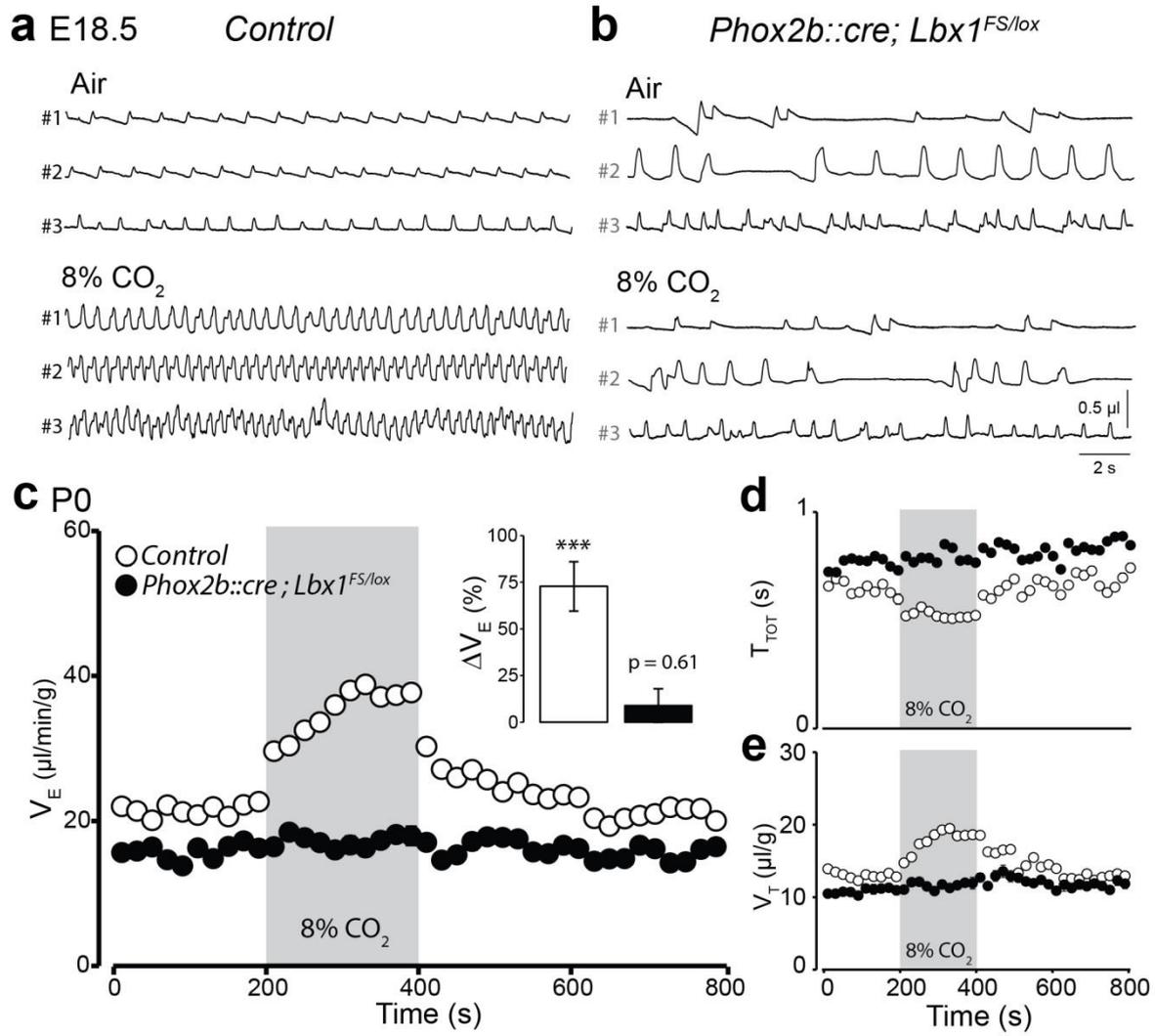


Figure 6



LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : La mutation $Lbx1^{fs/fs}$ induit un défaut migratoire des neurones du RTN provoquant une accumulation ectopique dorsalement au noyau moteur facial. **(a)** Triple marquage immuno-histochimique contre Phox2b (rouge), Lbx1 (vert) et ChAT (bleu) réalisé sur coupes transverses de tronc cérébral au niveau du noyau moteur facial, chez des animaux contrôles ($Lbx1^{fs/+}$) et mutants ($Lbx1^{fs/fs}$ et $Lbx1^{-/-}$, témoin négatif). Nous pouvons observer que contrairement aux mutants nuls les mutants homozygotes pour la mutation fs expriment la protéine LBX1. Chez ces mutants, les principales aires d'expression de Lbx1 semblent préservées et seuls les neurones constitutifs du RTN présentent un phénotype caractérisé par un défaut migratoire. Observation agrandie de la région médullaire ventrale au noyau moteur facial **(b & c)**. Contre-marquage Phox2b (rouge) et Nk1R (vert) des neurones du RTN **(d)**. **nVII** : noyau moteur facial, **SpV** noyau sensorimoteur trigéminal spinal.

Figure 2 : La mutation $Lbx1^{fs/fs}$ bloque l'expression de Atoh1 au sein des cellules précurseurs du RTN. Hybridation *in-situ* dirigée contre Atoh1 (bleu) couplée à un marquage immuno-histochimique de Phox2b (marron) réalisée sur des coupes transverses de tronc cérébral contenant le noyau moteur facial au stade E12. L'expression de la mutation à l'état homozygote empêche l'expression de Atoh1 dans les précurseurs neuronaux du RTN en migration mais pas au sein de la lèvre rhombique (grossissement **b & c**). Quantification du nombre total de neurones Atoh1+/Phox2b+ chez des animaux contrôles (n=4) et mutants (n=4). L'expression de la mutation à l'état homozygote provoque une importante diminution du nombre de neurones co-exprimant ces deux marqueurs ($31,25 \pm 3.94$ vs 588 ± 16.64 chez le contrôle ; t-test, $p < 0.001$).

Figure 3 : Perte des neurones du RTN et de la chémosensibilité centrale au CO_2 chez les mutants $Lbx1^{fs/fs}$. **(a)** Vue ventrale de la surface médullaire centrée au niveau du noyau moteur facial nVII (pointillés) montrant les changements de fluorescence du Calcium Green-1AM ($\Delta F/F$) des cellules RTN chez un embryon contrôle ($Lbx1^{fs/+}$) à E14.5 (à gauche). Cartes présentant les différentes cellules rythmiques du RTN ainsi que l'activité calcique globale du RTN en condition de pH 7.4 et pH 7.2 (à droite). **(b)** Cartes d'activité et tracé calcique populationnel réalisé chez un embryon $Lbx1^{fs/fs}$ attestant de l'absence d'un RTN fonctionnel à

RÉSULTATS

E14.5. Exemples représentatifs d'enregistrements pléthysmographiques réalisés chez des animaux $Lbx1^{fs/+}$ (témoins) et $Lbx1^{fs/fs}$ (mutants) obtenus par césarienne dans des conditions de normocapnie et d'hypercapnie (8% CO₂) (**c** et **d**). Pourcentage de temps d'enregistrement passée en apnée au cours de l'enregistrement (**e**) et durée moyenne des apnées (**f**) enregistrées chez des nouveaux-nés contrôles (symboles bleus, n = 44) et mutants (symboles rouges, n = 21). (**g-i**) Valeurs moyennes de ventilation (V_E, **g**), durées moyennes du cycle respiratoire (T_{tot}, **h**) et volume courant moyen (V_T, **i**) mesurés chez des animaux contrôles (n = 9) et mutants (n = 10) dans des conditions de normocapnie (barres blanches) ou d'hypercapnie (barres grises). Ces données ont été acquises en excluant les périodes d'apnées.

Figure 4 : Le preBötC est actif et fonctionnel chez le mutant $Lbx1^{fs/fs}$. Photomicrographie présentant un moyennage de l'activité calcique mesurée au sein d'une tranche transverse de tronc cérébral contenant le preBötC au stade E15.5 (**a**). Tracés d'imagerie calcique présentant l'activité spontanément enregistrée au sein des preBötC dans un contexte mutant et contrôle (**b**). Chez les mutants $Lbx1^{fs/fs}$, tout comme cela peut être observé chez les animaux contrôles les preBötC sont rythmiquement actifs et bilatéralement synchronisés. (**c**) Graphique présentant l'évolution de la fréquence de décharge spontanée de l'oscillateur preBötC en condition contrôle, suite à l'application de Substance P (SubP) ou d'un cocktail pharmacologique inhibant l'activité au sein du réseau (CNQX + APV). Graphique présentant le % d'augmentation des fréquences enregistrées au sein du preBötC suite à l'application de SubP (**d**).

Figure 5 : Perte des neurones du RTN et de la chémosensibilité centrale au CO₂ chez les mutants $Krox20^{Cre};Lbx1^{fs/lox}$. (**a**) Vue ventrale de la surface médullaire centrée au niveau du noyau moteur facial nVII (pointillés) montrant les changements de fluorescence Calcium Green-1AM ($\Delta F/F$) des cellules RTN chez un embryon contrôle ($Lbx1^{fs/+}$) à E14.5 (à gauche). Cartes présentant les différentes cellules rythmiques du RTN ainsi que l'activité calcique populationnelle en condition de pH 7.4 et pH 7.2 (à droite). (**b**) Cartes d'activités et tracé calcique populationnel réalisé chez un embryon $Krox20^{Cre};Lbx1^{fs/lox}$ attestant de l'absence d'un RTN fonctionnel à E14.5. Exemples représentatifs d'enregistrements pléthysmographiques réalisés chez des animaux $Lbx1^{fs/+}$ (témoins) et $Krox20^{Cre};Lbx1^{fs/lox}$ (mutants) au stade P0 dans des conditions de normocapnie et d'hypercapnie (8% CO₂) (**c** et **d**). (**e-g**) Perte de la chémosensibilité centrale au CO₂ chez les mutants $Krox20^{Cre};Lbx1^{fs/lox}$. Graphiques montrant l'évolution des différents paramètres respiratoires V_E (**e**) ; T_{TOT} (**f**) et V_T (**g**) au cours du temps

dans des conditions de normocapnie et d'hypercapnie (8% CO₂) (zone grisée). Pourcentage de temps d'enregistrement passés en apnée au cours de l'enregistrement (**h**) et durée moyenne des apnées (**i**) enregistrées chez des nouveaux-nés contrôles (symboles bleus, n = 20) et mutants (symboles rouges, n = 12). (**j-l**) Evolution des paramètres respiratoires, V_E (**j**) ; T_{TOT} (**k**) et V_T (**l**) lors de la réalisation d'un test hypercapnique à P0.5 (N=17 ; n=11), P2.5 (N_{contrôles} =24 ; n_{mutants}=9), P9 (N=11 ; n=6), P21 (N=21 ; n=11) and P60 (N=21 ; n=11). Les données présentées ont été obtenus après exclusion des périodes d'apnées.

Figure 6 : Perte des neurones du RTN et de la chémosensibilité centrale au CO₂ chez les mutants *Phox2b::Cre;Lbx1^{fs/lox}*. (**a & b**) Exemples représentatifs d'enregistrements pléthysmographiques de nouveaux-nés contrôles (**a**) et mutants (**b**) au stade E18,5 en normocapnie ou hypercapnie (8 % de CO₂). (**c-e**) Perte de la chémosensibilité centrale au CO₂ chez les nouveaux-nés *Phox2b::CreBAC1;Lbx1^{fs/lox}*. Graphique présentant les valeurs moyennes de ventilation V_E (**c**), T_{TOT} (**d**) et V_T (**e**) avant, pendant et après l'exposition à 8 % de CO₂ dans un context contrôle (cercle vide, n=10) et mutant (cercle noirs, n= 9).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion

Dans ce travail, nous avons disséqué le chémoréflexe central en étudiant les propriétés anatomiques et fonctionnelles *in vitro* chez l'embryon, et *in vivo* chez l'animal postnatal, de modèles génétiques murins - perte et gain de fonction - ciblant le RTN. Les interventions réalisées contribuent à une définition de l'identité moléculaire des neurones du RTN, utilisée ensuite pour mieux en discerner les implications fonctionnelles. Nos résultats démontrent que le RTN contrôle les fréquences, du rythme respiratoire fictif chez l'embryon, de la ventilation en normoxie à la naissance, et qu'il joue à ce stade un rôle crucial dans le chémoréflexe.

Nos travaux démontrent que le RTN est réductible à une sous-population de neurones dB2 (*Phox2b*⁺/*Lbx1*⁺) destinée à exprimer le facteur de transcription *Atoh1* requis pour le contrôle de sa migration. Les pertes de fonction, de *Atoh1* dans les neurones *Phox2b*⁺, de *Phox2b* dans les neurones *Atoh1*⁺ ou la mise au silence de ces neurones glutamatergiques, par invalidation de *VGlut2* dans les neurones *Phox2b*⁺/*Atoh1*⁺, conduisent toutes à la perte du chémoréflexe. L'identification des déficits incrimine la population cellulaire originellement ciblée par la transposition de la mutation humaine 27Ala associée au CCHS chez la souris. Cette congruence est étendue ici à une autre mutation humaine originale, diagnostique du CCHS, une mutation « frameshift » au locus *Lbx1*, qui récapitule chez la souris, les traits phénotypiques exclusifs précédemment identifiés. Notre expérimentation basée sur une logique moléculaire du développement du RTN se trouve en quelque sorte validée par « les expériences naturelles » que constituent les mutations humaines.

La co-expression de *Phox2b* et *Lbx1* qui définit les neurones dB2 apparaît, par nos travaux, pointer les acteurs d'une interaction moléculaire spécifique, dont l'une des conséquences, l'expression de *Atoh1*, est suffisante pour faire émerger à E12.5, au niveau du facial, le RTN mais aussi un système péri-trigeminal qui ne semble pas impliqué dans la chémoception et dont la fonction est inconnue à ce jour. D'origines antéro-postérieures distinctes, les neurones du RTN et du periV correspondent à des « homologues segmentaires ». La déficience du RTN est un facteur causal probable du CCHS, mais ne peut seule, a fortiori en présence de suppléances fonctionnelles mises en place à la naissance, que ce travail

permet de révéler, expliquer la létalité des formes sévères de ce syndrome. Celle-ci repose vraisemblablement sur le déficit additionnel d'une autre population de neurones dB2. Le *periV* est un candidat plausible et les conséquences de sa seule altération, ou associée à celle du RTN, doivent maintenant être étudiées pour en apprécier éventuellement le caractère aggravant.

1. Le RTN, acteur central du chémoréflexe au CO₂

Un ensemble de critères incluant l'anatomie des neurones du RTN (*Onimaru et al., 2012 ; Mulkey et al., 2004*), leurs projections au sein du réseau neuronal respiratoire (*Thoby-Brisson et al., 2009 ; Abbott et al., 2009 ; Tan et al., 2010 ; DePuy et al., 2011*), leur sensibilité intrinsèque au pH (*Mulkey et al., 2004 ; Wang et al., 2013 ; Onimaru et al., 2008*) suggère un rôle majeur du RTN dans la chémoeception centrale. Cependant, cette hypothèse fait l'objet d'un débat persistant (*Huckstepp & Dale, 2011 ; Nattie et al., 2011, Teran et al., 2014*). L'obtention d'arguments les plus sélectifs possibles à l'appui de l'implication du RTN dans ce rôle a été recherché dans cette thèse.

Des études antérieures avaient permis de générer différents mutants du gène *Phox2b* constitutifs (*Phox2b^{27Ala}* ; *Dubreuil et al., 2008*) ou conditionnels nuls sur la base de l'historique d'expression de *Krox20* ou de *Lbx1* (*Dubreuil et al., 2009*) compromettant la mise en place anatomo-fonctionnelle du RTN et présentant un chémoréflexe central abrogé.

Aucune de ces mutations n'était entièrement sélective du RTN, la mutation *Phox2b^{27Ala}* cible en principe l'ensemble des neurones *Phox2b⁺* centraux et périphériques. Les mutations conditionnelles de délétion, *Krox20^{Cre} ; Phox2b^{lox/lox}* éliminant les neurones *Phox2b⁺* dérivants de r3 et r5, ou *Lbx1^{Cre} ; Phox2b^{lox/lox}* ceux du domaine dB2, conduisaient aux mêmes déficits fonctionnels, l'absence de réponse respiratoire en milieu hypercapnique et la mort par détresse ventilatoire des animaux à la naissance, mais engendraient des pertes larges de neurones *Phox2b⁺*. Par contre, ces deux mutants conditionnels avaient, comme cibles communes, les neurones dB2 qui dérivent de r3 et r5 et qui incluent le RTN.

Ainsi, au point de départ de mes travaux de thèse, certains éléments du débat semblaient acquis : (i) les neurones *Phox2b* du domaine dB2 dérivants des rhombomères 3 et 5 apparaissaient absolument essentiels à la présence anatomique du RTN et à l'établissement fonctionnel du chémoréflexe central ; et (ii) les neurones appartenant à un certain nombre de structures candidates à la médiation du chémoréflexe étaient incapables de compenser le

phénotype respiratoire létal. Ces structures, préservées chez ces mutants sont : les neurones 5HT et les neurones du preBötC, toutes deux ne dépendant pas de *Phox2b*, et les neurones du Locus Coeruleus et du NTS, qui ne dérivent pas de précurseurs *Lbx1*⁺. Ces résultats indiquaient aussi que si ces systèmes jouaient bien le rôle qu'une partie de la littérature leur prêtait, alors leur action était peut être médiée de façon incontournable via le RTN.

