



HAL
open science

Etude du rôle de l'Erythropoïétine et des systèmes de neurotransmission dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie

Florine Jeton

► **To cite this version:**

Florine Jeton. Etude du rôle de l'Erythropoïétine et des systèmes de neurotransmission dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD078 . tel-02146389

HAL Id: tel-02146389

<https://theses.hal.science/tel-02146389v1>

Submitted on 3 Jun 2019

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

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



Université Paris XIII – Sorbonne Paris Cité



2016

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'université Paris XIII

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2016 par
FLORINE JETON

**Etude du rôle de l'Erythropoïétine et des systèmes de neurotransmission
dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à
l'hypercapnie**

Directeurs de thèse : Aurélien Pichon et Nicolas Voituron

Jury

Florence Cayetanot	(Examineur)
Fabrice Favret	(Examineur)
Jorge Gallego	(Rapporteur)
Vincent Joseph	(Rapporteur)
Aurélien Pichon	(Directeur)
Nadine Varin-Blank	(Examineur)
Nicolas Voituron	(co-directeur)

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les différents membres de mon jury, Florence Cayetanot, Fabrice Favret, Jorge Gallego, Vincent Joseph et Nadine Varin-Blank pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais aussi remercier Jean-Paul Richalet et Carole Planès, pour m'avoir accueillis au sein du laboratoire durant mes quatre années de thèse, ainsi que le GR-EX pour avoir accordé le financement à ce projet de thèse.

Bien évidemment, cette histoire n'aurait pas pu débuter sans mes encadrants, Aurélien Pichon et Nicolas Voituron. Je ne pourrais jamais assez les remercier pour leur aide précieuse tout au long de ma thèse, même dans les moments difficiles et pour avoir su me remettre dans le droit chemin quand il le fallait. A Aurélien, merci d'avoir toujours été là même pour la fin. A Nicolas, merci pour tout ce que tu m'as fait découvrir durant ces années, pour tous ces souvenirs, qui vont de la découverte de la technique de prep *ex vivo* à la celle du Chili ! Merci à vous deux de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche *via* ma participation à deux nombreux congrès scientifiques en France et dans le monde, et qui m'ont permis de m'ouvrir à d'autres aspects de mon travail de recherche, et d'échanger sur mes projets. Merci enfin de m'avoir donné ma chance afin d'effectuer de l'enseignement et de m'avoir donné toutes les cartes pour débuter sereinement cette nouvelle facette de mon travail, qui a été une expérience réellement enrichissante. Tout cet épanouissement n'aurait pas été possible sans vous, merci pour tout.

Viennent ensuite les collègues, et ils sont nombreux ! Thomas, Florence, Morgane, Cécile et Olivier. Vous avez tous fait partie intégrante de ces quatre années au sein du labo, mais aussi à l'extérieur puisque vous étiez là pour un moment important de ma vie... Merci pour tous les souvenirs avec lesquels je repars, pour votre joie, votre bonne humeur au quotidien et toute cette folie des années 80 (JL, on ne s'en lasse pas) ! Et enfin merci à la dernière collègue en date, Eva pour m'avoir soutenue pendant cette dernière ligne droite, à grands renforts de Nutella-Brioche et d'une très forte dose de folie générale !

Un grand merci à tous les autres membres du laboratoire, Dominique, Patricia, Émilie, Nicolas, Valérie, Eric, pour les conseils et l'aide qu'ils ont pu m'apporter pendant ma thèse. Merci à toutes les petites mains des stagiaires étant passés par notre équipe, pour des périodes plus ou moins longues : Besma, Kardiatou, Cindy, Oulfa, Fanny. Merci pour votre implication, de nombreux résultats de cette thèse seraient absents sans votre travail. Merci aussi aux stagiaires venus au sein de l'autre équipe : Abdou, Linda, Katia, et j'en oublie sûrement !

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes avec lesquelles nous avons pu collaborer durant ces quatre années, pour différentes expériences qui m'ont permis de faire de belles rencontres. En premier l'équipe de l'UMR_S1158, à commencer par Laurence Bodineau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour certaines de mes expériences mais aussi Fanny et Camille pour leur aide. Et bien sûr Anne-Sophie, merci pour ton aide et pour ton écoute. Viennent ensuite les différentes collaborations outre-Atlantique, Merci à Jorge Soliz, Rodrigo Iturriaga et Rodrigo del Rio de m'avoir fait découvrir leurs techniques.