Si les traits pathologiques des modèles murins sont dépendants des neurones *Phox2b*⁺ issus de r3 et r5, un niveau de sélectivité supérieur pour l'incrimination du RTN comme un agent causal du déficit adaptatif au CO₂ pouvait provenir de la susceptibilité de ses cellules vis-à-vis de la mutation *Phox2b*^{27Ala}. En utilisant une lignée dans laquelle l'expression de la mutation *Phox2b*^{27Ala} est conditionnée par l'action d'une protéine Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de *Krox20* (mutants *Krox20*^{Cre} ; *Phox2b*^{27AlaCKI}) (Publication1) nous avons pu confirmer l'association de la perte anatomique du RTN et l'absence de chémocoception à la naissance. Nos investigations chez l'embryon révélèrent l'absence du RTN à E14.5 et une fréquence anormalement faible du rythme des décharges respiratoires du nerf phrénique dans les conditions de contrôle à E16.5 qui restait inchangée malgré l'acidification du milieu extracellulaire, deux conséquences attendues de la perte du RTN. A la naissance, les animaux mutants étaient complètement insensibles au CO₂. A ce stade, les populations cellulaires susceptibles d'être à l'origine des troubles respiratoires en dehors du RTN étaient restreintes non plus à l'ensemble des neurones dB2 dérivants de r3 et r5 mais à la fraction d'entre eux sensibles à la mutation 27Ala comprenant le RTN. Cette fraction n'a, par ailleurs, jamais été quantifiée. Cependant, par analogie avec le mutant constitutif *Phox2b*^{27Ala}, nous pouvions supposer qu'elle devait être assez limitée. Une nouvelle stratégie d'approche a alors été élaborée. Celle-ci se base sur notre découverte antérieure (*Dubreuil et al ; 2009*), et conjointement avec une autre étude du laboratoire d'Huda Zoghbi (*Rose et al., 2009*), de l'expression par les neurones du RTN du facteur de transcription *Atoh1*. Plus précisément, nous mettions en évidence que près de 85% des neurones *Phox2b*⁺/*Vglut2*⁺ de la région du RTN exprimaient *Atoh1* alors que la quasi-totalité (99%) des neurones *Atoh1*⁺ de cette même région possédaient la double signature *Phox2b*⁺/*Vglut2*⁺.

Une étude des mutants *Atoh1* nuls avait montré leur incapacité respiratoire à la naissance, leur rapide cyanose et leur mort précipitée (*Rose et al., 2009*). Nous avons revisité et augmenté ces expériences. Nous avons montré que le RTN n'est jamais mis en place chez les mutants *Atoh1* nuls et que le chémoréflexe (jamais testé par Rose et al) était absent chez ces mutants délivrés par césarienne la veille de leur naissance. A l'instar de *Phox2b*, *Atoh1* est

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

exprimé par une pléiade de structures proprioceptives (*Bermingham et al., 1999, 2001 ; Ben Arie et al., 1997*) et ces résultats valaient plus par la démonstration d'un nouveau facteur de transcription susceptible d'être utilisé pour invalider la fonction du RTN que pour un quelconque progrès quant à l'identité de la structure responsable du déficit chémoceptif.

Ainsi, la meilleure manière d'augmenter la sélectivité à la fois des mutations *Phox2b* et d'*Atoh1*, vis à vis du RTN, a été de concevoir une approche génétique basée sur leur intersection. Sans insister ici sur l'élégance des outils mis en place, ceux-ci permettaient de tester l'association ou invalidation du RTN / invalidation du chémoréflexe ou par trois approches indépendantes (i) une perte d'*Atoh1* restreinte aux neurones *Phox2b*, (ii) une perte de *Phox2b* restreinte aux neurones *Atoh1*, et (iii) une perte de *Vglut2* restreinte aux neurones *Phox2b⁺/Atoh1⁺*. Les résultats, obtenus chez l'embryon, démontrent que les neurones *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* de la région du RTN sont rythmiques, sensibles à l'acidose et sont nécessaires et suffisants pour l'entraînement, par optogénétique, du nerf phrénique, trois signatures du développement fonctionnel des neurones du RTN. Les trois génotypes intersectionnels qui ciblent les neurones *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* du RTN et en invalident la formation ou en bloquent la transmission glutamatergique conduisent à l'abolition des réponses ventilatoires au CO₂ à la naissance. Finalement, une nouvelle mutation humaine récessive associée au CCHS, étudiée ici, n'affectant pas le gène *Phox2b* mais le gène *Lbx1* (mutation *Lbx1^{fs/fs}*), dont la co-expression avec *Phox2b* définit les neurones dB2, conduit au constat d'une double abrogation du RTN et du chémoréflexe. De façon spectaculaire, les restrictions conditionnelles d'expression de cette mutation *Lbx1^{fs}* au sein de r3/5 (via *Krox20^{Cre}*) ou de dB2 (*Phox2b::CreBAC1*) conduisent aux mêmes déficits, mimant en cela la mutation *Phox2b^{27Ala}*.

L'ensemble de ces résultats fournit les meilleurs arguments actuellement disponibles à l'appui du rôle crucial du RTN dans la mise en place d'une réponse ventilatoire adaptée en réponse à des challenges hypercapniques à la naissance.

Deux hypothèses non mutuellement exclusives, restent ouvertes quant au rôle du RTN dans ce processus physiologique. Les neurones *Phox2b^{on}/Atoh1^{on}* du RTN pourraient (i) former le principal chémosenseur central du CO₂ (ii) agir comme une structure relai *nécessaire* assurant l'intégration de l'ensemble des informations chémosensibles vers le CPG respiratoire ou les deux.

Il est à présent bien établi que les neurones du RTN sont intrinsèquement chémoceptifs. Ils peuvent réagir *in vivo* à de faibles variations de pH/CO₂ même suite à un blocage génétique (*Wallen MacKenzie et al., 2006*) ou pharmacologique de la transmission synaptique (*Mulkey et al., 2004 ; Onimaru et al., 2008* voir également revue *Guyenet et al., 2008, 2014*). Ces propriétés sont préservées *in vitro* (*Dubreuil et al., 2009*) même après dissociation (*Wang et al., 2013*). Anatomiquement ces neurones sont localisés en proximité directe des vaisseaux sanguins médullaires, une position favorable à la détection de variations de PaCO₂ sanguine (*Onimaru et al., 2012, 2014*). Du point de vue moléculaire des mécanismes de transduction du signal, l'implication des canaux potassiques TASK2 a pu être mise en évidence (*Gestreau et al., 2010, Bayliss et al., 2014*). Ces canaux TASK2 ne constituent pas pour autant un mécanisme exclusif, ni non plus ubiquitaire au sein du RTN (*Wang et al., 2013*) et agissent sans doute de concert avec d'autres mécanismes senseurs impliquant des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *P Guyenet, communication personnelle*).

Il est aussi connu que le RTN est la cible de nombreuses afférences neuronales en provenance de chémocepteurs périphériques (*Takakura et al., 2006*), centraux (*Rosin et al., 2006 ; Hilaire et al., 2004*) et astrocytaires (*Gourine et al., 2010*). Ces afférences peuvent stimuler l'activité du RTN (*Mulkey et al., 2007 ; Ott et al., 2011 ; Forster et al., 2000 ; Smith et al., 2006*).

Des expériences permettant d'éclaircir ces questions seront évoquées dans la partie « perspectives ».

Avant de discuter les principaux résultats de ce travail et d'aborder quelques perspectives en découlant, il faut ici d'abord insister sur les « ruptures » introduites par nos études dans le domaine. Parmi ces ruptures, la moindre, concerne un désaccord avec une étude existante sur un mutant conditionnel *Phox2b :: CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}* réalisée par Huang et al. et publiée dans *Neuron* en 2012. La seconde plus profonde concerne la survie des mutants *Krox20 ; Phox2b^{27AlaCKI}* en l'absence de chémoception au CO₂ qui nous permettra d'aborder les mécanismes de compensation et de récupération mis en place respectivement à la naissance et plus tardivement au cours de la vie postnatale.

2. Ruptures scientifiques

2.1- Rupture avec l'étude de Huang et al. 2012.

La liste des génotypes conduisant à l'observation du continuum temporel des trois signatures fonctionnelles associées à une perte du RTN (i) un ralentissement *in vitro* chez l'embryon du rythme respiratoire fictif, (ii) une absence totale ou considérablement diminuée de l'augmentation de la fréquence de ce rythme suite à l'acidification du milieu extracellulaire, et (iii) une dépression respiratoire insensible au CO₂ à la naissance, est dorénavant longue. Elle inclue les mutants constitutifs *Phox2b*^{27Ala/+}, *Lbx1*^{fs/fs}, *Atoh1 nul*, les mutants conditionnels *Krox20*^{Cre}; *Phox2b*^{lox/lox}, *Lbx1*::*Cre*; *Phox2b*^{lox/lox}, *Krox20*^{Cre}; *Phox2b*^{27AlaCKI}, *Krox20*^{Cre}; *Lbx1*^{fs/lox}, *Atoh1*^{FRTCre}; *Phox2b*^{lox/lox}, *Atoh1*^{FRTCre}; *Phox2b*::*FLPo*; *Vglut2*^{lox/lox}, *Phox2b*::*CreBAC1*; *Atoh1*^{lox/lox}, tous étudiés dans notre laboratoire et la plupart dans le cadre de mon travail de thèse. Cette belle homogénéité de résultat est en désaccord avec une étude de Huang et al. publiée dans *Neuron* en 2012, la première décrivant la perte de fonction d'*Atoh1* dans les neurones *Phox2b* (dernier mutant de la liste ci-dessus). Ces auteurs décrivaient certes que cette mutation conditionnelle menait à l'abrogation anatomique du RTN et chez l'embryon à E16.5 au ralentissement du rythme, mais étonnement, rapportaient une réponse à l'acidification totalement préservée à ce stade. Plus tardivement, ils observaient sur des préparations néonatales un rythme déprimé en fréquence et finalement constataient une déficience partielle du chémoréflexe chez l'adulte. Ces résultats semblaient montrer la maintenance d'un chémoréflexe chez l'embryon malgré la déficience du RTN d'une part, et d'autre part, que la perte partielle du chémoréflexe chez l'adulte découlait de détériorations secondaires et tardives d'un système neuronal *Phox2b*⁺, autre que le RTN, et dont la nature restait à définir. Ces conclusions remettaient donc en question les travaux menés dans un ensemble de laboratoires, dont le mien, pourvoyeurs d'arguments à l'appui du rôle crucial du RTN.

Il y a de bonnes raisons de maintenant considérer illégitime ce désaveu du rôle du RTN dans le chémoréflexe. Dans cette étude, qui utilise une lignée *Phox2b*::*Cre* différente de la nôtre, le chémoréflexe n'a, singulièrement, pas été testé à la naissance chez les souriceaux. Or nos expériences y démontrent l'absence totale de réponse hypercapnique. Ainsi, la déficience partielle qu'ils rapportaient n'est pas la conséquence d'une détérioration tardive d'un chémoréflexe, présent chez l'embryon et supposé maintenu à la naissance mais, au

contraire, comme en témoignent nos résultats, le fruit d'une récupération fonctionnelle qui n'est que partielle chez l'adulte.

Reste à comprendre la divergence dans les résultats des deux études concernant la sensibilité préservée au pH du rythme chez l'embryon à E16.5 dans l'étude de Huang et al. et notre constat de son altération. Cette divergence a probablement une cause génétique. Il est probable que la recombinaison via la lignée *Phox2b::Cre* utilisée par Huang et al. soit plus tardive que celle conditionnée par la nôtre. En effet, chez les mutants *Atoh1^{ΔFRTCre}*; *Phox2b^{lox/lox}*, pour lesquels l'expression de la Cre conditionnée par Atoh1 n'est activée qu'à partir de E12.5 (deux jours plus tard que l'activation de la Cre via Phox2b) les défauts de la réponse à l'acidose que nous attestons sont modestes à E16.5 puis deviennent dramatiques à la naissance et sont conformes à l'attrition anatomique progressive constatée du RTN au cours du développement chez ce mutant. Il est donc très probable que les divergences, dans les résultats et leurs interprétations, trouvent leurs fondements dans le caractère *hypomorphe* du mutant conditionnel étudié par Huang et ses collègues.

2.2- Rupture avec un dogme de la physiologie respiratoire

L'ensemble des modèles décrivant le contrôle respiratoire postule que le rythme produit par le générateur central requiert des entrées excitatrices parmi lesquelles celle sensible au CO₂ joue un rôle crucial (*Phillipson et al., 1981* ; *Takakura et al., 2008* ; *Guyenet et al., 2009*). Des citations paraphrasant le dogme centenaire selon lequel la PaCO₂ est le moteur essentiel de la respiration, abondent dans la littérature récente (*Spyer and Gourine., 2009* ; *Blain et al., 2010*). Notre travail a en effet permis d'observer plusieurs mutants présentant un phénotype léthal respiratoire à la naissance chez lesquels la sensibilité au CO₂ était totalement compromise. En revanche, nos travaux ont aussi permis de révéler que cette association attendue n'était pas obligatoire. Nous avons démontré que les mutants *Krox20^{Cre}*; *Phox2b^{27AlaCKI}* et *Krox20^{Cre}*; *Lbx1^{fs/lox}*, chez lesquels le RTN et le chémoréflexe sont tous deux absents à la naissance, sont viables et fertiles. Nous montrons qu'une perte complète du chémoréflexe central est compatible avec l'établissement d'une ventilation adéquate permettant le maintien d'une homéostasie gazeuse et de manière plus globale, la survie des animaux. Ainsi nos travaux ne soutiennent pas l'idée que la chémosensibilité au CO₂ soit indispensable à la respiration. Des cas similaires de survie en absence d'afférences centrales liées au CO₂ ont pu être décrits chez le rat au cours des premiers jours post-nataux (*Serra et al., 2001*, *Stunden et al., 2001*) mais ces résultats restent débattus (*Wickström et al.,*

2002). Une telle absence de réactivité au CO₂ chez la souris n'avait jamais été rapportée (Renolleau *et al.*, 2001). Chez l'homme, une forte hypocapnie induit des apnées pendant le sommeil mais pas pendant la veille en raison de l'existence d'une influence énigmatique qui semble pallier celle due au CO₂ (Dempsey, 2005 ; Duffin 2010).

Chez ces mutants qui survivent, des mécanismes de compensations sont fonctionnels à la naissance et une récupération partielle de la chémosensibilité au CO₂ est observée plus tardivement chez l'adulte.

3. Perte du chémoréflexe : compensation et récupération

Quels mécanismes permettent à ces mutants de respirer et de maintenir une PaCO₂ normale en l'absence des entrées excitatrices CO₂-sensibles du RTN ? Une exacerbation de l'activité des corps carotidiens sensibles à l'hypoxie est probable. En effet, l'inhibition de ces afférences suite à une chémodénervation physiologique (respiration en oxygène pur) (Dejours 1962 ; Hertzberg *et al.*, 1990 ; Blain *et al.*, 2010) fait apparaître chez le mutant *Krox20^{Cre} ; Phox2b^{27AlaCKI}* une respiration de type apnéique. Ces résultats, comparables aux observations effectuées chez des animaux ventilés artificiellement (Boden *et al.*, 1998 ; Takakura *et al.*, 2008), montrent que la perte de l'ensemble des afférences chémosensibles (O₂ et CO₂) provoque un arrêt respiratoire. Ces conclusions sont donc en accord avec l'idée selon laquelle le fonctionnement du CPG respiratoire requiert les activités excitatrices afférentes en provenance des chémosenseurs du CO₂ mais aussi de l'O₂. Les corps carotidiens ne sont pas les seuls chémoccepteurs impliqués dans l'adaptation à un environnement hypoxique. Il existe une chémosensibilité centrale à l'hypoxie qui implique différentes structures du tronc cérébral identifiées par expression de *c-fos* ou de facteurs inductibles par l'hypoxie (Voituron *et al.* 2006 ; Pascual *et al.*, 2001). Les régions cérébrales impliquées sont multiples, mais il est important de noter l'activation par l'hypoxie de la surface ventrale du tronc cérébral : l'expression de *c-fos* à proximité du RTN/pFRG induite par un test hypoxique semble résulter d'une sensibilité directe des neurones à l'hypoxie, qui persiste quand la transmission synaptique est bloquée. L'ensemble de ces structures pourraient contribuer à la compensation ventilatoire, qui semble suffisante au maintien d'une valeur normale de la PaCO₂ chez les mutants à la naissance. Il est aussi probable que d'autres mécanismes liés à des régulations métaboliques de la rétention des ions bicarbonate ou d'excrétion d'acide par les reins puissent prendre part à cette compensation (Widener *et al.*, 1986).

Si les corps carotidiens sont plus actifs alors qu'ils contribuent aussi, du moins partiellement, à la sensibilité au CO₂ (*Forster et al., 2000*) comment se fait-il que les mutants ne présentent, aux stades périnataux, aucune réponse aux stimulations hypercapniques ? Il a été montré que le RTN répond fortement à la stimulation des corps carotidiens (*Takakura et al., 2006*) et il est vraisemblable que l'absence de réponse au CO₂ pourrait simplement résulter de ce que le RTN constitue un relai obligatoire pour celle-ci. Dès lors il faut imaginer qu'il en soit autrement pour les afférences O₂-sensibles et que celles-ci contournent le RTN et projettent à d'autres étages du générateur central respiratoire. De tels circuits de projections en direction de la medulla caudale ont été décrits (*Finley et Katz, 1992*). Dans une étude récente (*Basting et al., 2015*) du groupe de Patrice Guyenet, il est mis en évidence, en mesurant le degré d'hypoventilation induit par photo-inhibition sélective des neurones du RTN, que lors d'une hyperoxie, le RTN est activé ce qui maintient la respiration malgré l'inactivation des corps carotidiens. Inversement, lors d'une hypoxie hypocapnique, les corps carotidiens sont stimulés et accélèrent la respiration sans faire intervenir le RTN. Il est possible que ces voies existantes se trouvent renforcées chez ces mutants.

Au cours de la maturation postnatale de ces mutants, une récupération de la réponse à l'hypercapnie est observée qui reste partielle (40%), faisant du RTN l'un des contributeurs majeurs de la réponse hypercapnique chez l'adulte. Les systèmes assurant cette récupération ne sont pas connus. On peut ici invoquer les contributions éventuelles des nombreux autres sites chémosensibles au CO₂ (*Nattie et al., 2009 ; 2011*). Parmi ceux-ci, les neurones sérotoninergiques, démontrés insensibles aux variations de pH à la naissance avant de le devenir pleinement chez l'animal juvénile sont des candidats attractifs (*Wang et Richerson 1999, Corcoran et al., 2009*). Incidemment, c'est aussi peut être le cas des cellules gliales chémosensibles localisées au voisinage du RTN qui semblent agir chez le rat postnatal en stimulant le RTN (*Gourine et al., 2010*). Ces régulations pourraient par la suite faire intervenir d'autres circuits chez l'adulte (*Wenker et al., 2010*). Enfin, la supposition que le RTN soit une structure sur laquelle convergerait l'ensemble des autres systèmes chémosensibles au CO₂, dont l'absence empêcherait l'action, n'est peut-être valable que chez l'embryon et pendant une période courte de la vie postnatale.

4. Le periV : un homologue segmentaire, non-chémoceptif (?), requis pour la survie ?

Les stratégies intersectionnelles *Phox2b/Atoh1* récapitulent uniquement deux petits groupes de neurones dans le système nerveux central : le RTN et le periV.

Le concept selon lequel le rhombencéphale se développe par des « variations sur une base segmentaire » (*Lumsden et Keynes, 1989*) plutôt que sur l'unicité de chaque segment a été étayé par de nombreux arguments répertoriant la répétition de types neuronaux décrits par leur anatomie (*Metcalfe et al., 1985; Clarke and Lumsden, 1993* ; voir *Lumsden 1990* pour une revue). De longue date la différenciation des neurones branchiomoteurs sur une base répétée de deux segments a été mise en évidence et complétée ultérieurement par l'établissement de leur identité moléculaire en relation avec la compréhension des conditions de leur neurogenèse (*Pattyn et al., 2000, 2003*). Les neurones du RTN et du periV présentent une même signature moléculaire *Phox2b⁺/Atoh1⁺*, une position anatomique immédiatement voisine de neurones branchiomoteurs, respectivement, du V et du VII et émergent du groupe d'interneurones dB2 (*Phox2b⁺/Lbx1⁺*) et ne s'en distinguent que par une expression sélective, à E12.5, d'*Atoh1*.

La nouvelle lignée *Atoh1^{FRTCre};Phox2b::FLPo* sélective des cellules du RTN et du periV doit permettre l'expression Cre-dépendante du rapporteur afin d'optimiser le recueil des échantillons pour des études futures de transcriptomique. La comparaison des transcriptomes de cellules des RTN et periV sauvages et exprimant conditionnellement, par exemple la mutation *Lbx1fs/fs* (génotype *Atoh1^{FRTCre};Phox2b::FLPo ; Lbx1^{fs/lox}; TdTomato*) doit, éclairer les bases moléculaires du déficit fonctionnel, permettre la découverte de profils d'expression qui leur seraient spécifiques et de corrélats moléculaires de l'interaction *Lbx1/Phox2b* conditionnant l'activation sélective d'*Atoh1* et les définit comme des exemples patents d'interneurones « homologues ». Même si le rhombomère originel du periV reste inconnu, il est clairement distinct (non récapitulé par recombinaison avec *Krox20^{Cre}*) de celui (vraisemblablement r5) dont émerge le RTN. La nature dB2 du periV indique qu'il n'est pas originaire de r1 (dans lequel les dB2 n'existent pas), son origine probable en r2 est actuellement recherchée (voir Perspectives). Dans tous les cas, ces neurones sont donc des exemples patents d'« homologues segmentaires » dont il conviendra d'apprécier s'ils déclinent aussi des propriétés fonctionnelles comparables ou s'ils appartiennent à des réseaux susceptibles d'une quelconque convergence fonctionnelle. Notons ici, qu'au moins l'expression d'*Atoh1* requise pour la migration des neurones du RTN n'est pas un trait

conservé par les neurones du periV qui se déploient normalement chez les mutants *Phox2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox}*.

De plus, le periV n'est sans doute pas impliqué dans le chémoréflexe central à la naissance. Deux arguments indirects étayaient cette hypothèse : (i) la perte constatée des réponses ventilatoires au CO₂, *in vitro* et *in vivo*, chez les mutants *Krox20^{Cre};Phox2b^{27AlaCKI}* qui conservent un periV intact (Publication1) ; et (ii) la conservation du chémoréflexe central à E16.5 après élimination du periV par des sections (Publication 2, Figure2). En tout état de cause, si des expériences futures parvenaient à lui démontrer des propriétés chémosensibles, le periV serait à placer parmi l'ensemble des structures (NTS, A5 , LC, preBötC) qui malgré leurs maintenance et rôle chémosensible proposés, sont incapables de suppléer le déficit du RTN à la naissance en vertu peut-être de leur obligatoire convergence sur celui-ci.

En revanche, il n'est pas impossible, et ceci demandera une investigation dédiée (voir Perspectives), que le periV ait un rôle fonctionnel dont l'altération puisse mettre en danger la survie des individus à la naissance. Une liste désormais fournie de génotypes porteurs de mutations constitutives des gènes *Phox2b*, *Atoh1* et *Lbx1*, ou de mutations conditionnelles résultant de leurs multiples intersections, conduit à un phénotype partagé par tous les mutants, une perte anatomique et fonctionnelle du RTN chez l'embryon et du chémoréflexe à la naissance. Ces mutations, en revanche, engagent différemment le pronostic vital des mutants. Ainsi, il apparaît clairement que la létalité ne résulte pas de la seule perte de la chémoception au CO₂.

Les mutations létales à la naissance *Phox2b^{27Ala+}* et *Lbx1^{fs/fs}*, lorsqu'elles sont restreintes aux cellules dérivant de r3 et de r5 par recombinaison avec *Krox20^{Cre}*, abrogent certes le chémoréflexe, mais n'entraînent plus la mort des individus, en d'autres termes, la létalité ne s'explique pas par le seul déficit de neurone dB2 de r3 et r5 comprenant le RTN. D'autres neurones sensibles à ces mutations en provenance d'autres origines sont donc nécessairement impliqués. Or, nous avons montré que les mutations *Phox2b^{27Ala/+}* et *Lbx1^{fs/fs}* n'entraînent pas d'effets délétères ubiquitaires au sein respectivement des neurones *Phox2b⁺* et *Lbx1⁺*. Bien au contraire, et pour des raisons non encore expliquées, elles ciblent sélectivement le RTN et le periV sans doute en lien avec la signature moléculaire *Phox2b⁺/Lbx1⁺/Atoh1⁺* qui leur est exclusive. Il est tentant de proposer que le caractère léthal de ces mutations apparait lorsque celles-ci affectent de concert le RTN et le periV. Des arguments en ce sens ont été obtenus, la survie à la naissance des mutants

Phox2b::CreBAC1;Atoh1^{lox/lox} chez lesquels le periV ne semble pas affecté, est bien meilleure que celle des mutants *Atoh1^{ΔFRTCre};Phox2^{blox/lox}* chez lesquels à la fois le periV et le RTN sont abrogés. En outre, les mutants *Atoh1^{FRTCre};Phox2b::FLPo;Vglut2^{lox/lox}* chez lesquels la libération synaptique de glutamate est invalidée à la fois dans les neurones du RTN et du periV, ne sont pas viables.

5. Pathologies respiratoires et traitements

La correction des troubles du contrôle neural de la respiration exigera une compréhension des circuits neuronaux impliqués dans la genèse et la robustesse du rythme respiratoire et dans le chémoréflexe central (c'est-à-dire l'hyperventilation en réponse à l'hypercapnie). Notre travail établit le rôle d'un groupe d'interneurones bulbaires, le « noyau rétrotapezoïde », dans le chémoréflexe au CO₂ et l'accélération du rythme respiratoire autour de la naissance. Le RTN a émergé comme candidat pour ces deux rôles grâce à de nombreux travaux récents, dont les nôtres, inspirés par la symptomatologie respiratoire du syndrome d' Ondine (apnées et abrogation du chémoréflexe) et son gène causal, le facteur de transcription *Phox2b*, exprimé dans le RTN. Ces neurones perçoivent le CO₂ *in vivo*, et peuvent accélérer le rythme respiratoire, également *in vivo*, ce qui les met dans une position idéale pour relancer la respiration au cours des apnées centrales. Cette propriété pourrait être au cœur de tous les troubles respiratoires du sommeil. Deuxièmement, le RTN est rythmique à la naissance et probablement rythmogénique au sens où il augmente la fréquence du rythme spontané du principal oscillateur respiratoire, le preBötC chez l'embryon et celle du rythme respiratoire en normoxie chez l'adulte (*Basting et al., 2015*). Cette seconde propriété pourrait être pertinente pour les apnées du prématuré. Une confirmation du rôle obligatoire du RTN dans le chémoréflexe est apportée ici par de nouveaux modèles génétiques murins, mettant à mal les théories dites de « chémosensibilité distribuée », et légitimant la recherche de moyens de le manipuler chez l'homme dans une visée thérapeutique intéressant les deux principaux défis de santé publique impliquant les troubles respiratoires centraux : ceux du nouveau-né prématuré et ceux liés au sommeil.

Les moyens de ces manipulations chez l'homme me restent très obscurs mais il semble raisonnable de capitaliser sur une partie des résultats de cette thèse pour progresser au moins dans la définition du RTN chez l'homme. L'identification de *Rudzinski et Kapur* réalisée en 2010, basée sur le marqueur *Phox2b*, reste sommaire, et de nouvelles études considérant *Lbx1* ou *Atoh1* devraient permettre de mieux définir cette structure. Une approche

ontogénétique chez l'homme est peut-être aussi envisageable puisque environ 10% des parents de patients CCHS sont porteurs de la mutation de façon mosaïque (*Trochet et al., 2005*). La détection de couples présentant des risques de récurrence en cas de grossesse a déjà conduit à des cas d'IVG. L'accès à ces fœtus permettrait par comparaison à des fœtus contrôles du même âge de tester l'existence d'hypoplasies éventuelles dans les régions candidates associées à la perte de ces marqueurs.

Des mutations conduisant à une expansion poly-alanine (polyA) de la protéine Phox2b sont diagnostiques de la majorité des CCHS. Des expansions polyA dans d'autres protéines sont considérées causales de neuf autres maladies génétiques (*Amiel et al., 2004*) et la formation d'agrégats de ces protéines anormales est postulée en être le mécanisme causal. Par analogie avec la maladie polyQ (*Albrecht and Mundlos, 2005*), le coupable réel pourrait prendre la forme d'oligomères toxiques plutôt que d'agrégats. Il pourrait être envisagé de questionner l'existence de la formation de ces agrégats en amont de la perte cellulaire du RTN qu'ils semblent conditionner. Ceci pourrait être mené par la recherche d'une localisation cytoplasmique anormale, peut-être sous forme de larges agrégats, de la protéine Phox2b mutante normalement nucléaire, par usage des anticorps Phox2b utilisés dans cette étude dont il est connu qu'il savent reconnaître les formes polyA expansée de Phox2b (*Trochet et al., 2005*). Une absence complète de localisation nucléaire suggérerait que la protéine mutante engage la protéine sauvage dans la formation d'agrégats conformément à l'effet dominant négatif décrit de ces mutations.

Les résultats de cette thèse démontrent que le RTN doit être considéré comme un composant obligatoire de la chémoreception centrale du CO₂ qui influence la respiration pour assurer l'homéostasie. Cependant, les effets d'une hypercapnie plus prononcée ne se limitent pas à une modification du rythme ventilatoire. Ainsi les attaques de panique induite par l'hypercapnie (*Feinstein et al., 2013*) constituent un comportement complexe qui implique les circuits de l'anxiété, et le contrôle de la vigilance et des phases de sommeil. D'une façon générale, on sait que l'inhalation de CO₂ favorise une sensation d'étouffement et de peur (*Wemmie et al., 2011 ; Colasanti et al., 2008 ; Preter M & Klein DF, 2008*). De très fortes quantités de CO₂ (35%) peuvent donc provoquer des attaques de panique, tout particulièrement chez des sujets pathologiques présentant une prédisposition particulière à l'anxiété (*Preter & Klein 2008 ; Rassovsky & Kushner, 2003*). Les cibles chémosensibles impliquées sont multiples : il s'agit en particulier du centre de la peur, l'amygdale, où l'expression du canal membranaire ASIC1a rend les neurones capables de détecter le CO₂ et

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

l'acidose pour induire des comportements de peur (*Ziemann AE, 2009*). Cependant, l'étude des patients présentant une lésion bilatérale de l'amygdale montre bien que d'autres chémosenseurs sont impliqués (*Feinstein et al. 2013*): lors des attaques de panique, le CO₂ engage aussi probablement le RTN et les projections vers le diencéphale et le cortex insulaire (*Damasio A, 2003 ; Khalsa et al., 2009*) et les composantes neurovégétatives, en particulier le complexe solitaire (voir *P. Branchereau Thèse de Doctorat 1992*) dont on notera qu'il exprime *Phox2b*.

De plus différentes régions ont été localisées et trouvées sensibles au CO₂ par cartographie de l'expression du gène *c-fos* (*Teppema et al., 1997*). Il en a résulté l'hypothèse d'un contrôle suprapontique de la respiration (*Horn & Waldrop, 1998*) qui pouvait faire intervenir cette sensibilité au CO₂. Ainsi, les neurones de la substance grise périaqueducule sont sensibles *in vitro* à une hypercapnie (*Kramer & Nolan, 1999*) et modulent la réponse ventilatoire hypercapnique (*Lopes et al., 2012*).

La prise en compte de régions autres que le RTN pour le traitement des patients CCHS paraît évidente. Une piste actuelle pour le traitement est d'agir sur les récepteurs à la progestérone. On a rapporté en effet le cas de deux femmes adultes CCHS qui avaient récupéré la chémosensibilité au CO₂ après traitement contraceptif oral par une progestine, le désogestrel (*Straus et al., 2010*). La progestérone et ses métabolites sont connus depuis plusieurs années pour leur action sur différentes structures cérébrales (*Schumacher et al., 2007*) et leur influence facilitatrice sur la commande respiratoire, chez l'homme le chat ou le rat (*Baylis et al., 1987*). Cette action facilitatrice de la progestérone sur la respiration fait intervenir la chémosensibilité et en particulier un effet sur la réponse respiratoire centrale à l'hypoxie (*Pascual et al., 2002 ; Lefter & Morency, 2007*). Il était raisonnable de penser que l'amélioration des patientes CCHS résulte d'une stimulation des régions chémosensibles à l'O₂ et au CO₂ par les récepteurs de la progestérone. Cette stimulation a été retrouvée chez le rat et vérifiée *in vitro* sur des cerveaux isolés placés en acidose métabolique. Des expériences de transection montrent que le(s) site(s) cérébral (-aux) impliqué(s) est (sont) supramédullaires. (*Loiseau et al., 2014*). Ces expériences montrent bien que si l'implication du RTN dans le CCHS est claire, il est important de considérer le rôle d'autres structures cérébrales susceptibles d'offrir des voies d'accès potentielles pour le traitement.

Perspectives

1. La souris *Atoh1FRTcre ;Phox2b::FLPo* un nouvel outil pour des questions en suspens

Une série convergente d'arguments anatomiques, moléculaires et fonctionnels légitime une continuité structurale au cours du développement de la prise en charge de la chémoception centrale, par l'epF de façon fictive chez l'embryon, par le pFRG à la naissance et par le RTN chez l'adulte. D'un point de vue strict, ceci reste à démontrer.

Le génotype double conditionnel *Atoh1FRTcre ;Phox2b::FLPo* pour l'expression de l'enzyme Cre-recombinase, constitue une avancée significative en fournissant actuellement le moyen d'accès génétique le plus sélectif à la manipulation des neurones du RTN par des vecteurs viraux Cre-dépendants. La caractérisation menée depuis plusieurs années par le laboratoire du Professeur Patrice Guyenet, à l'université de Virginie, sur le rôle du RTN chez l'adulte, a beaucoup fait usage de vecteurs lentiviraux exprimant un promoteur artificiel répondant à Phox2, PRSx8, en fait un multimère d'un élément répondant à Phox2-(a ou b) (*Hwang et al., 2005 ; Duale et al., 2007 ; Abbott et al., 2009*). L'unicité du critère *Phox2b* régulant, dans ce cas, l'expression génétique virale et les proximités anatomiques du RTN avec les neurones *Phox2b*⁺ cathécholaminergiques de C1, laisse ouverte la possibilité que les effets d'interventions médiées par ce système, reposant sur des injections stéréotaxiques, ne soient pas spécifiques du RTN. Ceci ne sera plus le cas avec le double critère *Phox2b*⁺/*Atoh1*⁺. Des séries expérimentales chez l'adulte faisant usage des souris *Atoh1FRTcre ;Phox2b::FLPo* sont déjà planifiées (pour partie en collaboration avec le groupe de P. Guyenet).

2. Place du RTN dans le chémoréflexe

La place du RTN comme senseur principal du CO₂ comme relai obligatoire d'autres systèmes chémosensibles ou les deux, doit pouvoir être tranchée. Des évidences (non encore publiées) existent concernant le mécanisme complémentaire des canaux TASK2 (*Bayliss et al., 2014*) dans les cellules du RTN qui participeraient à la transduction du signal d'acidose.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Un type particulier de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) est sans doute impliqué, le GPR4 (*P. Guyenet, communication personnelle*) un GPCR sensible au proton. La démonstration d'une hypothétique perte complète de chémoception en relation avec la perte additionnelle de GPR4 dans les cellules du RTN chez des mutants viables TASK2 nuls (*Gestreau et al., 2010*) apporterait la preuve formelle de ce mécanisme. Le recours à notre génotype pour des stratégies perte de fonction des protéines candidates (TASK2, GPR4) par des vecteurs viraux Cre-dépendants exprimant des shRNA est envisageable à court terme. La même technique pourrait aussi être mise à profit pour opérer des pertes de fonction des récepteurs sérotoninergiques par les neurones du RTN permettant ainsi de tester l'existence d'une modulation 5HT chémoréflexe opérant sur le RTN. De même, ce génotype pourra être considéré dans des expériences de traçages monosynaptiques rétrogrades (*Wall et al., 2010*) à partir des neurones du RTN reposant sur des injections d'Adéno-Associated Virus (AAVs) Cre-dépendants qui permettront de valider ou non au sein du connectome présynaptique la présence des autres structures chémoceptives candidates. Ces approches sont aussi applicables à l'étude du periV.