Je dois aussi remercier toutes les personnes que j'ai eues l'occasion de rencontrer dans les stages qui ont précédé ma thèse et qui m'ont donné l'envie de continuer, mes encadrants Bruno Della-Gaspera (M1) et Olivier Baud (M2) mais aussi l'équipe de mon laboratoire de M1, Julien B. et Julien G., Delphine, Mehdi, GG. Merci aussi aux animaux, Raffa, Julien, Thao, Jérémie et LCB !

Pour finir, merci à mes parents et mon frère, pour leur soutien depuis le début de mes études, et qui, par cette soutenance vont enfin savoir ce que je faisais avec mes souris ! Merci à toute ma bande de FDP (ils se reconnaîtront) pour tous ces débats passionnants et pour avoir été toujours là depuis tant d'années et merci à toute la Jerzal Team, doctorants ou non, grâce à vous tous, impossible de ne pas avoir le moral ! Merci également à Laura, pour son soutien.

Et enfin, merci à Patrick, pour m'avoir soutenue depuis le début de ma thèse jusqu'à aujourd'hui, et qui a toujours été là pour me remonter le moral et m'aider dans les moments de doute et pour avoir supporté les nombreuses crises de nerfs contre Word dans la rédaction de ce manuscrit...

Résumé

Lors de variations de PO_2 et PCO_2 , différents mécanismes se mettent en place afin de maintenir l'oxygénation des tissus, notamment au niveau du métabolisme et de la ventilation. En cas de stimulation hypoxique ou hypercapnique, on observe alors une réponse ventilatoire, caractérisée par une augmentation progressive de la ventilation. Parmi les facteurs qui influencent la réponse à l'hypoxie, on trouve l'érythropoïétine (Epo) qui, en plus de son rôle dans l'érythropoïèse, possède d'autres rôles, notamment au sein du système nerveux central. Cette thèse présente l'étude de l'implication de l'Epo et de différents systèmes de neurotransmission dans les réponses ventilatoires à l'hypoxie (RVH) et à l'hypercapnie (RVHc).

Nous avons alors pu mettre en évidence l'implication du NO, du glutamate et de la sérotonine dans la RVH et dans l'acclimatation ventilatoire à une hypoxie prolongée (VAH) chez un modèle de souris anémique déficient en Epo (Epo-TAg^h) et un animal adapté à la vie en altitude, la plateau Pika. Nous avons ensuite étudié l'impact de la déficience en Epo sur la RVHc, et nous avons confirmé que l'Epo n'était pas nécessaire à l'obtention de la RVHc, tout en mettant en évidence un rôle de l'Epo sur le patron ventilatoire et sur l'implication de certaines structures du système nerveux central dans la mise en place de cette réponse. Une étude en parallèle sur les femelles a permis de mettre en évidence que le cycle oestral n'était pas impliqué dans les réponses ventilatoires mais qu'il semble y avoir une interaction entre l'Epo et les hormones sexuelles femelles dans la RVH et la RVHc. Enfin, différentes expériences réalisées lors de collaborations (Chili, Canada) ont permis d'étudier les effets de l'Epo sur les chémorécepteurs centraux et périphériques dans la mise en place des réponses ventilatoires.

In fine, ces différentes expériences ont permis de préciser les différents facteurs impliqués dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie, ce qui pourrait aider par la suite à mieux comprendre les modifications respiratoires induites par des pathologies liées à l'anémie ou l'exposition prolongée à l'altitude.

Summary

When PO_2 and PCO_2 are modified, various mechanisms are being established to maintain tissue oxygenation, such as ventilation and metabolism adaptations. In case of hypoxia or hypercapnia stimulation, we observed a ventilatory response, characterized by an increase in minute ventilation. Among the factors involved in the hypoxic response, Epo plays a key role. In addition to its role in erythropoiesis, Epo has other functions, especially in the central nervous system. This thesis presents the study of Epo involvement in the ventilatory responses to hypoxia (HVR) and hypercapnia (HcVR).

We demonstrate the involvement of NO, glutamate and serotonin in the HVR and in acclimatization to sustained hypoxia (VAH) in Epo deficient mice (Epo-TAg^h) and in an animal adapted to high altitude, the plateau Pika. Then we studied the impact of Epo-deficiency on HcVR and confirmed that Epo is not mandatory to obtain HcVR but we demonstrate that Epo can modulate the ventilatory pattern and central nervous system structures involvement in this response. During this study, we also demonstrate that in female mice, estrous cycle is not involved in HVR or HcVR but it seems that there is an interaction between Epo and female sexual hormones in these responses. Finally, some experiments in collaboration with different countries (Chile, Canada) allowed us to study the effects of Epo on peripheral and central chemoreceptors during HVR and HcVR.