3. Caractérisation du rôle du periV

La caractérisation de la fonction du periV pourra, dans un premier temps, être abordée par des stratégies Cre-dépendantes. Il est envisageable de Cre-recombiner le locus Rosa permettant l'expression de rapporteurs d'activité (GCamp6 (lignée Ai95D du Jackson ; *Chen TW et al. 2013*) ou de rapporteur/actuateur QuasAR2/Optopatch2 (*Hochbaum et al., 2014*)) pour visualiser l'activité du réseau du periV et/ou en perturber l'activité.

Il est urgent d'en connaître l'origine pour ensuite développer des stratégies intersectionnelles, à elles seules sélectives. Des travaux sont en cours pour vérifier son origine probable au sein du r2 à l'aide d'une lignée R2Cre (dans laquelle la Cre est sous le contrôle d'un élément régulateur de l'expression du gène *Hoxa2* en r2 ; collaboration avec le laboratoire Dymecki). Ainsi des génotypes *Atoh1FRTCre ; r2::FLPo* pourront être utilisés pour interférer avec la fonction ou invalider sélectivement le periV. Si l'invalidation du periV conduit à des signes de détresse respiratoire, alors une nouvelle population de neurones génétiquement définie essentielle pour la respiration (en plus du preBötC et du RTN) sera identifiée. Dans le cas inverse, nous serons en mesure de tester directement la possibilité que la létalité émerge de la combinaison des défauts du RTN avec celui du periV. Par leur localisation, un rôle des neurones du periV pourrait être attendu dans le contrôle de

comportements oro-faciaux affectant les voies aériennes supérieures qui doivent être nécessairement coordonnés avec la respiration (*Moore et al., 2014*). Des faillites de coordination de la déglutition, par exemple, de la fermeture de la glotte pendant la tétée pourrait aggraver les déficits respiratoires.

Conclusions

En travaillant à l'interface de la biologie du développement et de la neurophysiologie intégrative, nous tentons d'aborder à l'échelon cellulaire et moléculaire, le contrôle des comportements par le génome. Les régulations moléculaires qui participent à la spécification de divers types neuronaux au cours du développement peuvent inspirer des stratégies d'accès permettant d'en questionner le rôle fonctionnel.

En considérant un comportement relativement simple, la respiration, pour lequel les bases neuronales de la programmation motrice sont déjà bien documentées, nous avons par le passé avec succès décrit l'émergence du générateur principal du rythme respiratoire, le complexe preBötzing, comme constitué d'interneurones V0 dérivant du domaine ventral de progéniteur exprimant le facteur de transcription Dbx1 (*Bouvier et al., 2010*). Ce travail démontrait que Dbx1 était en amont de la spécification de l'ensemble des propriétés fonctionnelles expliquant la genèse du rythme et sa synchronisation bilatérale. Aussi novatrice qu'a été cette étude, l'identité V0 des neurones de la structure est partagée par une multitude de neurones du système nerveux central.

Dans le cas du chémoréflexe qui constitue l'objet de cette thèse, notre étude aboutit à la caractérisation d'une signature moléculaire quasi exclusive des neurones impliqués : les neurones du RTN. Cette signature n'est partagée que par une seule autre population de neurones dans tout le système nerveux central, le periV, aussi localisé dans le tronc cérébral, de nature viscérale en ce qu'il exprime Phox2b, d'origine dB2 en ce qu'il co-exprime Lbx1, et homologue du RTN en ce qu'il exprime de surcroît Atoh1. Le periV en revanche, ne semble pas impliqué dans le chémoréflexe et sa fonction est encore inconnue. Ainsi il n'est pas très étonnant, bien que spectaculaire, que le RTN et le periV apparaissent comme les cibles

exclusives de mutations affectant les facteurs Phox2b et Lbx1 transposées chez la souris, qui chez l'homme sont associées au syndrome CCHS.

En conclusion, il semble possible dans un très proche avenir, de décrire pour la première fois (si ce n'est déjà fait ici) un programme de développement entièrement dédié à la spécification d'un module fonctionnel susceptible d'être réitéré sur une base segmentaire dans le tronc cérébral des mammifères.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Abadie, V., J. Champagnat and G. Fortin. "Branchiomotor Activities in Mouse Embryo." *Neuroreport* 11, no. 1 (2000): 141-5.
- Abbott, S. B., R. L. Stornetta, M. G. Fortuna, S. D. Depuy, G. H. West, T. E. Harris and P. G. Guyenet. "Photostimulation of Retrotrapezoid Nucleus Phox2b-Expressing Neurons in Vivo Produces Long-Lasting Activation of Breathing in Rats." *J Neurosci* 29, no. 18 (2009): 5806-19.
- Abbott, S. B., R. L. Stornetta, C. S. Socolovsky, G. H. West and P. G. Guyenet. "Photostimulation of Channelrhodopsin-2 Expressing Ventrolateral Medullary Neurons Increases Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure in Rats." *J Physiol* 587, no. Pt 23 (2009): 5613-31.
- Abu-Shaweesh, J. M. and R. J. Martin. "Neonatal Apnea: What's New?" *Pediatr Pulmonol.* 43, no. 10 (2008): 937-44.
- Akazawa, C., M. Ishibashi, C. Shimizu, S. Nakanishi and R. Kageyama. "A Mammalian Helix-Loop-Helix Factor Structurally Related to the Product of Drosophila Proneural Gene Atonal Is a Positive Transcriptional Regulator Expressed in the Developing Nervous System." *J Biol Chem* 270, no. 15 (1995): 8730-8.
- Albrecht, A. and S. Mundlos. "The Other Trinucleotide Repeat: Polyalanine Expansion Disorders." *Curr Opin Genet Dev* 15, no. 3 (2005): 285-93.
- Amiel, J., B. Laudier, T. Attié-Bitach, H. Trang, L. de Pontual, B. Gener, D. Torchet, M. Simonneau, M. Vekemans, A. Munnich, C. Gaultier and S. Lyonnet. "Polyalanine Expansion and Frame Shift Mutations of the Paired-Like Homeobox Gene Phox2b in Congenital Central Hypoventilation Syndrome (Ondine's Curse)." *Nature genetics* 33, (2003): 459-461.
- Amiel, J., D. Trochet, M. Clement-Ziza, A. Munnich and S. Lyonnet. "Polyalanine Expansions in Human." *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2, (2004): R235-43.
- Armbruster, B. N., X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze and B. L. Roth. "Evolving the Lock to Fit the Key to Create a Family of G Protein-Coupled Receptors Potently Activated by an Inert Ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, no. 12 (2007): 5163-8.

-B-

- Baker, T. L. and D. J. McGinty. "Reversal of Cardiopulmonary Failure During Active Sleep in Hypoxic Kittens: Implications for Sudden Infant Death." *Science* 198, no. 4315 (1977): 419-421.

- Basting, T. M., P. G. Burke, R. Kanbar, K. E. Viar, D. S. Stornetta, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet. "Hypoxia Silences Retrotrapezoid Nucleus Respiratory Chemoreceptors Via Alkalosis." *J Neurosci* 35, no. 2 (2015): 527-43.
- Baumgarten R. Von and Kansow, E. "The Interaction of Two Types of Inspiratory Neurons in the Tractus Solitarius Of the Cat. ." *Arch. Ital. Biol* 96, (1958): 361-373.
- Bayliss, D. A., J. Barhanin, C. Gestreau and P. G. Guyenet. "The Role of Ph-Sensitive Task Channels in Central Respiratory Chemoreception." *Pflugers Arch*, (2014).
- Bayliss, D. A., D. E. Millhorn, E. A. Gallman and J. A. Cidlowski. "Progesterone Stimulates Respiration through a Central Nervous System Steroid Receptor-Mediated Mechanism in Cat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, no. 21 (1987): 7788-92.
- Bayliss, D. A., E. M. Talley, J. E. Sirois and Q. Lei. "Task-1 Is a Highly Modulated Ph-Sensitive 'Leak' K(+) Channel Expressed in Brainstem Respiratory Neurons." *Respir Physiol* 129, no. 1-2 (2001): 159-74.
- Ben-Arie, N., H. J. Bellen, D. L. Armstrong, A. E. McCall, P. R. Gordadze, Q. Guo, M. M. Matzuk and H. Y. Zoghbi. "Math1 Is Essential for Genesis of Cerebellar Granule Neurons." *Nature* 390, no. 6656 (1997): 169-72.
- Benarroch, E. E. "Brainstem Respiratory Chemosensitivity: New Insights and Clinical Implications." *Neurology* 68, no. 24 (2007): 2140-3.
- Benarroch, E. E. "Brainstem Respiratory Control: Substrates of Respiratory Failure of Multiple System Atrophy." *Mov Disord.* 22, no. 2 (2007): 155-61.
- Benarroch, E. E. and F. L. Chang. "Central Autonomic Disorders." *J Clin Neurophysiol* 10, no. 1 (1993): 39-50.
- Bermingham, N. A., B. A. Hassan, S. D. Price, M. A. Vollrath, N. Ben-Arie, R. A. Eatock, H. J. Bellen, A. Lysakowski and H. Y. Zoghbi. "Math1: An Essential Gene for the Generation of Inner Ear Hair Cells." *Science* 284, no. 5421 (1999): 1837-41.
- Bermingham, N. A., B. A. Hassan, V. Y. Wang, M. Fernandez, S. Banfi, H. J. Bellen, B. Fritsch and H. Y. Zoghbi. "Proprioceptor Pathway Development Is Dependent on Math1." *Neuron* 30, no. 2 (2001): 411-22.
- Bevan, A. T., A. J. Honour and F. H. Stott. "Direct Arterial Pressure Recording in Unrestricted Man." *Br Heart J* 31, no. 3 (1969): 387-8.
- Bianchi, A. L. "[Localization and Study of Respiratory Medullary Neurons. Antidromic Starting by Spinal Cord or Vagal Stimulation]." *J Physiol (Paris)* 63, no. 1 (1971): 5-40.

BIBLIOGRAPHIE

- Bianchi, A. L., M. Denavit-Saubie and J. Champagnat. "Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties, and Neurotransmitters." *Physiol Rev* 75, no. 1 (1995): 1-45.
- Bielle, F., A. Griveau, N. Narboux-Neme, S. Vigneau, M. Sigrist, S. Arber, M. Wassef and A. Pierani. "Multiple Origins of Cajal-Retzius Cells at the Borders of the Developing Pallium." *Nat Neurosci* 8, no. 8 (2005): 1002-12.
- Blain, G. M., C. A. Smith, K. S. Henderson and J. A. Dempsey. "Peripheral Chemoreceptors Determine the Respiratory Sensitivity of Central Chemoreceptors to Co(2)." *J Physiol* 588, no. Pt 13 (2010): 2455-71.
- Blessing, W.W. "Anatomy of the Lower Brainstem." In *The Lower Brainstem and Bodily Homeostasis*, edited by W.W. Blessing, 29-99. New York, Oxford: Oxford University Press, 1997.
- Blessing, W.W. *The Lower Brainstem and Bodily Homeostasis*. 1 ed. New York London: Oxford University Press, 1997.
- Boden, A. G., M. C. Harris and M. J. Parkes. "Apneic Threshold for Co2 in the Anesthetized Rat: Fundamental Properties under Steady-State Conditions." *J Appl Physiol* (1985) 85, no. 3 (1998): 898-907.
- Bonifazi, P., M. Goldin, M. A. Picardo, I. Jorquera, A. Cattani, G. Bianconi, A. Represa, Y. Ben-Ari and R. Cossart. "Gabaergic Hub Neurons Orchestrate Synchrony in Developing Hippocampal Networks." *Science* 326, no. 5958 (2009): 1419-24.
- Borday, C., V. Abadie, F. Chatonnet, M. Thoby-Brisson, J. Champagnat and G. Fortin. "Developmental Molecular Switches Regulating Breathing Patterns in Cns." *Respir Physiol Neurobiol* 135, no. 2-3 (2003): 121-32.
- Borday, C., F. Chatonnet, M. Thoby-Brisson, J. Champagnat and G. Fortin. "Neural Tube Patterning by Krox20 and Emergence of a Respiratory Control." *Respir Physiol Neurobiol* 149, no. 1-3 (2005): 63-72.
- Borday, C., L. Wrobel, G. Fortin, J. Champagnat, C. Thaeon-Antono and M. Thoby-Brisson. "Developmental Gene Control of Brainstem Function: Views from the Embryo." *Prog Biophys Mol Biol* 84, no. 2-3 (2004): 89-106.
- Bouchoucha, Y. X., J. Reingruber, C. Labalette, M. A. Wassef, E. Thierion, C. Desmarquet-Trin Dinh, D. Holcman, P. Gilardi-Hebenstreit and P. Charnay. "Dissection of a Krox20 Positive Feedback Loop Driving Cell Fate Choices in Hindbrain Patterning." *Mol Syst Biol* 9, (2013): 690.
- Bouvier, J., M. Thoby-Brisson, N. Renier, V. Dubreuil, J. Ericson, J. Champagnat, A. Pierani, A. Chedotal and G. Fortin. "Hindbrain Interneurons and Axon Guidance Signaling Critical for Breathing." *Nat Neurosci* 13, no. 9 (2010): 1066-74.

- Bradley, S. R., V. A. Pieribone, W. Wang, C. A. Severson, R. A. Jacobs and G. B. Richerson. "Chemosensitive Serotonergic Neurons Are Closely Associated with Large Medullary Arteries." *Nat Neurosci* 5, no. 5 (2002): 401-2.
- Branchereau. "Mode D'action De La Cholecystochinine Dans Le Complexe Solitaire: Récepteurs, Courants Membranaires Et Synapses Impliquées." (1992).
- Brandes, I. F., E. J. Zuperku, A. G. Stucke, D. Jakovcevic, F. A. Hopp and E. A. Stuth. "Serotonergic Modulation of Inspiratory Hypoglossal Motoneurons in Decerebrate Dogs." *J Neurophysiol* 95, no. 6 (2006): 3449-59.
- Brunet, J.-F. and A. Pattyn. "Phox2 Genes - from Patterning to Connectivity." *Curr Opin Genet Dev* 12, no. 4 (2002): 435-40.
- Brunet JF, Goridis C. "Genetic Basis for Respiratory Control Disorders." C Gauthier (eds), Springer Science + Business Media, LLC, no. 25 (2008).
- Bystrzycka, E., H. Gromysz and A. Huszczuk. "[Studies on the Hering-Breuer Inflation and Deflation Reflex in Rabbits]." *Acta Physiol Pol* 23, no. 4 (1972): 539-55.
- Bystrzycka, E. K. "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, no. 1 (1980): 59-66.
- C-
- Cayetanot, F., F. Gros and N. Larnicol. "Postnatal Changes in the Respiratory Response of the Conscious Rat to Serotonin 2a/2c Receptor Activation Are Reflected in the Developmental Pattern of Fos Expression in the Brainstem." *Brain Res* 942, no. 1-2 (2002): 51-7.
- Champagnat, J. and G. Fortin. "Primordial Respiratory-Like Rhythm Generation in the Vertebrate Embryo." *Trends Neurosci* 20, no. 3 (1997): 119-24.
- Chan, C. S., J. N. Guzman, E. Ilijic, J. N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G. E. Meredith and D. J. Surmeier. "'Rejuvenation' Protects Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease." *Nature* 447, no. 7148 (2007): 1081-6.
- Chatonnet, F., E. D. del Toro, O. Voiculescu, P. Charnay and J. Champagnat. "Different Respiratory Control Systems Are Affected in Homozygous and Heterozygous Kreisler Mutant Mice." *Eur J Neurosci* 15, no. 4 (2002): 684-92.
- Chatonnet, F., E. Dominguez del Toro, M. Thoby-Brisson, J. Champagnat, G. Fortin, F. M. Rijli and C. Thaeron-Antono. "From Hindbrain Segmentation to Breathing after Birth: Developmental Patterning in Rhombomeres 3 and 4." *Mol Neurobiol* 28, no. 3 (2003): 277-94.

BIBLIOGRAPHIE

- Chatonnet, F., M. Thoby-Brisson, V. Abadie, E. Dominguez del Toro, J. Champagnat and G. Fortin. "Early Development of Respiratory Rhythm Generation in Mouse and Chick." *Respir Physiol Neurobiol* 131, no. 1-2 (2002): 5-13.
- Chavrier, P., U. Janssen-Timmen, M. G. Mattei, M. Zerial, R. Bravo and P. Charnay. "Structure, Chromosome Location, and Expression of the Mouse Zinc Finger Gene Krox-20: Multiple Gene Products and Coregulation with the Proto-Oncogene C-Fos." *Mol Cell Biol* 9, no. 2 (1989): 787-97.
- Chavrier, P., M. Zerial, P. Lemaire, J. Almendral, R. Bravo and P. Charnay. "A Gene Encoding a Protein with Zinc Fingers Is Activated During G0/G1 Transition in Cultured Cells." *Embo j* 7, no. 1 (1988): 29-35.
- Chen, R. Z., S. Akbarian, M. Tudor and R. Jaenisch. "Deficiency of Methyl-Cpg Binding Protein-2 in Cns Neurons Results in a Rett-Like Phenotype in Mice." *Nat Genet* 27, no. 3 (2001): 327-31.
- Chen, T. W., T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda and D. S. Kim. "Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity." *Nature* 499, no. 7458 (2013): 295-300.
- Cherniack, N. S. "Respiratory Dysrhythmias During Sleep." *N Engl J Med* 305, no. 6 (1981): 325-30.
- Chow, B. Y., X. Han, A. S. Dobry, X. Qian, A. S. Chuong, M. Li, M. A. Henninger, G. M. Belfort, Y. Lin, P. E. Monahan and E. S. Boyden. "High-Performance Genetically Targetable Optical Neural Silencing by Light-Driven Proton Pumps." *Nature* 463, no. 7277 (2010): 98-102.
- Clarke, J. D. and A. Lumsden. "Segmental Repetition of Neuronal Phenotype Sets in the Chick Embryo Hindbrain." *Development* 118, no. 1 (1993): 151-62.
- Colasanti, A., E. Salamon, K. Schruers, R. van Diest, M. van Duinen and E. J. Griez. "Carbon Dioxide-Induced Emotion and Respiratory Symptoms in Healthy Volunteers." *Neuropsychopharmacology* 33, no. 13 (2008): 3103-10.
- Conlon, R. A. and J. Rossant. "Exogenous Retinoic Acid Rapidly Induces Anterior Ectopic Expression of Murine Hox-2 Genes in Vivo." *Development* 116, no. 2 (1992): 357-68.
- Connelly, C. A., E. G. Dobbins and J. L. Feldman. "Pre-Botzinger Complex in Cats: Respiratory Neuronal Discharge Patterns." *Brain Res* 590, no. 1-2 (1992): 337-40.
- Connelly, C. A., H. H. Ellenberger and J. L. Feldman. "Are There Serotonergic Projections from Raphe and Retrotrapezoid Nuclei to the Ventral Respiratory Group in the Rat?" *Neurosci Lett* 105, no. 1-2 (1989): 34-40.
- Coppola, E., F. d'Autreaux, F. M. Rijli and J. F. Brunet. "Ongoing Roles of Phox2 Homeodomain Transcription Factors During Neuronal Differentiation." *Development* 137, no. 24 (2010): 4211-20.