In fine, these experiments allow us to specify the factors involved in ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia, which could be helpful to better understand respiratory pathologies such as anemia or pathologies associated with high altitude.

Sommaire

Liste des abréviations	9
Liste des figures et tableaux.....	10
INTRODUCTION	11
I. Contrôle de la ventilation.....	11
A. Le réseau neuronal respiratoire.....	11
1. Anatomie du réseau respiratoire	13
2. Rythmogénèse respiratoire.....	20
B. Chemosensibilité.....	22
1. Chémorécepteurs périphériques.....	22
2. Chémorécepteurs centraux.....	25
II. Réponses ventilatoires	28
A. Réponses ventilatoires à l'hypoxie.....	28
1. Réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë (RVH)	28
2. Réponse à l'hypoxie chronique	34
3. Réponse à l'hypercapnie.....	37
4. Hormones sexuelles et réponses ventilatoires	41
B. Etude d'un animal adapté à la vie en haute altitude : le plateau Pika	46
1. Présentation générale et réponse à l'hypoxie.....	46
2. Implication des neurotransmetteurs chez le Pika	48
III. L'érythropoïétine	49
A. Description générale	49
1. Le récepteur transmembranaire à l'Epo (Epo-R)	50
2. Le récepteur soluble à l'Epo (SEpo-R).....	51
3. Epo et système nerveux central.....	52
4. Autres rôles de l'Epo.....	54
B. Epo et adaptations ventilatoires	55
1. Epo et modulation de la ventilation en normoxie.....	56
2. Expression de l'Epo et hypoxie.....	56
3. Epo et hormones sexuelles.....	60
IV. Objectifs de la thèse	62
- Rôle catalyseur de l'Epo sur la voie centrale du NO dans la RVH chez des souris déficientes en Epo (Article 1)	62
- Rôle du glutamate et de la sérotonine dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez une espèce adaptée à la haute altitude : le Plateau Pika (Article 2).....	62
- Comparaison des stratégies ventilatoires mises en place en réponse à l'hypoxie-hypercapnique chez le rat acclimaté et un animal adapté à l'hypoxie : le Plateau Pika (<i>Ochotona Curzoniae</i>) (Article 3).....	63
- Rôle de l'Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	63
- Rôle des hormones sexuelles sur la RVHc	63
- Rôle des chémorécepteurs centraux et/ou périphériques et effets d'une déficience en Epo sur le contrôle de la ventilation en réponse à une stimulation hypercapnique	64
MATERIELS ET METHODES	65
I. Animaux	65

A.	Modèle de souris déficiente en Epo : Souris Epo-TAg ^h	65
B.	Le Plateau Pika.....	66
II.	Pléthysmographie.....	67
III.	Calorimétrie indirect.....	69
IV.	Immunohistochimie c-Fos.....	70
A.	Perfusion des animaux et obtention des coupes.....	70
B.	Immunohistochimie et montage.....	71
C.	Analyse de l'expression de <i>c-fos</i>	72
V.	Méthodes d'étude de l'influence des chémorécepteurs périphériques et centraux sur les réponses ventilatoires.....	72
A.	Chémodénervation.....	72
B.	Etude <i>ex vivo</i> : préparation « en bloc ».....	73
C.	Etude <i>in vivo</i> : enregistrement de l'activité du nerf sinusal.....	75
VI.	Influence des hormones sexuelles femelles sur les réponses ventilatoires.....	76
A.	Réponses ventilatoires et cycle oestral.....	76
B.	Réponses ventilatoires et progestérone.....	77
VII.	Outils pharmacologiques.....	77
A.	Injections d'Epo.....	77
1.	<i>Injection intraveineuse</i>	77
2.	<i>Injection intracisternale</i>	78
B.	Etude de l'implication de la voie du glutamate, du NO et de la sérotonine dans la RVH chez le plateau Pika et la souris.....	79
VIII.	Analyses statistiques.....	80
A.	Statistiques études mâles (Article 4).....	80
B.	Statistiques étude femelles.....	80
	RESULTATS.....	82
I.	Neurotransmetteurs, érythropoïétine et réponse à l'hypoxie.....	83
A.	Rôle catalyseur de l'Epo sur la voie centrale du NO dans la RVH.....	83
B.	Rôle du glutamate et de la sérotonine dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez une espèce adaptée à la haute altitude : le Plateau Pika.....	95
C.	Comparaison des stratégies ventilatoires mises en place en réponse à l'hypoxie-hypercapnique chez le rat acclimaté et le Plateau Pika (<i>Ochotona Curzoniae</i>).....	104
II.	Rôle de l'Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.....	114
A.	Implication de l'Epo dans la RVHc chez les mâles.....	114
B.	Implication de l'Epo dans la RVHc chez les femelles.....	155
1.	<i>Déficience en Epo et ventilation basale chez les femelles</i>	155
2.	<i>Déficience en Epo et RVHc chez les femelles</i>	156
C.	Déficience en Epo et activation neuronale en hypercapnie chez les femelles.....	158
D.	Effets de l'injection de l'Epo sur la RVHc.....	159
1.	<i>Effets de l'injection d'Epo sur la ventilation basale chez les femelles</i>	159
2.	<i>Effets de l'injection d'Epo sur la RVHc chez les femelles</i>	160
E.	Déficience en Epo et influence des hormones sexuelles sur la RVHc.....	161
1.	<i>Phases du cycle oestral et ventilation basale</i>	161
2.	<i>Impact du cycle oestral sur la RVHc</i>	162
3.	<i>Influence de la progestérone sur la RVHc</i>	164
F.	Effet central de l'Epo sur la RVHc.....	166
1.	<i>Fréquence basale</i>	166
2.	<i>Acidose métabolique</i>	167

G.	Effet périphérique de l'Epo sur la RVHc.....	167
1.	<i>Effet de l'Epo sur l'activité des corps carotidiens in vivo en réponse à l'hypercapnie.....</i>	167
2.	<i>Déficience en Epo et impact de la chémodénervation sur la RVHc</i>	169
DISCUSSION		171
I. Ventilation basale : implication de l'Epo, des systèmes de neurotransmission et des hormones sexuelles		171
A.	Déficience en Epo : impact sur les variables ventilatoires, métaboliques et sur l'activation neuronale.....	171
B.	Déficience en Epo et vie en haute altitude	172
C.	Ventilation et métabolisme basal : implication des hormones sexuelles	173
D.	Déficience en Epo et injection d'Epo	173
II. Adaptations ventilatoires lors de la vie en altitude : exemple du plateau pika		175
A.	Stratégies d'adaptation à l'hypoxie et à l'hypoxie-hypercapnique.....	175
1.	<i>Considérations méthodologiques.....</i>	175
2.	<i>Comparaison des adaptations à l'altitude et à l'hypoxie-hypercapnique entre le rat et le Pika</i>	176
B.	Réponses ventilatoires et neurotransmetteurs chez le Pika	178
III. Réponse ventilatoire à l'hypoxie		180
A.	Considérations méthodologiques : lignée Epo-TAg ^h	180
B.	RVH et neurotransmetteurs.....	181
1.	<i>Effet de l'hypoxie chronique sur la production de NO et l'expression de NMDA-R.....</i>	181
2.	<i>Implication du NO et du NMDA-R dans la VAH et la RVH</i>	182
C.	Epo et RVH	183
1.	<i>Déficience en Epo et RVH chez les femelles : compensation par les hormones sexuelles ?... </i>	183
2.	<i>Epo et chémoréception périphérique dans la RVH.....</i>	187
IV. Rôle de l'Epo dans la RVHc.....		189
A.	La déficience en Epo modifie le patron ventilatoire dans la RVHc.....	189
B.	La déficience en Epo modifie la chémosensibilité du bulbe rachidien	190
1.	<i>Activation des structures du bulbe rachidien en réponse à l'hypercapnie.....</i>	190
2.	<i>Différences entre mâles et femelles</i>	192
C.	Injection d'Epo et RVHc.....	193
V. Epo et hormones sexuelles femelles		194
A.	Considérations méthodologiques.....	194
B.	Effet du cycle oestral et de la déficience en Epo sur la RVHc.....	195
C.	Mifepristone, déficience en Epo et RVHc	196
VI. Effets de l'Epo sur les chémorécepteurs		197
Bibliographie		201
Annexe 1		244
Annexe 2		254