Corcoran, A. E., M. R. Hodges, Y. Wu, W. Wang, C. J. Wylie, E. S. Deneris and G. B. Richerson. "Medullary Serotonin Neurons and Central Co₂ Chemoreception." *Respir Physiol Neurobiol* 168, no. 1-2 (2009): 49-58.

Coutinho, A. P., C. Borday, J. Gilthorpe, S. Jungbluth, J. Champagnat, A. Lumsden and G. Fortin. "Induction of a Parafacial Rhythm Generator by Rhombomere 3 in the Chick Embryo." *J Neurosci* 24, no. 42 (2004): 9383-90.

Cross, B. A., D. R. Corfield, K. D. Howells, R. P. Stidwill, G. B. Newman and S. J. G. Semple. "Carotid Chemoreceptor Response to Increases in Co₂ Output." *Respiration Physiology* 81, no. 1 (1990): 99-115.

-D-

D'Autreaux, F., E. Coppola, M. R. Hirsch, C. Birchmeier and J. F. Brunet. "Homeoprotein Phox2b Commands a Somatic-to-Visceral Switch in Cranial Sensory Pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, no. 50 (2011): 20018-23.

Damasio, A. "Feelings of Emotion and the Self." *Ann N Y Acad Sci* 1001, (2003): 253-61.

Dauger, S., A. Pattyn, F. Lofaso, C. Gaultier, C. Goridis, J. Gallego and J.-F. Brunet. "Phox2b Controls the Development of Peripheral Chemoreceptors and Afferent Visceral Pathways." *Development* 130, (2003): 6635-6642.

Dejours, P. "Chemoreflexes in Breathing." *Physiol Rev* 42, (1962): 335-58.

del Toro, E. D., V. Borday, M. Davenne, R. Neun, F. M. Rijli and J. Champagnat. "Generation of a Novel Functional Neuronal Circuit in Hoxa1 Mutant Mice." *J Neurosci* 21, no. 15 (2001): 5637-42.

Delcomyn, F. "Neural Basis of Rhythmic Behavior in Animals." *Science* 210, no. 4469 (1980): 492-8.

Dempsey, J. A. "Crossing the Apnoeic Threshold: Causes and Consequences." *Exp Physiol* 90, no. 1 (2005): 13-24.

Dempsey, J. A., S. C. Veasey, B. J. Morgan and C. P. O'Donnell. "Pathophysiology of Sleep Apnea." *Physiol Rev* 90, no. 1 (2010): 47-112.

Depuy, S. D., R. Kanbar, M. B. Coates, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet. "Control of Breathing by Raphe Obscurus Serotonergic Neurons in Mice." *J Neurosci* 31, no. 6 (2011): 1981-90.

Dias, J. M., Z. Alekseenko, J. M. Applequist and J. Ericson. "Tgfbeta Signaling Regulates Temporal Neurogenesis and Potency of Neural Stem Cells in the Cns." *Neuron* 84, no. 5 (2014): 927-39.

BIBLIOGRAPHIE

- Duale, H., H. Waki, P. Howorth, S. Kasparov, A. G. Teschemacher and J. F. Paton. "Restraining Influence of A2 Neurons in Chronic Control of Arterial Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats." *Cardiovasc Res* 76, no. 1 (2007): 184-93.
- Dubreuil, V., N. Ramanantsoa, D. Trochet, V. Vaubourg, J. Amiel, J. Gallego, J. F. Brunet and C. Goridis. "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, (2008): 15.
- Dubreuil, V., N. Ramanantsoa, D. Trochet, V. Vaubourg, J. Amiel, J. Gallego, J. F. Brunet and C. Goridis. "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, no. 3 (2008): 1067-72.
- Dubreuil, V., M. Thoby-Brisson, M. Rallu, K. Persson, A. Pattyn, C. Birchmeier, J. F. Brunet, G. Fortin and C. Goridis. "Defective Respiratory Rhythmogenesis and Loss of Central Chemosensitivity in Phox2b Mutants Targeting Retrotrapezoid Nucleus Neurons." *J Neurosci* 29, no. 47 (2009): 14836-46.
- Duffin, J. "The Role of the Central Chemoreceptors: A Modeling Perspective." *Respir Physiol Neurobiol* 173, no. 3 (2010): 230-43.
- Dupe, V. and A. Lumsden. "Hindbrain Patterning Involves Graded Responses to Retinoic Acid Signalling." *Development* 128, no. 12 (2001): 2199-208.
- Dutschmann, M., C. Menuet, G. M. Stettner, C. Gestreau, P. Borghgraef, H. Devijver, L. Gielis, G. Hilaire and F. Van Leuven. "Upper Airway Dysfunction of Tau-P3011 Mice Correlates with Tauopathy in Midbrain and Ponto-Medullary Brainstem Nuclei." *J Neurosci* 30, no. 5 (2010): 1810-21.
- E-**
- Ericson, J., J. Muhr, M. Placzek, T. Lints, T. M. Jessell and T. Edlund. "Sonic Hedgehog Induces the Differentiation of Ventral Forebrain Neurons: A Common Signal for Ventral Patterning within the Neural Tube." *Cell* 81, no. 5 (1995): 747-56.
- Ericson, J., S. Thor, T. Edlund, T. M. Jessell and T. Yamada. "Early Stages of Motor Neuron Differentiation Revealed by Expression of Homeobox Gene Islet-1." *Science* 256, no. 5063 (1992): 1555-60.
- Erlichman, J. S., A. Hewitt, T. L. Damon, M. Hart, J. Kuraszcz, A. Li and J. C. Leiter. "Inhibition of Monocarboxylate Transporter 2 in the Retrotrapezoid Nucleus in Rats: A Test of the Astrocyte-Neuron Lactate-Shuttle Hypothesis." *J Neurosci* 28, no. 19 (2008): 4888-96.
- Esler, M. and D. Kaye. "Sympathetic Nervous System Activation in Essential Hypertension, Cardiac Failure and Psychosomatic Heart Disease." *J Cardiovasc Pharmacol* 35, no. 7 Suppl 4 (2000): S1-7.

-F-

- Feinstein, J. S., C. Buzza, R. Hurlemann, R. L. Follmer, N. S. Dahdaleh, W. H. Coryell, M. J. Welsh, D. Tranel and J. A. Wemmie. "Fear and Panic in Humans with Bilateral Amygdala Damage." *Nat Neurosci* 16, no. 3 (2013): 270-2.
- Feldman, J. L. "Neurophysiology of Breathing in Mammals." In *Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory System in the in the Brain*, IV, 463-524. Washington DC: Am. Physiol. Soc., 1986.
- Feldman, J. L., G. S. Mitchell and E. E. Nattie. "Breathing: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity." *Annu Rev Neurosci* 26, (2003): 239-66.
- Finley, J. C. and D. M. Katz. "The Central Organization of Carotid Body Afferent Projections to the Brainstem of the Rat." *Brain Res* 572, no. 1-2 (1992): 108-16.
- Fletcher, E. C., J. Lesske, W. Qian, C. C. Miller, 3rd and T. Unger. "Repetitive, Episodic Hypoxia Causes Diurnal Elevation of Blood Pressure in Rats." *Hypertension* 19, no. 6 Pt 1 (1992): 555-61.
- Flora, A., T. J. Klisch, G. Schuster and H. Y. Zoghbi. "Deletion of Atoh1 Disrupts Sonic Hedgehog Signaling in the Developing Cerebellum and Prevents Medulloblastoma." *Science* 326, no. 5958 (2009): 1424-7.
- Forster, H. V., P. Haouzi and J. A. Dempsey. "Control of Breathing During Exercise." *Compr Physiol* 2, no. 1 (2012): 743-77.
- Forster, H. V., L. G. Pan, T. F. Lowry, A. Serra, J. Wenninger and P. Martino. "Important Role of Carotid Chemoreceptor Afferents in Control of Breathing of Adult and Neonatal Mammals." *Respir Physiol* 119, no. 2-3 (2000): 199-208.
- Forster, H. V. and C. A. Smith. "Contributions of Central and Peripheral Chemoreceptors to the Ventilatory Response to Co₂/H⁺." *J Appl Physiol (1985)* 108, no. 4 (2010): 989-94.
- Fortin, G., J. Champagnat and A. Lumsden. "Onset and Maturation of Branchio-Motor Activities in the Chick Hindbrain." *Neuroreport* 5, no. 9 (1994): 1149-52.
- Fortin, G., E. D. del Toro, V. Abadie, L. Guimaraes, A. S. Foutz, M. Denavit-Saubie, F. Rouyer and J. Champagnat. "Genetic and Developmental Models for the Neural Control of Breathing in Vertebrates." *Respir Physiol* 122, no. 2-3 (2000): 247-57.
- Fortin, G., A. S. Foutz and J. Champagnat. "Respiratory Rhythm Generation in Chick Hindbrain: Effects of Mk-801 and Vagotomy." *Neuroreport* 5, no. 9 (1994): 1137-40.

BIBLIOGRAPHIE

- Fortin, G., S. Jungbluth, A. Lumsden and J. Champagnat. "Segmental Specification of Gabaergic Inhibition During Development of Hindbrain Neural Networks." *Nat Neurosci* 2, no. 10 (1999): 873-7.
- Fortuna, M. G., R. L. Stornetta, G. H. West and P. G. Guyenet. "Activation of the Retrotrapezoid Nucleus by Posterior Hypothalamic Stimulation." *J Physiol* 587, no. Pt 21 (2009): 5121-38.
- Fujiyama, T., M. Yamada, M. Terao, T. Terashima, H. Hioki, Y. U. Inoue, T. Inoue, N. Masuyama, K. Obata, Y. Yanagawa, Y. Kawaguchi, Y. Nabeshima and M. Hoshino. "Inhibitory and Excitatory Subtypes of Cochlear Nucleus Neurons Are Defined by Distinct Bhlh Transcription Factors, Ptf1a and Atoh1." *Development* 136, no. 12 (2009): 2049-58.
- Fukuda, Y. and Y. Honda. "Ph-Sensitive Cells at Ventro--Lateral Surface of Rat Medulla Oblongata." *Nature* 256, no. 5515 (1975): 317-8.
- G-**
- Gaultier, C., J. Amiel, S. Dauger, H. Trang, S. Lyonnet, J. Gallego and M. Simonneau. "Genetics and Early Disturbances of Breathing Control." *Pediatr Res* 55, no. 5 (2004): 729-33.
- Gavalas, A., M. Studer, A. Lumsden, F. M. Rijli, R. Krumlauf and P. Chambon. "Hoxa1 and Hoxb1 Synergize in Patterning the Hindbrain, Cranial Nerves and Second Pharyngeal Arch." *Development* 125, no. 6 (1998): 1123-36.
- Gesell, R., J. Bricker and C. Magee. "Structural and Functional Organization of the Central Mechanism Controlling Breathing." *Am J Physiol.* 117, (1936): 423-452.
- Gestreau, C., D. Heitzmann, J. Thomas, V. Dubreuil, S. Bandulik, M. Reichold, S. Bendahhou, P. Pierson, C. Sterner, J. Peyronnet-Roux, C. Benfriha, I. Tegtmeier, H. Ehnes, M. Georgieff, F. Lesage, J. F. Brunet, C. Goridis, R. Warth and J. Barhanin. "Task2 Potassium Channels Set Central Respiratory Co2 and O2 Sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, no. 5 (2010): 2325-30.
- Gonzalez, C., L. Almaraz, A. Obeso and R. Rigual. "Carotid Body Chemoreceptors: From Natural Stimuli to Sensory Discharges." *Physiol Rev* 74, no. 4 (1994): 829-898.
- Gourine, A. V., V. Kasymov, N. Marina, F. Tang, M. F. Figueiredo, S. Lane, A. G. Teschemacher, K. M. Spyer, K. Deisseroth and S. Kasparov. "Astrocytes Control Breathing through Ph-Dependent Release of Atp." *Science* 329, no. 5991 (2010): 571-5.
- Gourine, A. V., E. Llaudet, N. Dale and K. M. Spyer. "Atp Is a Mediator of Chemosensory Transduction in the Central Nervous System." *Nature* 436, no. 7047 (2005): 108-11.
- Gray, P. A., J. A. Hayes, G. Y. Ling, I. Llona, S. Tupal, M. C. Picardo, S. E. Ross, T. Hirata, J. G. Corbin, J. Eugenin and C. A. Del Negro. "Developmental Origin of Prebotzinger Complex Respiratory Neurons." *J Neurosci* 30, no. 44 (2010): 14883-95.

- Gray, P. A., W. A. Janczewski, N. Mellen, D. R. McCrimmon and J. L. Feldman. "Normal Breathing Requires Prebotzinger Complex Neurokinin-1 Receptor-Expressing Neurons." *Nat Neurosci* 4, no. 9 (2001): 927-30.
- Gray, P. A., J. C. Rekling, C. M. Bocchiario and J. L. Feldman. "Modulation of Respiratory Frequency by Peptidergic Input to Rhythmogenic Neurons in the Prebotzinger Complex." *Science* 286, no. 5444 (1999): 1566-8.
- Gross, M. K., M. Dottori and M. Goulding. "Lbx1 Specifies Somatosensory Association Interneurons in the Dorsal Spinal Cord." *Neuron* 34, no. 4 (2002): 535-49.
- Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater. "Atp Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves." *J Neurosci* 19, no. 2 (1999): 520-8.
- Guyenet, P. G. "The 2008 Carl Ludwig Lecture: Retrotrapezoid Nucleus, Co2 Homeostasis, and Breathing Automaticity." *J Appl Physiol (1985)* 105, no. 2 (2008): 404-16.
- Guyenet, P. G. "Regulation of Breathing and Autonomic Outflows by Chemoreceptors." *Compr Physiol* 4, no. 4 (2014): 1511-62.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta and D. A. Bayliss. "Retrotrapezoid Nucleus and Central Chemoreception." *J Physiol* 586, no. 8 (2008): 2043-8.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta and D. A. Bayliss. "Central Respiratory Chemoreception." *J Comp Neurol* 518, no. 19 (2010): 3883-906.

-H-

- Hagglund, M., L. Borgius, K. J. Dougherty and O. Kiehn. "Activation of Groups of Excitatory Neurons in the Mammalian Spinal Cord or Hindbrain Evokes Locomotion." *Nat Neurosci* 13, no. 2: 246-52.
- Haldane, J. S. and J. G. Priestley. "The Regulation of the Lung-Ventilation." *J Physiol* 32, no. 3-4 (1905): 225-66.
- Herbert, H., M. M. Moga and C. B. Saper. "Connections of the Parabrachial Nucleus with the Nucleus of the Solitary Tract and the Medullary Reticular Formation in the Rat." *J Comp Neurol* 293, no. 4 (1990): 540-80.
- Hertzberg, T., S. Hellstrom, H. Lagercrantz and J. M. Pequignot. "Development of the Arterial Chemoreflex and Turnover of Carotid Body Catecholamines in the Newborn Rat." *J Physiol* 425, (1990): 211-25.

BIBLIOGRAPHIE

- Hilaire, G., R. Monteau and S. Errchidi. "Possible Modulation of the Medullary Respiratory Rhythm Generator by the Noradrenergic A5 Area: An in Vitro Study in the Newborn Rat." *Brain Res* 485, no. 2 (1989): 325-32.
- Hilaire, G., J. C. Viemari, P. Coulon, M. Simonneau and M. Bevençut. "Modulation of the Respiratory Rhythm Generator by the Pontine Noradrenergic A5 and A6 Groups in Rodents." *Respir Physiol Neurobiol.* 143, no. 2-3 (2004): 187-97.
- Hilaire, G., J. C. Viemari, P. Coulon, M. Simonneau and M. Bevençut. "Modulation of the Respiratory Rhythm Generator by the Pontine Noradrenergic A5 and A6 Groups in Rodents." *Respir Physiol Neurobiol* 143, no. 2-3 (2004): 187-97.
- Hochbaum, D. R. and Y. Zhao. "All-Optical Electrophysiology in Mammalian Neurons Using Engineered Microbial Rhodopsins." 11, no. 8 (2014): 825-33.
- Hodges, M. R. and G. B. Richerson. "Medullary Serotonin Neurons and Their Roles in Central Respiratory Chemoreception." *Respir Physiol Neurobiol* 173, no. 3 (2010): 256-63.
- Hodges, M. R., G. J. Tattersall, M. B. Harris, S. D. McEvoy, D. N. Richerson, E. S. Deneris, R. L. Johnson, Z. F. Chen and G. B. Richerson. "Defects in Breathing and Thermoregulation in Mice with near-Complete Absence of Central Serotonin Neurons." *J Neurosci* 28, no. 10 (2008): 2495-505.
- Horn, E. M. and T. G. Waldrop. "Suprapontine Control of Respiration." *Respir Physiol* 114, no. 3 (1998): 201-11.
- Huang, W. H., S. Tupal, T. W. Huang, C. S. Ward, J. L. Neul, T. J. Klisch, P. A. Gray and H. Y. Zoghbi. "Atoh1 Governs the Migration of Postmitotic Neurons That Shape Respiratory Effectiveness at Birth and Chemoresponsiveness in Adulthood." *Neuron* 75, no. 5 (2012): 799-809.
- Huckstepp, R. T. and N. Dale. "Redefining the Components of Central Co2 Chemosensitivity-- Towards a Better Understanding of Mechanism." *J Physiol* 589, no. Pt 23 (2011): 5561-79.
- Huckstepp, R. T., R. Eason, A. Sachdev and N. Dale. "Co2-Dependent Opening of Connexin 26 and Related Beta Connexins." *J Physiol* 588, no. Pt 20 (2010): 3921-31.
- Huckstepp, R. T., R. id Bihi, R. Eason, K. M. Spyer, N. Dicke, K. Willecke, N. Marina, A. V. Gourine and N. Dale. "Connexin Hemichannel-Mediated Co2-Dependent Release of Atp in the Medulla Oblongata Contributes to Central Respiratory Chemosensitivity." *J Physiol* 588, no. Pt 20 (2010): 3901-20.
- Huxtable, A. G., J. D. Zwicker, B. Y. Poon, S. Pagliardini, S. Q. Vrouwe, J. J. Greer and G. D. Funk. "Tripartite Purinergic Modulation of Central Respiratory Networks During Perinatal Development: The Influence of Atp, Ectonucleotidases, and Atp Metabolites." *J Neurosci* 29, no. 47 (2009): 14713-25.