Liste des abréviations

5-HT : 5-Hydroxytryptamine (Sérotonine)
AMPA : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
BotC : Complexe de Bötzinger
CCR : Commande Centrale Respiratoire
DRG : Groupe Respiratoire Dorsal
GABA : Acide γ -aminobutyrique
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HRE : Hypoxia Response Element
KF : Kölliker-Fuse
NK1-R : Récepteur Neurokinine 1
NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
NO : Oxyde Nitrique
NRP : Neurones Respiratoires à activité Pacemaker
NTS : Noyau du Tractus Solitaire faisceau commissural (NTSc), médian (NTSm) ou ventro-latéral (NTSvl)
PBr: Parabrachial
PHD : Prolyl-4-hydroxylase
PréBotC : Complexe de Pré-Bötzinger
PRG : Groupe Respiratoire Pontique
RMg : Raphé Magnus
ROb : Raphé Obscurus
RPa : Raphé Pallidus
RTN/pFRG : Noyau Rétrotrapezoïde/Groupe Respiratoire Parafacial
RVHc : Réponse Ventilatoire à l'Hypercapnie
RVH : Réponse Ventilatoire à l'Hypoxie
VAH : Acclimatation Ventilatoire à l'Hypoxie
VLM : Medulla ventro-latérale faisceau caudal (VLMc) ou rostral (VLMr)
VRG : Groupe Respiratoire Ventral

Liste des figures et tableaux

Figure 1	p.13	Figure 29	p.162
Figure 2	p.14	Figure 30	p.165
Figure 3	p.20	Figure 31	p.166
Figure 4	p.23	Figure 32	p.167
Figure 5	p.27	Figure 33	p.168
Figure 6	p.29	Figure 34	p.169
Figure 7	p.31	Figure 35	p.174
Figure 8	p.35	Figure 36	p.184
Figure 9	p.36	Figure 37	p.185
Figure 10	p.38	Figure 38	p.186
Figure 11	p.43	Figure 39	p.188
Figure 12	p.51		
Figure 13	p.52	Tableau 1	p.44
Figure 14	p.53	Tableau 2	p.47
Figure 15	p.56	Tableau 3	p.66
Figure 16	p.61	Tableau 4	p.155
Figure 17	p.65	Tableau 5	p.158
Figure 18	p.68	Tableau 6	p.159
Figure 19	p.71	Tableau 7	p.162
Figure 20	p.72	Tableau 8	p.163
Figure 21	p.74	Tableau 9	p.164
Figure 22	p.74	Tableau 10	p.169
Figure 23	p.75	Tableau 11	p.181
Figure 24	p.76		
Figure 25	p.78		
Figure 26	p.156		
Figure 27	p.157		
Figure 28	p.160		

INTRODUCTION

I. Contrôle de la ventilation

Le renouvellement de l'air dans les alvéoles pulmonaires est assuré par la contraction rythmique des muscles striés squelettiques du compartiment thoraco-abdominal, principalement le diaphragme. Le contrôle de cette rythmique de contraction implique un réseau neuronal qui permet de générer la commande centrale respiratoire (CCR). La découverte de ce réseau neuronal a nécessité de nombreuses approches expérimentales, notamment chez le chat et le rongeur afin de mettre en évidence les composants de ce réseau. Ces expériences ont montré l'implication d'un réseau neuronal localisé au niveau du bulbe rachidien et du pont. La CCR élaborée par ce réseau est alors transmise aux muscles respiratoires via des motoneurons respiratoires dont le corps cellulaire est localisé au niveau du bulbe rachidien et de la moelle épinière. La coordination entre les muscles respiratoires et des voies aériennes supérieures permet d'obtenir un cycle respiratoire qui se décompose en 3 étapes : inspiration (I), post-inspiration (E1) et expiration tardive (E2). Ce réseau respiratoire est en permanence influencé par des informations provenant d'éléments de régulation qui peuvent notamment être chémosensibles via des récepteurs périphériques (corps carotidiens) ou centraux (SNC) ou bien mécanosensibles via des récepteurs localisés au niveau des poumons et du pharynx et qui sont sensibles à l'étirement (Funk & Greer, 2013).

A. Le réseau neuronal respiratoire

Les observations portant sur la localisation du réseau neuronal responsable de la ventilation ont démarré dès l'antiquité, au 2^{ème} siècle. Galien avait observé qu'une section de la moelle épinière au niveau sous-bulbaire entraînait un arrêt respiratoire conduisant à la mort du sujet. Ces premières observations montraient déjà une origine supra-spinale de l'activité respiratoire. C'est ensuite au 18^{ème} siècle qu'une étude menée par Lorry sur le lapin a permis d'observer, après ablation du cervelet et des deux hémisphères cérébraux, une persistance des mouvements respiratoires, excluant donc que ces régions soient le siège de l'élaboration de la CCR (Lorry, 1760). Des expériences plus poussées consistant en des sections étagées du tronc cérébral (Flourens, 1842, 1851; Legallois, 1812) ont permis de mettre en évidence la localisation d'un réseau responsable du contrôle de la respiration au sein de la région ponto-bulbaire. Ce n'est qu'à partir du 20^{ème} siècle que

les centres respiratoires ont été localisés au sein du pont et du bulbe rachidien via des expériences de lésions et de stimulations électriques localisées (Hoff & Breckenridge, 1949; Lumsden, 1923a, 1923b; Pitts, 1939; Pitts, 1941, 1946). Même si l'on n'utilise plus aujourd'hui la même dénomination, ces études ont permis la mise en évidence des centres régulateurs de la ventilation (pneumotaxique, apneustique, inspiratoire et expiratoire). La localisation précise de ces structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la ventilation a commencé au milieu du 20^{ème} siècle par des études faites sur le chien. Ces expériences ont permis d'enregistrer l'activité électrique de neurones dont la décharge était en phase avec l'inspiration ou l'expiration (Gesell, 1936, 1940). Depuis, d'autres expériences ont été effectuées sur d'autres modèles (chat, rat, souris, etc.) et dans de nombreuses conditions expérimentales, ce qui a permis d'obtenir une connaissance plus précise de l'organisation du réseau neuronal respiratoire. Il a de plus été mis en évidence que l'intégrité de ce réseau était indispensable à l'obtention d'un cycle respiratoire en trois phases (I, E1, E2) (Smith, 2007).

L'étude de la décharge des neurones respiratoires a permis de définir 6 catégories de neurones respiratoires (Bianchi, 1995; Bianchi & Gestreau, 2009), qui ont été définies selon l'évolution de la fréquence de décharge des neurones : une activité croissante (Augmentation, Aug) ou décroissante (Decrementing, Dec), ayant lieu pendant la phase inspiratoire (I), expiratoire (E) ou de transition (Figure 1).

Les catégories sont les suivantes :

- **Décharge pendant l'inspiration** : neurones Early-I (fréquence maximale en début d'inspiration) et I-Aug (fréquence maximale en fin d'inspiration).

- **Décharge pendant la transition entre inspiration et expiration** : neurones Late-I (décharge pendant la transition de l'inspiration à l'expiration) et Pre-I (décharge pendant la transition de l'expiration à la l'inspiration).

- **Activité pendant la phase post-inspiratoire** : neurones post-I (décharge maximale au début de la phase E1).

- **Décharge pendant la phase d'expiration active** : neurones E-Aug (fréquence maximale en fin d'expiration).

Certains neurones ont aussi la capacité de décharger tout le long du cycle respiratoire tout en augmentant leur fréquence pendant l'inspiration (I-Tonic) ou l'expiration (E-Tonic) (St.-John, 1998).