Hwang, D. Y., M. M. Hwang, H. S. Kim and K. S. Kim. "Genetically Engineered Dopamine Beta-Hydroxylase Gene Promoters with Better Phox2-Binding Sites Drive Significantly Enhanced Transgene Expression in a Noradrenergic Cell-Specific Manner." *Mol Ther* 11, no. 1 (2005): 132-41.

-J-

Jacquin, T.D., V. Borday, S. Schneider-Maunoury, P. Topilko, G. Ghilini, F. Kato, P. Charnay and J. Champagnat. "Reorganization of Pontine Rhythmogenic Neuronal Networks in *Krox-20* Knock-out Mice." *Neuron* 17, (1996): 747-758.

Jessell, T. M. "Neuronal Specification in the Spinal Cord: Inductive Signals and Transcriptional Codes." *Nat Rev Genet* 1, no. 1 (2000): 20-9.

Jiang, C., A. Rojas, R. Wang and X. Wang. "Co2 Central Chemosensitivity: Why Are There So Many Sensing Molecules?" *Respir Physiol Neurobiol* 145, no. 2-3 (2005): 115-26.

Johnson, P. L., J. H. Hollis, R. Moratalla, S. L. Lightman and C. A. Lowry. "Acute Hypercarbic Gas Exposure Reveals Functionally Distinct Subpopulations of Serotonergic Neurons in Rats." *J Psychopharmacol* 19, no. 4 (2005): 327-41.

-K-

Kanamaru, M. and I. Homma. "Compensatory Airway Dilation and Additive Ventilatory Augmentation Mediated by Dorsomedial Medullary 5-Hydroxytryptamine 2 Receptor Activity and Hypercapnia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, no. 2 (2007): R854-60.

Kawai, A., H. Onimaru and I. Homma. "Mechanisms of Co2/H+ Chemoreception by Respiratory Rhythm Generator Neurons in the Medulla from Newborn Rats in Vitro." *J Physiol* 572, no. Pt 2 (2006): 525-37.

Khalsa, S. S., D. Rudrauf, J. S. Feinstein and D. Tranel. "The Pathways of Interoceptive Awareness." *Nat Neurosci* 12, no. 12 (2009): 1494-6.

Koshiya, N. and J. C. Smith. "Neuronal Pacemaker for Breathing Visualized in Vitro." *Nature* 400, no. 6742 (1999): 360-3.

Kramer, J. M., P. C. Nolan and T. G. Waldrop. "In Vitro Responses of Neurons in the Periaqueductal Gray to Hypoxia and Hypercapnia." *Brain Res* 835, no. 2 (1999): 197-203.

Kubin, L., G. F. Alheid, E. J. Zuperku and D. R. McCrimmon. "Central Pathways of Pulmonary and Lower Airway Vagal Afferents." *J Appl Physiol* 101, no. 2 (2006): 618-27.

-L-

BIBLIOGRAPHIE

- Lanuza, G. M., S. Gosgnach, A. Pierani, T. M. Jessell and M. Goulding. "Genetic Identification of Spinal Interneurons That Coordinate Left-Right Locomotor Activity Necessary for Walking Movements." *Neuron* 42, no. 3 (2004): 375-86.
- Lazarenko, R. M., T. A. Milner, S. D. Depuy, R. L. Stornetta, G. H. West, J. A. Kievits, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet. "Acid Sensitivity and Ultrastructure of the Retrotrapezoid Nucleus in Phox2b-Egfp Transgenic Mice." *J Comp Neurol* 517, no. 1 (2009): 69-86.
- Lefter, R., C. E. Morency and V. Joseph. "Progesterone Increases Hypoxic Ventilatory Response and Reduces Apneas in Newborn Rats." *Respir Physiol Neurobiol* 156, no. 1 (2007): 9-16.
- Lesage, F. "Pharmacology of Neuronal Background Potassium Channels." *Neuropharmacology* 44, no. 1 (2003): 1-7.
- Leung, S.T., V.R. Comondore, C. Ryan, M. and D. Stevens. "Mechanisms of Sleep-Disordered Breathing: Causes and Consequences." *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 463, (2012): 213-230.
- Li, Z., K. F. Morris, D. M. Baekey, R. Shannon and B. G. Lindsey. "Responses of Simultaneously Recorded Respiratory-Related Medullary Neurons to Stimulation of Multiple Sensory Modalities." *J Neurophysiol* 82, no. 1 (1999): 176-87.
- Liem, K. F., Jr., G. Tremml, H. Roelink and T. M. Jessell. "Dorsal Differentiation of Neural Plate Cells Induced by Bmp-Mediated Signals from Epidermal Ectoderm." *Cell* 82, no. 6 (1995): 969-79.
- Lieske, S. P., M. Thoby-Brisson, P. Telgkamp and J. M. Ramirez. "Reconfiguration of the Neural Network Controlling Multiple Breathing Patterns: Eupnea, Sighs and Gasps [See Comment]." *Nat Neurosci* 3, no. 6 (2000): 600-7.
- Lindsay, A. D. and J. L. Feldman. "Modulation of Respiratory Activity of Neonatal Rat Phrenic Motoneurons by Serotonin." *J Physiol* 461, (1993): 213-33.
- Loewy, A. D. and H. Burton. "Nuclei of the Solitary Tract: Efferent Projections to the Lower Brain Stem and Spinal Cord of the Cat." *J Comp Neurol* 181, no. 2 (1978): 421-49.
- Loewy, A. D., J. H. Wallach and S. McKellar. "Efferent Connections of the Ventral Medulla Oblongata in the Rat." *Brain Res* 228, no. 1 (1981): 63-80.
- Loiseau, C., D. Osinski, F. Joubert, C. Straus, T. Similowski and L. Bodineau. "The Progestin Etonogestrel Enhances the Respiratory Response to Metabolic Acidosis in Newborn Rats. Evidence for a Mechanism Involving Supramedullary Structures." *Neurosci Lett* 567, (2014): 63-7.

- Lopes, L. T., L. G. Patrone, K. C. Bicego, N. C. Coimbra and L. H. Gargaglioni. "Periaqueductal Gray Matter Modulates the Hypercapnic Ventilatory Response." *Pflugers Arch* 464, no. 2 (2012): 155-66.
- Lorier, A. R., A. G. Huxtable, D. M. Robinson, J. Lipski, G. D. Housley and G. D. Funk. "P2y1 Receptor Modulation of the Pre-Botzinger Complex Inspiratory Rhythm Generating Network in Vitro." *J Neurosci* 27, no. 5 (2007): 993-1005.
- Lumsden, A. "The Cellular Basis of Segmentation in the Developing Hindbrain." *Trends Neurosci* 13, no. 8 (1990): 329-35.
- Lumsden, A. and R. Keynes. "Segmental Patterns of Neuronal Development in the Chick Hindbrain." *Nature* 337, no. 6206 (1989): 424-8.
- Lumsden, A. and R. Krumlauf. "Patterning the Vertebrate Neuraxis." *Science* 274, no. 5290 (1996): 1109-15.
- Lundin, L. G. "Evolution of the Vertebrate Genome as Reflected in Paralogous Chromosomal Regions in Man and the House Mouse." *Genomics* 16, no. 1 (1993): 1-19.

-M-

- Madisen, L., T. Mao, H. Koch, J. M. Zhuo, A. Berenyi, S. Fujisawa, Y. W. Hsu, A. J. Garcia, 3rd, X. Gu, S. Zanella, J. Kidney, H. Gu, Y. Mao, B. M. Hooks, E. S. Boyden, G. Buzsaki, J. M. Ramirez, A. R. Jones, K. Svoboda, X. Han, E. E. Turner and H. Zeng. "A Toolbox of Cre-Dependent Optogenetic Transgenic Mice for Light-Induced Activation and Silencing." *Nat Neurosci* 15, no. 5 (2012): 793-802.
- Madisen, L., T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein and H. Zeng. "A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain." *Nat Neurosci* 13, no. 1 (2010): 133-40.
- Magosso, E. and M. Ursino. "A Mathematical Model of Co2 Effect on Cardiovascular Regulation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, no. 5 (2001): H2036-52.
- Manzanares, M., S. Cordes, L. Ariza-McNaughton, V. Sadl, K. Maruthainar, G. Barsh and R. Krumlauf. "Conserved and Distinct Roles of Kreisler in Regulation of the Paralogous Hoxa3 and Hoxb3 Genes." *Development* 126, no. 4 (1999): 759-69.
- Manzanares, M., S. Cordes, C. T. Kwan, M. H. Sham, G. S. Barsh and R. Krumlauf. "Segmental Regulation of Hoxb-3 by Kreisler." *Nature* 387, no. 6629 (1997): 191-5.
- Manzanares, M., J. Nardelli, P. Gilardi-Hebenstreit, H. Marshall, F. Giudicelli, M. T. Martinez-Pastor, R. Krumlauf and P. Charnay. "Krox20 and Kreisler Co-Operate in the Transcriptional Control

BIBLIOGRAPHIE

- of Segmental Expression of Hoxb3 in the Developing Hindbrain." *Embo j* 21, no. 3 (2002): 365-76.
- Marin, F. and P. Charnay. "Hindbrain Patterning: Fgfs Regulate Krox20 and Mafb/Kr Expression in the Otic/Preotic Region." *Development* 127, no. 22 (2000): 4925-35.
- Marina, N., A. P. Abdala, S. Trapp, A. Li, E. E. Nattie, J. Hewinson, J. C. Smith, J. F. Paton and A. V. Gourine. "Essential Role of Phox2b-Expressing Ventrolateral Brainstem Neurons in the Chemosensory Control of Inspiration and Expiration." *J Neurosci* 30, no. 37 (2010): 12466-73.
- Marissal, T., P. Bonifazi, M. A. Picardo, R. Nardou, L. F. Petit, A. Baude, G. J. Fishell, Y. Ben-Ari and R. Cossart. "Pioneer Glutamatergic Cells Develop into a Morpho-Functionally Distinct Population in the Juvenile Ca3 Hippocampus." *Nat Commun* 3, (2012): 1316.
- Marshall, H., M. Studer, H. Popperl, S. Aparicio, A. Kuroiwa, S. Brenner and R. Krumlauf. "A Conserved Retinoic Acid Response Element Required for Early Expression of the Homeobox Gene Hoxb-1." *Nature* 370, no. 6490 (1994): 567-71.
- Matera, I., T. Bachetti, F. Puppo, M. Di Duca, F. Morandi, G. M. Casiraghi, M. R. Cilio, R. Hennekam, R. Hofstra, J. G. Schober, R. Ravazzolo, G. Ottonello and I. Ceccherini. "Phox2b Mutations and Polyalanine Expansions Correlate with the Severity of the Respiratory Phenotype and Associated Symptoms in Both Congenital and Late Onset Central Hypoventilation Syndrome." *J Med Genet* 41, no. 5 (2004): 373-80.
- Maves, L., W. Jackman and C. B. Kimmel. "Fgf3 and Fgf8 Mediate a Rhombomere 4 Signaling Activity in the Zebrafish Hindbrain." *Development* 129, no. 16 (2002): 3825-37.
- McEwen, B. S. "Stress, Adaptation, and Disease. Allostasis and Allostatic Load." *Ann N Y Acad Sci* 840, (1998): 33-44.
- McKay, L. C., W. A. Janczewski and J. L. Feldman. "Sleep-Disordered Breathing after Targeted Ablation of Prebotzinger Complex Neurons." *Nat Neurosci* 8, no. 9 (2005): 1142-4.
- Mellen, N. M., W. A. Janczewski, C. M. Bocchiaro and J. L. Feldman. "Opioid-Induced Quantal Slowing Reveals Dual Networks for Respiratory Rhythm Generation." *Neuron* 37, no. 5 (2003): 821-6.
- Mellins, R. B., H. H. Balfour, Jr., G. M. Turino and R. W. Winters. "Failure of Automatic Control of Ventilation (Ondine's Curse). Report of an Infant Born with This Syndrome and Review of the Literature." *Medicine (Baltimore)* 49, no. 6 (1970): 487-504.
- Merlet, C., J. Hoerter, C. Devilleneuve and C. Tchobroutsky. "[Demonstration of Respiratory Movements of the Sheep Fetus in Utero]." *J Physiol (Paris)* 62 Suppl 3, (1970): 416-7.

- Metcalf, W. K., C. B. Kimmel and E. Schabtach. "Anatomy of the Posterior Lateral Line System in Young Larvae of the Zebrafish." *J Comp Neurol* 233, no. 3 (1985): 377-89.
- Milles, G. and D. B. Dorsey. "Intra-Uterine Respiration-Like Movements in Relation to Development of the Fetal Vascular System. A Discussion of Intra-Uterine Physiology Based Upon Cases of Congenital Absence of the Trachea, Abnormal Vascular Development, and Other Anomalies." *Am J Pathol* 26, no. 3 (1950): 411-25.
- Mitchell, R. A., H. H. Loeschcke, W. H. Massion and J. W. Severinghaus. "Respiratory Neurones Mediated through Superficial Chemosensitive Areas on the Medulla." *Journal applied physiology* 18, no. 523 - 533 (1963).
- Molkov, Y. I., B. J. Bacak, T. E. Dick and I. A. Rybak. "Control of Breathing by Interacting Pontine and Pulmonary Feedback Loops." *Front Neural Circuits* 7, (2013): 16.
- Moody, W. J. and M. M. Bosma. "Ion Channel Development, Spontaneous Activity, and Activity-Dependent Development in Nerve and Muscle Cells." *Physiol Rev* 85, no. 3 (2005): 883-941.
- Moore, J. D., D. Kleinfeld and F. Wang. "How the Brainstem Controls Orofacial Behaviors Comprised of Rhythmic Actions." *Trends Neurosci* 37, no. 7 (2014): 370-80.
- Moran-Rivard, L., T. Kagawa, H. Saueressig, M. K. Gross, J. Burrill and M. Goulding. "Evx1 Is a Postmitotic Determinant of V0 Interneuron Identity in the Spinal Cord." *Neuron* 29, no. 2 (2001): 385-99.
- Morin-Surun, M. P., E. Boudinot, H. Sarraseca, G. Fortin and M. Denavit-Saubie. "Respiratory Network Remains Functional in a Mature Guinea Pig Brainstem Isolated in Vitro." *Exp Brain Res* 90, no. 2 (1992): 375-83.
- Mulkey, D. K., R. L. Stornetta, M. C. Weston, J. R. Simmons, A. Parker, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet. "Respiratory Control by Ventral Surface Chemoreceptor Neurons in Rats." *Nat Neurosci* 7, no. 12 (2004): 1360-9.
- Mulkey, D. K., E. M. Talley, R. L. Stornetta, A. R. Siegel, G. H. West, X. Chen, N. Sen, A. M. Mistry, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss. "Task Channels Determine Ph Sensitivity in Select Respiratory Neurons but Do Not Contribute to Central Respiratory Chemosensitivity." *J Neurosci* 27, no. 51 (2007): 14049-58.
- Muller, T., H. Brohmann, A. Pierani, P. A. Heppenstall, G. R. Lewin, T. M. Jessell and C. Birchmeier. "The Homeodomain Factor Lbx1 Distinguishes Two Major Programs of Neuronal Differentiation in the Dorsal Spinal Cord." *Neuron* 34, no. 4 (2002): 551-62.

-N-

- Nattie, E. "Sudden Infant Death Syndrome and Serotonin: Animal Models." *Bioessays*. 31, no. 2 (2009): 130-3.

BIBLIOGRAPHIE

Nattie, E. "Julius H. Comroe, Jr., Distinguished Lecture: Central Chemoreception: Then ... And Now." *J Appl Physiol* (1985) 110, no. 1 (2011): 1-8.

Nattie, E. and A. Li. "Central Chemoreception Is a Complex System Function That Involves Multiple Brain Stem Sites." *J Appl Physiol* 106, no. 4 (2009): 1464-6.

Nattie, E. and A. Li. "Central Chemoreception in Wakefulness and Sleep: Evidence for a Distributed Network and a Role for Orexin." *J Appl Physiol* (1985) 108, no. 5 (2010): 1417-24.

Nattie, G. and A. Li. "Multiple Central Chemoreceptor Sites: Cell Types and Function in Vivo." *Adv Exp Med Biol* 605, (2008): 343-7.

Nogues, M. A. and E. Benarroch. "Abnormalities of Respiratory Control and the Respiratory Motor Unit." *Neurologist* 14, no. 5 (2008): 273-88.

Nogues, M. A. and E. Benarroch. "Abnormalities of Respiratory Control and the Respiratory Motor Unit." *Neurologist*. 14, no. 5 (2008): 273-88.

Nonchev, S., C. Vesque, M. Maconochie, T. Seitanidou, L. Ariza-McNaughton, M. Frain, H. Marshall, M. H. Sham, R. Krumlauf and P. Charnay. "Segmental Expression of Hoxa-2 in the Hindbrain Is Directly Regulated by Krox-20." *Development* 122, no. 2 (1996): 543-54.

-O-

Ogier, M. and D. M. Katz. "Breathing Dysfunction in Rett Syndrome: Understanding Epigenetic Regulation of the Respiratory Network." *Respir Physiol Neurobiol*. 164, no. 1-2 (2008): 55-63.

Ogier, M., H. Wang, E. Hong, Q. Wang, M. E. Greenberg and D. M. Katz. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Respiratory Function Improve after Ampakine Treatment in a Mouse Model of Rett Syndrome." *J Neurosci* 27, no. 40 (2007): 10912-7.

Olszewski, J. and D. Baxter. *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Basel: S. Karger, 1954.

Onimaru, H., A. Arata and I. Homma. "Localization of Respiratory Rhythm-Generating Neurons in the Medulla of Brainstem-Spinal Cord Preparations from Newborn Rats." *Neurosci Lett* 78, no. 2 (1987): 151-5.

Onimaru, H., A. Arata and I. Homma. "Firing Properties of Respiratory Rhythm Generating Neurons in the Absence of Synaptic Transmission in Rat Medulla in Vitro." *Exp Brain Res* 76, no. 3 (1989): 530-6.

Onimaru, H. and I. Homma. "Respiratory Rhythm Generator Neurons in Medulla of Brainstem-Spinal Cord Preparation from Newborn Rat." *Brain Res* 403, no. 2 (1987): 380-4.

- Onimaru, H. and I. Homma. "A Novel Functional Neuron Group for Respiratory Rhythm Generation in the Ventral Medulla." *J Neurosci* 23, no. 4 (2003): 1478-86.
- Onimaru, H., K. Ikeda and K. Kawakami. "Co₂-Sensitive Preinspiratory Neurons of the Parafacial Respiratory Group Express Phox2b in the Neonatal Rat." *J Neurosci* 28, no. 48 (2008): 12845-50.
- Onimaru, H., K. Ikeda and K. Kawakami. "Postsynaptic Mechanisms of Co(2) Responses in Parafacial Respiratory Neurons of Newborn Rats." *J Physiol* 590, no. Pt 7 (2012): 1615-24.
- Onimaru, H., K. Ikeda, T. Mariho and K. Kawakami. "Cytoarchitecture and Co(2) Sensitivity of Phox2b-Positive Parafacial Neurons in the Newborn Rat Medulla." *Prog Brain Res* 209, (2014): 57-71.
- Orem, J. and R. H. Trotter. "Medullary Respiratory Neuronal Activity During Augmented Breaths in Intact Unanesthetized Cats." *J Appl Physiol (1985)* 74, no. 2 (1993): 761-9.
- Otake, K., H. Sasaki, H. Mannen and K. Ezure. "Morphology of Expiratory Neurons of the Botzinger Complex: An Hrp Study in the Cat." *J Comp Neurol* 258, no. 4 (1987): 565-79.
- Ott, M. M., S. C. Nuding, L. S. Segers, B. G. Lindsey and K. F. Morris. "Ventrolateral Medullary Functional Connectivity and the Respiratory and Central Chemoreceptor-Evoked Modulation of Retrotrapezoid-Parafacial Neurons." *J Neurophysiol* 105, no. 6 (2011): 2960-75.
- P-**
- Pagliardini, S., W. A. Janczewski, W. Tan, C. T. Dickson, K. Deisseroth and J. L. Feldman. "Active Expiration Induced by Excitation of Ventral Medulla in Adult Anesthetized Rats." *J Neurosci* 31, no. 8 (2011): 2895-905.
- Pascual, O., M. Denavit-Saubie, S. Dumas, T. Kietzmann, G. Ghilini, J. Mallet and J. M. Pequignot. "Selective Cardiorespiratory and Catecholaminergic Areas Express the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (Hif-1alpha) under in Vivo Hypoxia in Rat Brainstem." *Eur J Neurosci* 14, no. 12 (2001): 1981-91.
- Pascual, O., M. P. Morin-Surun, B. Barna, M. Denavit-Saubie, J. M. Pequignot and J. Champagnat. "Progesterone Reverses the Neuronal Responses to Hypoxia in Rat Nucleus Tractus Solitarius in Vitro." *J Physiol* 544, no. Pt 2 (2002): 511-20.
- Patten, I. and M. Placzek. "The Role of Sonic Hedgehog in Neural Tube Patterning." *Cell Mol Life Sci* 57, no. 12 (2000): 1695-708.
- Pattyn, A., C. Goridis and J.-F. Brunet. "Specification of the Central Noradrenergic Phenotype by the Homeobox Gene *Phox2b*." *Mol Cell Neurosci* 15, (2000): 235-243.

BIBLIOGRAPHIE

- Pattyn, A., X. Morin, H. Cremer, C. Goridis and J.-F. Brunet. "Expression and Interactions of the Two Closely Related Homeobox Genes Phox2a and Phox2b During Neurogenesis." *Development* 124, (1997): 4065-4075.
- Pattyn, A., X. Morin, H. Cremer, C. Goridis and J.-F. Brunet. "The Homeobox Gene Phox2b Is Essential for the Development of Autonomic Neural Crest Derivatives." *Nature* 399, (1999): 366-370.
- Pattyn, A., A. Vallstedt, J. M. Dias, O. A. Samad, R. Krumlauf, F. M. Rijli, J. F. Brunet and J. Ericson. "Coordinated Temporal and Spatial Control of Motor Neuron and Serotonergic Neuron Generation from a Common Pool of Cns Progenitors." *Genes Dev* 17, no. 6 (2003): 729-37.
- Pattyn, A., A. Vallstedt, J. M. Dias, M. Sander and J. Ericson. "Complementary Roles for Nkx6 and Nkx2 Class Proteins in the Establishment of Motoneuron Identity in the Hindbrain." *Development* 130, no. 17 (2003): 4149-59.
- Pepper, D. R., R. C. Landauer and P. Kumar. "Postnatal Development of Co₂-O₂ Interaction in the Rat Carotid Body in Vitro." *J Physiol* 485 (Pt 2), (1995): 531-41.
- Pete, G., S. O. Mack, M. A. Haxhiu, S. Walbaum and E. B. Gauda. "Co₂-Induced C-Fos Expression in Brainstem Preprotachykinin Mrna Containing Neurons." *Respir Physiol Neurobiol* 130, no. 3 (2002): 265-74.
- Phillipson, E. A., J. Duffin and J. D. Cooper. "Critical Dependence of Respiratory Rhythmicity on Metabolic Co₂ Load." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50, no. 1 (1981): 45-54.
- Picardo, M. A., P. Guigue, P. Bonifazi, R. Batista-Brito, C. Allene, A. Ribas, G. Fishell, A. Baude and R. Cossart. "Pioneer Gaba Cells Comprise a Subpopulation of Hub Neurons in the Developing Hippocampus." *Neuron* 71, no. 4 (2011): 695-709.
- Pierani, A., S. Brenner-Morton, C. Chiang and T. M. Jessell. "A Sonic Hedgehog-Independent, Retinoid-Activated Pathway of Neurogenesis in the Ventral Spinal Cord." *Cell* 97, no. 7 (1999): 903-15.
- Pierani, A., L. Moran-Rivard, M. J. Sunshine, D. R. Littman, M. Goulding and T. M. Jessell. "Control of Interneuron Fate in the Developing Spinal Cord by the Progenitor Homeodomain Protein Dbx1." *Neuron* 29, no. 2 (2001): 367-84.
- Pierre, Flourens. "De La Phrénologie Et Des Études Vraies Sur Le Cerveau." (1851).
- Pineda, J. and G. K. Aghajanian. "Carbon Dioxide Regulates the Tonic Activity of Locus Coeruleus Neurons by Modulating a Proton- and Polyamine-Sensitive Inward Rectifier Potassium Current." *Neuroscience* 77, no. 3 (1997): 723-43.

- Poets, C. F., G. A. Rau, K. Neuber, M. Gappa and J. Seidenberg. "Determinants of Lung Volume in Spontaneously Breathing Preterm Infants." *Am J Respir Crit Care Med* 155, no. 2 (1997): 649-53.
- Preter, M. and D. F. Klein. "Panic, Suffocation False Alarms, Separation Anxiety and Endogenous Opioids." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, no. 3 (2008): 603-12.
- Pronin, L. A. "Respiratory Movements in Utero and Establishment of Respiratory Center Function in Rabbit Fetuses." *Fed Proc Transl Suppl* 25, no. 2 (1966): 236-8.
- Putnam, R. W. "Co₂ Chemoreception in Cardiorespiratory Control." *J Appl Physiol* (1985) 108, no. 6 (2010): 1796-802.
- Putnam, R. W., J. A. Filosa and N. A. Ritucci. "Cellular Mechanisms Involved in Co(2) and Acid Signaling in Chemosensitive Neurons." *Am J Physiol Cell Physiol* 287, no. 6 (2004): C1493-526.
- R-**
- Ramanantsoa, N., M. R. Hirsch, M. Thoby-Brisson, V. Dubreuil, J. Bouvier, P. L. Ruffault, B. Matrot, G. Fortin, J. F. Brunet, J. Gallego and C. Goridis. "Breathing without Co(2) Chemosensitivity in Conditional Phox2b Mutants." *J Neurosci* 31, no. 36 (2011): 12880-8.
- Ramanathan, R. "Optimal Ventilatory Strategies and Surfactant to Protect the Preterm Lungs." *Neonatology* 93, no. 4 (2008): 302-8.
- Rassovsky, Y. and M. G. Kushner. "Carbon Dioxide in the Study of Panic Disorder: Issues of Definition, Methodology, and Outcome." *J Anxiety Disord* 17, no. 1 (2003): 1-32.
- Ray, R. S., A. E. Corcoran, R. D. Brust, J. C. Kim, G. B. Richerson, E. Nattie and S. M. Dymecki. "Impaired Respiratory and Body Temperature Control Upon Acute Serotonergic Neuron Inhibition." *Science* 333, no. 6042 (2011): 637-42.
- Rekling, J. C., J. Champagnat and M. Denavit-Saubie. "Electroresponsive Properties and Membrane Potential Trajectories of Three Types of Inspiratory Neurons in the Newborn Mouse Brain Stem in Vitro." *J Neurophysiol* 75, no. 2 (1996): 795-810.
- Renolleau, S., S. Dauger, F. Autret, G. Vardon, C. Gaultier and J. Gallego. "Maturation of Baseline Breathing and of Hypercapnic and Hypoxic Ventilatory Responses in Newborn Mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, no. 5 (2001): R1746-53.
- Richerson, G. B., W. Wang, M. R. Hodges, C. I. Dohle and A. Diez-Sampedro. "Homing in on the Specific Phenotype(S) of Central Respiratory Chemoreceptors." *Exp Physiol* 90, no. 3 (2005): 259-66; discussion 266-9.

BIBLIOGRAPHIE

Richter, D. W. "Generation and Maintenance of the Respiratory Rhythm." *J Exp Biol* 100, (1982): 93-107.

Richter, D. W., T. Manzke, B. Wilken and E. Ponimaskin. "Serotonin Receptors: Guardians of Stable Breathing." *Trends Mol Med* 9, no. 12 (2003): 542-8.

Ritucci, N. A., J. S. Erlichman, J. C. Leiter and R. W. Putnam. "Response of Membrane Potential and Intracellular Ph to Hypercapnia in Neurons and Astrocytes from Rat Retrotrapezoid Nucleus." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, no. 3 (2005): R851-61.

Rose, M. F., J. Ren, K. A. Ahmad, H. T. Chao, T. J. Klisch, A. Flora, J. J. Greer and H. Y. Zoghbi. "Math1 Is Essential for the Development of Hindbrain Neurons Critical for Perinatal Breathing." *Neuron* 64, no. 3 (2009): 341-54.

Rosin, D. L., D. A. Chang and P. G. Guyenet. "Afferent and Efferent Connections of the Rat Retrotrapezoid Nucleus." *J Comp Neurol* 499, no. 1 (2006): 64-89.

Rudzinski, E. and R. P. Kapur. "Phox2b Immunolocalization of the Candidate Human Retrotrapezoid Nucleus." *Pediatr Dev Pathol* 13, no. 4 (2010): 291-9.

-S-

Sato, M., J. W. Severinghaus and A. I. Basbaum. "Medullary Co2 Chemoreceptor Neuron Identification by C-Fos Immunocytochemistry." *J Appl Physiol* (1985) 73, no. 1 (1992): 96-100.

Schneider-Maunoury, S., T. Seitaniidou, P. Charnay and A. Lumsden. "Segmental and Neuronal Architecture of the Hindbrain of Krox-20 Mouse Mutants." *Development* 124, no. 6 (1997): 1215-26.

Schneider-Maunoury, S., P. Topilko, T. Seitandou, G. Levi, M. Cohen-Tannoudji, S. Pournin, C. Babinet and P. Charnay. "Disruption of Krox-20 Results in Alteration of Rhombomeres 3 and 5 in the Developing Hindbrain." *Cell* 75, no. 6 (1993): 1199-214.

Schumacher, M., R. Guennoun, A. Ghoumari, C. Massaad, F. Robert, M. El-Etr, Y. Akwa, K. Rajkowski and E. E. Baulieu. "Novel Perspectives for Progesterone in Hormone Replacement Therapy, with Special Reference to the Nervous System." *Endocr Rev* 28, no. 4 (2007): 387-439.

Schwarzacher, S. W., U. Rub and T. Deller. "Neuroanatomical Characteristics of the Human Pre-Bötzinger Complex and Its Involvement in Neurodegenerative Brainstem Diseases." *Brain* 134, no. Pt 1 (2011): 24-35.

Scott, M. P. "Vertebrate Homeobox Gene Nomenclature." *Cell* 71, no. 4 (1992): 551-3.

- Serra, A., D. Brozoski, N. Hedin, R. Franciosi and H. V. Forster. "Mortality after Carotid Body Denervation in Rats." *J Appl Physiol* 91, no. 3 (2001): 1298-306.
- Sham, M. H., C. Vesque, S. Nonchev, H. Marshall, M. Frain, R. D. Gupta, J. Whiting, D. Wilkinson, P. Charnay and R. Krumlauf. "The Zinc Finger Gene Krox20 Regulates Hoxb2 (Hox2.8) During Hindbrain Segmentation." *Cell* 72, no. 2 (1993): 183-96.
- Shirasawa, S., A. Arata, H. Onimaru, K. A. Roth, G. A. Brown, S. Horning, S. Arata, K. Okumura, T. Sasazuki and S. J. Korsmeyer. "Rnx Deficiency Results in Congenital Central Hypoventilation." *Nat Genet* 24, no. 3 (2000): 287-90.
- Shroyer, N. F. and M. H. Wong. "Bmp Signaling in the Intestine: Cross-Talk Is Key." *Gastroenterology* 133, no. 3 (2007): 1035-8.
- Sieber, M. A., R. Storm, M. Martinez-de-la-Torre, T. Muller, H. Wende, K. Reuter, E. Vasyutina and C. Birchmeier. "Lbx1 Acts as a Selector Gene in the Fate Determination of Somatosensory and Viscerosensory Relay Neurons in the Hindbrain." *J Neurosci* 27, no. 18 (2007): 4902-9.
- Simon, H. and A. Lumsden. "Rhombomere-Specific Origin of the Contralateral Vestibulo-Acoustic Efferent Neurons and Their Migration across the Embryonic Midline." *Neuron* 11, no. 2 (1993): 209-20.
- Sirois, J. E., Q. Lei, E. M. Talley, C. Lynch, 3rd and D. A. Bayliss. "The Task-1 Two-Pore Domain K⁺ Channel Is a Molecular Substrate for Neuronal Effects of Inhalation Anesthetics." *J Neurosci* 20, no. 17 (2000): 6347-54.
- Smith, C. A., H. V. Forster, G. M. Blain and J. A. Dempsey. "An Interdependent Model of Central/Peripheral Chemoreception: Evidence and Implications for Ventilatory Control." *Respir Physiol Neurobiol* 173, no. 3 (2010): 288-97.
- Smith, C. A., J. R. Rodman, B. J. Chenuel, K. S. Henderson and J. A. Dempsey. "Response Time and Sensitivity of the Ventilatory Response to Co₂ in Unanesthetized Intact Dogs: Central Vs. Peripheral Chemoreceptors." *J Appl Physiol (1985)* 100, no. 1 (2006): 13-9.
- Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter and J. L. Feldman. "Pre-Botzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals." *Science* 254, no. 5032 (1991): 726-9.
- Smith, J. C., D. E. Morrison, H. H. Ellenberger, M. R. Otto and J. L. Feldman. "Brainstem Projections to the Major Respiratory Neuron Populations in the Medulla of the Cat." *J Comp Neurol* 281, no. 1 (1989): 69-96.
- Spitzer, N. C. "Electrical Activity in Early Neuronal Development." *Nature* 444, no. 7120 (2006): 707-12.