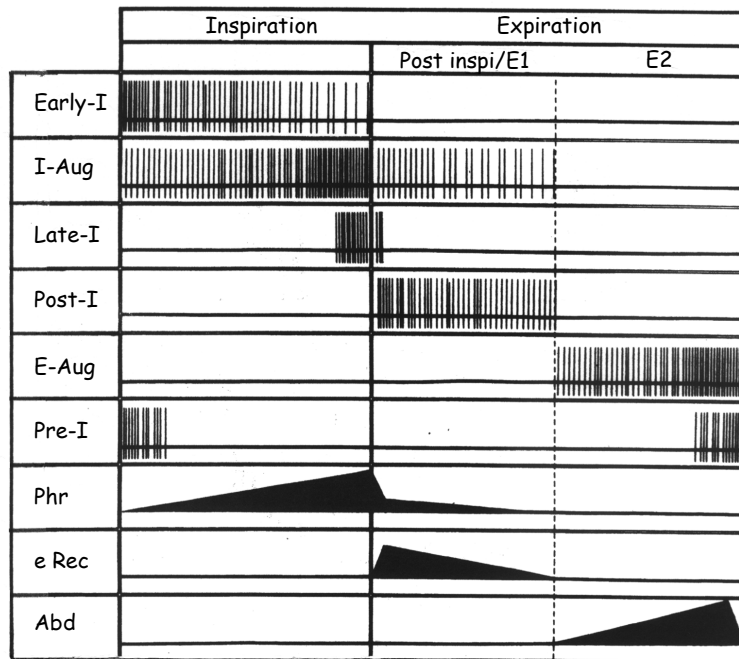


Figure 1 : Représentation schématique des 6 modalités de décharge des neurones phasiques respiratoires au cours du cycle respiratoire. Les phases du cycle respiratoire sont définies par rapport à l'activité des nerfs contrôlant la contraction des muscles respiratoires. Le nerf phrénique (Ph) est actif pendant l'inspiration et présente une activité résiduelle durant la post inspiration ou première phase de l'expiration (Post-I ou E1). La branche expiratoire du nerf laryngé récurrent (e Rec) est active durant la post inspiration ou première partie de l'expiration (Post-I ou E1). Le nerf lombaire (Abd) est actif pendant la seconde phase expiratoire (E2). Abréviations : Early-I : inspiratoire précoce, I-Aug : inspiratoire à activité croissante, Late-I : inspiratoire tardif, Post-I : post-inspiratoire, E-Aug : expiratoire à activité croissante, Pre-I : pré-inspiratoire (Bianchi et al., 1995).

1. Anatomie du réseau respiratoire

Le réseau neuronal à l'origine de l'élaboration de la CCR est localisé au niveau ponto-bulbaire. Au sein de cette structure, on distingue un groupe dorsal (groupe respiratoire dorsal, DRG) et une colonne ventrale bilatérale, qui contient la majorité des structures respiratoires (Alheid, 2008 ; Greer, 2013).

a) Les structures bulbaires

Au niveau bulbaire, on distingue des structures respiratoires en position dorsale (DRG) et ventrale (VRG) (A. Bianchi, 1995) (Figure 2).