BIBLIOGRAPHIE

- Spyer, K. M., N. Dale and A. V. Gourine. "Atp Is a Key Mediator of Central and Peripheral Chemosensory Transduction." *Exp Physiol* 89, no. 1 (2004): 53-9.
- Spyer, K. M. and T. Thomas. "A Role for Adenosine in Modulating Cardio-Respiratory Responses: A Mini-Review." *Brain Res Bull* 53, no. 1 (2000): 121-4.
- Stornetta, R. L., T. S. Moreira, A. C. Takakura, B. J. Kang, D. A. Chang, G. H. West, J. F. Brunet, D. K. Mulkey, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet. "Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat." *J Neurosci* 26, no. 40 (2006): 10305-14.
- Straus, C., H. Trang, M. H. Becquemin, P. Touraine and T. Similowski. "Chemosensitivity Recovery in Ondine's Curse Syndrome under Treatment with Desogestrel." *Respir Physiol Neurobiol* 171, no. 2 (2010): 171-4.
- Stunden, C. E., J. A. Filosa, A. J. Garcia, J. B. Dean and R. W. Putnam. "Development of in Vivo Ventilatory and Single Chemosensitive Neuron Responses to Hypercapnia in Rats." *Respir Physiol* 127, no. 2-3 (2001): 135-55.
- Su, C. K., C. M. Ho, H. H. Kuo, Y. C. Wen and C. Y. Chai. "Sympathetic-Correlated C-Fos Expression in the Neonatal Rat Spinal Cord in Vitro." *J Biomed Sci* 16, (2009): 44.
- Suzue, T. "Respiratory Rhythm Generation in the in Vitro Brain Stem-Spinal Cord Preparation of the Neonatal Rat." *J Physiol* 354, (1984): 173-83.
- T-**
- Tafil-Klawe, M., A. Trzebski, J. Klawe and T. Palko. "Augmented Chemoreceptor Reflex Tonic Drive in Early Human Hypertension and in Normotensive Subjects with Family Background of Hypertension." *Acta Physiol Pol* 36, no. 1 (1985): 51-8.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, E. Colombari, G. H. West, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet. "Peripheral Chemoreceptor Inputs to Retrotrapezoid Nucleus (Rtn) Co2-Sensitive Neurons in Rats." *J Physiol*. 572, no. Pt 2 (2006): 503-23. Epub 2006 Feb 2.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, R. L. Stornetta, G. H. West, J. M. Gwilt and P. G. Guyenet. "Selective Lesion of Retrotrapezoid Phox2b-Expressing Neurons Raises the Apnoeic Threshold in Rats." *J Physiol* 586, no. Pt 12 (2008): 2975-91.
- Talley, E. M., J. E. Sirois, Q. Lei and D. A. Bayliss. "Two-Pore-Domain (Kcnk) Potassium Channels: Dynamic Roles in Neuronal Function." *Neuroscientist* 9, no. 1 (2003): 46-56.
- Tan, W., W. A. Janczewski, P. Yang, X. M. Shao, E. M. Callaway and J. L. Feldman. "Silencing Prebotzinger Complex Somatostatin-Expressing Neurons Induces Persistent Apnea in Awake Rat." *Nat Neurosci* 11, no. 5 (2008): 538-40.

- Tan, W., S. Pagliardini, P. Yang, W. A. Janczewski and J. L. Feldman. "Projections of Prebotzinger Complex Neurons in Adult Rats." *J Comp Neurol* 518, no. 10 (2010): 1862-78.
- Teppema, L. J., J. G. Veening, A. Kranenburg, A. Dahan, A. Berkenbosch and C. Olievier. "Expression of C-Fos in the Rat Brainstem after Exposure to Hypoxia and to Normoxic and Hyperoxic Hypercapnia." *J Comp Neurol* 388, no. 2 (1997): 169-90.
- Ter Horst, G. J., P. de Boer, P. G. Luiten and J. D. van Willigen. "Ascending Projections from the Solitary Tract Nucleus to the Hypothalamus. A Phaseolus Vulgaris Lectin Tracing Study in the Rat." *Neuroscience* 31, no. 3 (1989): 785-97.
- Teran, F. A., C. A. Massey and G. B. Richerson. "Serotonin Neurons and Central Respiratory Chemoreception: Where Are We Now?" *Prog Brain Res* 209, (2014): 207-33.
- Thoby-Brisson, M., B. Cauli, J. Champagnat, G. Fortin and D. M. Katz. "Expression of Functional Tyrosine Kinase B Receptors by Rhythmically Active Respiratory Neurons in the Pre-Botzinger Complex of Neonatal Mice." *J Neurosci* 23, no. 20 (2003): 7685-9.
- Thoby-Brisson, M., M. Karlen, N. Wu, P. Charnay, J. Champagnat and G. Fortin. "Genetic Identification of an Embryonic Parafacial Oscillator Coupling to the Prebotzinger Complex." *Nat Neurosci* 12, no. 8 (2009): 1028-35.
- Thoby-Brisson, M., J. B. Trinh, J. Champagnat and G. Fortin. "Emergence of the Pre-Botzinger Respiratory Rhythm Generator in the Mouse Embryo." *J Neurosci* 25, no. 17 (2005): 4307-18.
- Trang, H., M. Dehan, F. Beaufils, I. Zaccaria, J. Amiel and C. Gaultier. "The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: General Data, Phenotype, and Genotype." *Chest* 127, no. 1 (2005): 72-9.
- Trochet, D., S. J. Hong, J. K. Lim, J. F. Brunet, A. Munnich, K. S. Kim, S. Lyonnet, C. Goriadis and J. Amiel. "Molecular Consequences of Phox2b Missense, Frameshift and Alanine Expansion Mutations Leading to Autonomic Dysfunction." *Hum Mol Genet* 14, no. 23 (2005): 3697-708.
- Trochet, D., L. M. O'Brien, D. Gozal, H. Trang, A. Nordenskjold, B. Laudier, P. J. Svensson, S. Uhrig, T. Cole, S. Niemann, A. Munnich, C. Gaultier, S. Lyonnet and J. Amiel. "Phox2b Genotype Allows for Prediction of Tumor Risk in Congenital Central Hypoventilation Syndrome." *Am J Hum Genet* 76, no. 3 (2005): 421-6.
- Trulson, M. E. and B. L. Jacobs. "Raphe Unit Activity in Freely Moving Cats: Correlation with Level of Behavioral Arousal." *Brain Res* 163, no. 1 (1979): 135-50.
- Tumpel, S., L. M. Wiedemann and R. Krumlauf. "Hox Genes and Segmentation of the Vertebrate Hindbrain." *Curr Top Dev Biol* 88, (2009): 103-37.

BIBLIOGRAPHIE

Tupal, S., W. H. Huang, M. C. PicardoLing GY, DelNegro CA, Zogbhi HY and Gray PA. "Atoh1-Dependent Rhombic Lip Neurons Are Required for Temporal Delay between Independent Respiratory Oscillators in Embryonic Mice." 3, (2014): e02265.

-U-

Ursino, M., E. Magosso and G. Avanzolini. "An Integrated Model of the Human Ventilatory Control System: The Response to Hypercapnia." *Clin Physiol* 21, no. 4 (2001): 447-64.

-V-

Vallstedt, A., J. M. Klos and J. Ericson. "Multiple Dorsoventral Origins of Oligodendrocyte Generation in the Spinal Cord and Hindbrain." *Neuron* 45, no. 1 (2005): 55-67.

Veasey, S. C., C. A. Fornal, C. W. Metzler and B. L. Jacobs. "Response of Serotonergic Caudal Raphe Neurons in Relation to Specific Motor Activities in Freely Moving Cats." *J Neurosci* 15, no. 7 Pt 2 (1995): 5346-59.

Veasey, S. C., C. A. Fornal, C. W. Metzler and B. L. Jacobs. "Single-Unit Responses of Serotonergic Dorsal Raphe Neurons to Specific Motor Challenges in Freely Moving Cats." *Neuroscience* 79, no. 1 (1997): 161-9.

Viemari, J. C., J. C. Roux, A. K. Tryba, V. Saywell, H. Burnet, F. Pena, S. Zanella, M. Bevingut, M. Barthelemy-Requin, L. B. Herzing, A. Moncla, J. Mancini, J. M. Ramirez, L. Villard and G. Hilaire. "Mecp2 Deficiency Disrupts Norepinephrine and Respiratory Systems in Mice." *J Neurosci.* 25, no. 50 (2005): 11521-30.

Voiculescu, O., P. Charnay and S. Schneider-Maunoury. "Expression Pattern of a Krox-20/Cre Knock-in Allele in the Developing Hindbrain, Bones, and Peripheral Nervous System." *Genesis* 26, no. 2 (2000): 123-6.

Voituron, N., A. Frugiere, J. Champagnat and L. Bodineau. "Hypoxia-Sensing Properties of the Newborn Rat Ventral Medullary Surface in Vitro." *J Physiol* 577, no. Pt 1 (2006): 55-68.

von Euler, C., J. N. Hayward, I. Marttila and R. J. Wyman. "The Spinal Connections of the Inspiratory Neurons of the Ventrolateral Nucleus of the Cat's Tractus Solitarius." *Brain Res* 61, (1973): 23-33.

-W-

Wall, N. R., I. R. Wickersham, A. Cetin, M. De La Parra and E. M. Callaway. "Monosynaptic Circuit Tracing in Vivo through Cre-Dependent Targeting and Complementation of Modified Rabies Virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, no. 50 (2010): 21848-53.

- Wallen-Mackenzie, A., H. Gezelius, M. Thoby-Brisson, A. Nygard, A. Enjin, F. Fujiyama, G. Fortin and K. Kullander. "Vesicular Glutamate Transporter 2 Is Required for Central Respiratory Rhythm Generation but Not for Locomotor Central Pattern Generation." *J Neurosci* 26, no. 47 (2006): 12294-307.
- Walshe, J., H. Maroon, I. M. McGonnell, C. Dickson and I. Mason. "Establishment of Hindbrain Segmental Identity Requires Signaling by Fgf3 and Fgf8." *Curr Biol* 12, no. 13 (2002): 1117-23.
- Wang, H., R. L. Stornetta, D. L. Rosin and P. G. Guyenet. "Neurokinin-1 Receptor-Immunoreactive Neurons of the Ventral Respiratory Group in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 434, no. 2 (2001): 128-146.
- Wang, S., N. Benamer, S. Zanella, N. N. Kumar, Y. Shi, M. Bevorgut, D. Penton, P. G. Guyenet, F. Lesage, C. Gestreau, J. Barhanin and D. A. Bayliss. "Task-2 Channels Contribute to Ph Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons." *J Neurosci* 33, no. 41 (2013): 16033-44.
- Wang, S., Y. Shi, S. Shu, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss. "Phox2b-Expressing Retrotrapezoid Neurons Are Intrinsically Responsive to H⁺ and Co₂." *J Neurosci* 33, no. 18 (2013): 7756-61.
- Wang, V. Y., M. F. Rose and H. Y. Zoghbi. "Math1 Expression Redefines the Rhombic Lip Derivatives and Reveals Novel Lineages within the Brainstem and Cerebellum." *Neuron* 48, no. 1 (2005): 31-43.
- Wang, W. and G. B. Richerson. "Development of Chemosensitivity of Rat Medullary Raphe Neurons." *Neuroscience* 90, no. 3 (1999): 1001-11.
- Washburn, C. P., D. A. Bayliss and P. G. Guyenet. "Cardiorespiratory Neurons of the Rat Ventrolateral Medulla Contain Task-1 and Task-3 Channel Mrna." *Respir Physiol Neurobiol* 138, no. 1 (2003): 19-35.
- Washburn, C. P., J. E. Sirois, E. M. Talley, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss. "Serotonergic Raphe Neurons Express Task Channel Transcripts and a Task-Like Ph- and Halothane-Sensitive K⁺ Conductance." *J Neurosci* 22, no. 4 (2002): 1256-65.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis, I. Ceccherini, T. G. Keens, D. A. Loghmanee and H. Trang. "An Official Ats Clinical Policy Statement: Congenital Central Hypoventilation Syndrome: Genetic Basis, Diagnosis, and Management." *Am J Respir Crit Care Med* 181, no. 6 (2010): 626-44.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis, I. Ceccherini and C. M. Rand. "Congenital Central Hypoventilation Syndrome (Cchs) and Sudden Infant Death Syndrome (Sids): Kindred Disorders of Autonomic Regulation." *Respir Physiol Neurobiol*. 164, no. 1-2 (2008): 38-48.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis and M. L. Marazita. "In Pursuit (and Discovery) of a Genetic Basis for Congenital Central Hypoventilation Syndrome." *Respir Physiol Neurobiol*, (2005).

BIBLIOGRAPHIE

- Weese-Mayer, D. E., C. M. Rand, E. M. Berry-Kravis, L. J. Jennings, D. A. Loghmanee, P. P. Patwari and I. Ceccherini. "Congenital Central Hypoventilation Syndrome from Past to Future: Model for Translational and Transitional Autonomic Medicine." *Pediatr Pulmonol* 44, no. 6 (2009): 521-35.
- Wemmie, J. A. "Neurobiology of Panic and Ph Chemosensation in the Brain." *Dialogues Clin Neurosci* 13, no. 4 (2011): 475-83.
- Wenker, I. C., O. Kreneisz, A. Nishiyama and D. K. Mulkey. "Astrocytes in the Retrotrapezoid Nucleus Sense H⁺ by Inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-Like Current and May Contribute to Chemoreception by a Purinergic Mechanism." *J Neurophysiol* 104, no. 6 (2010): 3042-52.
- Wickstrom, R., T. Hokfelt and H. Lagercrantz. "Development of Co(2)-Response in the Early Newborn Period in Rat." *Respir Physiol Neurobiol* 132, no. 2 (2002): 145-58.
- Widener, G., L. P. Sullivan, R. L. Clancy and N. C. Gonzalez. "Renal Compensation of Hypercapnia in Prolonged Hypoxia." *Respir Physiol* 65, no. 3 (1986): 341-50.
- Wilkinson, D. G., S. Bhatt, P. Chavrier, R. Bravo and P. Charnay. "Segment-Specific Expression of a Zinc-Finger Gene in the Developing Nervous System of the Mouse." *Nature* 337, no. 6206 (1989): 461-4.
- Wrobel, L. J., M. Ogier, F. Chatonnet, S. Autran, V. Mezieres, M. Thoby-Brisson, H. McLean, C. Taeron and J. Champagnat. "Abnormal Inspiratory Depth in Phox2a Haploinsufficient Mice." *Neuroscience* 145, no. 1 (2007): 384-92.

-Y-

- Yamada, T., M. Placzek, H. Tanaka, J. Dodd and T. M. Jessell. "Control of Cell Pattern in the Developing Nervous System: Polarizing Activity of the Floor Plate and Notochord." *Cell* 64, no. 3 (1991): 635-47.
- Yang, Q., N. A. Bermingham, M. J. Finegold and H. Y. Zoghbi. "Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine." *Science* 294, no. 5549 (2001): 2155-8.

-Z-

- Zhao, Z. Q., M. Scott, S. Chiechio, J. S. Wang, K. J. Renner, R. W. th Gereau, R. L. Johnson, E. S. Deneris and Z. F. Chen. "Lmx1b Is Required for Maintenance of Central Serotonergic Neurons and Mice Lacking Central Serotonergic System Exhibit Normal Locomotor Activity." *J Neurosci* 26, no. 49 (2006): 12781-8.
- Ziemann, A. E., J. E. Allen, N. S. Dahdaleh, Drebot, II, M. W. Coryell, A. M. Wunsch, C. M. Lynch, F. M. Faraci, M. A. Howard, 3rd, M. J. Welsh and J. A. Wemmie. "The Amygdala Is a Chemosensor That Detects Carbon Dioxide and Acidosis to Elicit Fear Behavior." *Cell* 139, no. 5 (2009): 1012-21.

Résumé : Le maintien de la PCO₂ et du pH du sang artériel est vital. Le principal mécanisme de cette régulation, chez les mammifères, est le chémoréflexe respiratoire central au CO₂, une hyperventilation en réponse à l'hypercapnie, dont les bases neurales sont l'enjeu d'un débat persistant. Notre travail s'intéresse aux rôles supposés d'un groupe d'interneurones du niveau facial du tronc cérébral, le « noyau rétrotrapézoïde », dans le chémoréflexe au CO₂ et l'accélération du rythme respiratoire autour de la naissance. Notre approche est inspirée par la symptomatologie respiratoire du syndrome d'Ondine ou CCHS (apnées et abrogation du chémoréflexe) et son gène causal, codant le facteur de transcription Phox2b, exprimé par les neurones du RTN. Nous avons disséqué le rôle du RTN dans le chémoréflexe central en étudiant les propriétés anatomiques et fonctionnelles *in vitro* chez l'embryon, et *in vivo* chez l'animal postnatal, de modèles murins - perte et gain de fonction –ciblant le RTN de la manière la plus sélective possible par génétique intersectionnelle. Ces modèles sont basés (i) sur l'historique d'expression des facteurs de transcription Phox2b, Lbx1, Atoh1 spécifiant les neurones du RTN au cours du développement et (ii) sur la transposition, chez la souris, de mutations humaines, *Phox2b*^{27Ala/+} et *Lbx1*^{fs/fs} affectant ces facteurs, et qui sont respectivement, diagnostique, et proposé comme telle, du CCHS. L'ensemble des mutants étudiés récapitulent chez la souris, des traits phénotypiques exclusifs chez l'embryon et à la naissance: l'abrogation anatomique du RTN, le ralentissement du rythme respiratoire et la perte complète du chémoréflexe. Nos travaux montrent donc que le RTN est un composant obligatoire du circuit chémoréflexe. Nous montrons de plus, que le chémoréflexe n'est pas requis pour la survie des souris à la naissance, cette dernière pourrait être liée au déficit conjoint d'une autre structure de même identité que le RTN, son homologue segmentaire au niveau trigéminal du tronc cérébral: le groupe péri-trigéminal.

Summary: The maintenance of PCO₂ and pH in arterial blood is vital. The principal mechanism through which this is achieved in mammals is the respiratory chemoreflex, a hyperventilation response to hypercapnia, whose circuitry is still elusive and the matter of a persistent debate. Our work deals with the putative roles of a group of interneurons at facial level of the brainstem, the “retrotrapezoid nucleus”, in the CO₂ chemoreflex and in the acceleration of breathing around birth. Our approach is inspired by the respiratory symptoms of Ondine's curse or CCHS (apneas and abrogation of the chemoreflex) and its causal gene, encoding the transcription factor Phox2b, expressed in RTN neurons. We have dissected the role of the RTN by studying the anatomical and functional properties *in vitro* in embryos and *in vivo* at birth and postnatally, of gain and loss of function mutant mouse models, as selective as possible towards the RTN through intersectional strategies. Our models are based (i) on the history of expression of the transcription factors Phox2b, Lbx1, Atoh1 that specify RTN neurons during development and (ii) on the transfer into the mouse of the human mutations *Phox2b*^{27Ala/+} and *Lbx1*^{fs/fs} that target these factors and are respectively diagnostic and candidate diagnostic for CCHS. Compoundly, the mutants recapitulate exclusive phenotypic traits in the embryo and at birth: anatomical abrogation of the RTN, a slowed down respiratory rhythm and the complete loss of chemoreflex. Our work demonstrates that the RTN is an obligatory component of the chemoreflex circuit. Furthermore, we show that the chemoreflex is not required for survival at birth and that the latter may be put at risk by the joint deficiency of another structure sharing the same molecular identity with the RTN, in fact its segmental homologue at trigeminal level of the brainstem: the peri-trigeminal group.