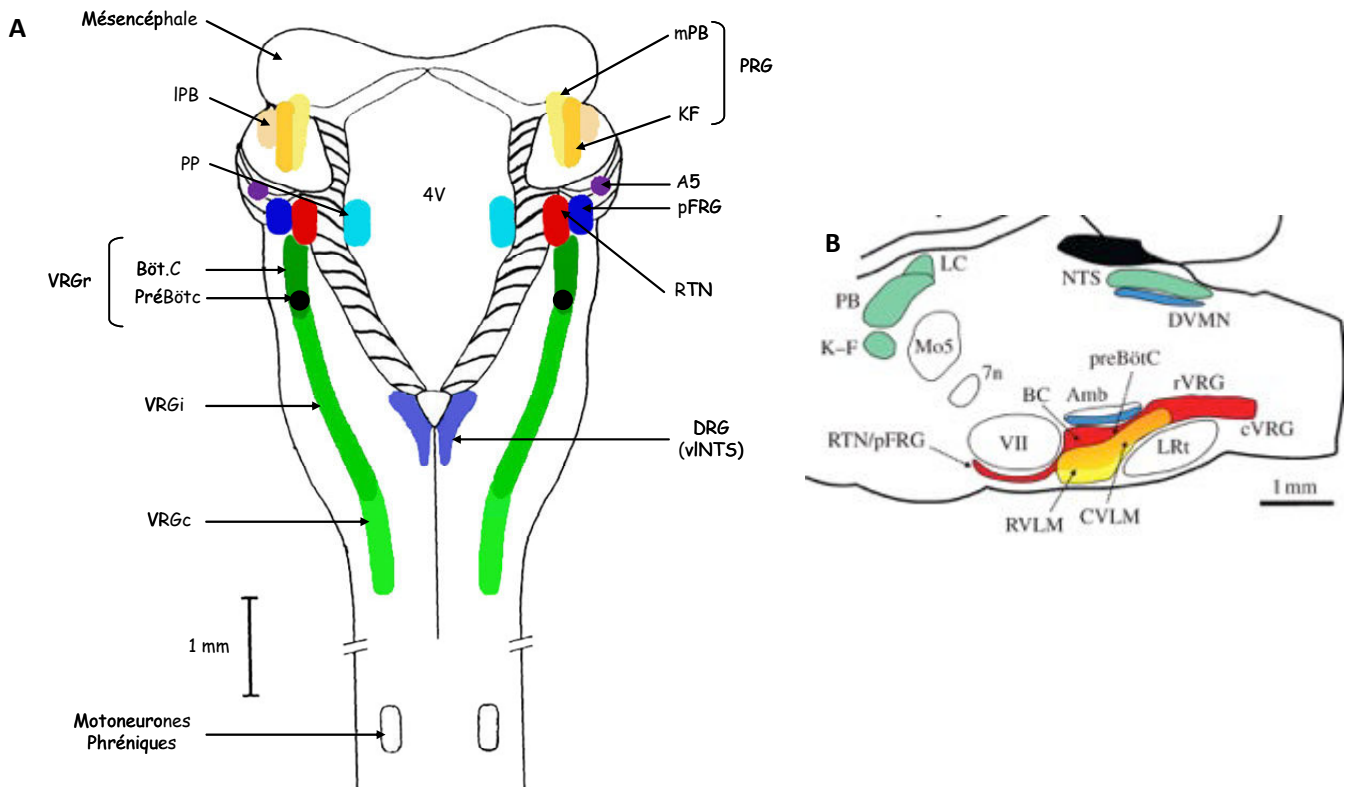


Figure 2 : Neuro-anatomie des différentes régions respiratoires (d'après Rekling & Feldman, 1998; Spyer & Gourine, 2009). Organisation des régions respiratoires d'après une vue dorsale (A) et latérale (B) du tronc cérébral chez le rat. Abréviations : 4V, quatrième ventricule ; 7-VII, noyau facial ; A5, groupe neuronale noradrénergique ; AmbC, partie compacte du noyau ambigu ; BötC, complexe de Bötzinger ; cVRG, groupe respiratoire ventral caudale ; DRG, groupe respiratoire dorsale ; KF, noyau de Kölliker-Fuse ; LPB, noyau parabrachial latéral ; mPB, noyau parabrachial médian ; LRt, noyau réticulaire latéral ; Mo5, noyau moteur du nerf trijumeau ; NTS, Noyau du tractus solitaire ; pFRG, groupe respiratoire parafacial ; PP, groupe pyramidal ; preBötC, complexe de Pré-Bötzinger ; PRG, groupe respiratoire pontique ; RTN, noyau rétrotrapézoïde ; rVRG, groupe respiratoire ventral rostral ; vINTS, sous-division ventrolatéral du NTS ; VRG, groupe respiratoire ventrale

Structures dorsales

Le NTS est la structure respiratoire majeure retrouvée au niveau dorsal du bulbe rachidien. Cette structure possède plusieurs sous-divisions, les trois principales étant les suivantes : une sous-division centrale, le NTS commissural (NTSc), et deux régions bilatérales, le NTS médian (NTSm) et ventrolatéral (NTSvl). Le NTSc et le NTSm sont connus pour être des zones de projection des afférences provenant des chémorécepteurs périphériques (Accorsi-Mendonça, 2011; Andresen & Peters, 2008; Ciriello, 1994; Ciriello & Moreau, 2013; Finley & Katz, 1992; Kline, 2010; Torrealba & Calderon, 1990; Torrealba & Claps, 1988; Zhang & Mifflin, 2007). Le groupe respiratoire dorsal contient majoritairement des neurones inspiratoires localisés au niveau du NTSvl. Des études menées sur le chat (Fedorko, 1983) ont montré une forte projection (65%) du NTSvl au nerf phrénique, mais une faible projection (14%) chez le rat (D. de Castro, 1994). L'étude du phénotype des neurones du NTS a

permis de mettre en évidence que cette région contenait des neurones noradrénergiques (Freiria-Oliveira, 2015; Koda & Bloom, 1983; Simonian & Herbison, 1996) ainsi que des neurones exprimant les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA (Aicher, 2000; Bailey, 2008; Kihara & Kubo, 1991; Ohtake, 2000; Pawloski-Dahm & Gordon, 1992; Saha, 2001; Weston, 2003; Whitney, 2000). L'implication de cette région dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie sera détaillée plus tard (Cf. Introduction-II), mais il semblerait que le NTS ait un rôle majeur dans la réponse à l'hypoxie.

Structures ventrales

Le groupe respiratoire ventral est composé de plusieurs structures s'organisant le long de l'axe rostro-caudal du bulbe rachidien.

- **VRG** : Le groupe respiratoire ventral est une structure bilatérale localisée dans la partie ventrolatérale et caudale du bulbe rachidien. Il est séparé en deux régions : une région caudale (VRGc) qui contient des neurones expiratoires et une région rostrale qui contient le groupe principal de neurones inspiratoires qui transmettent la commande inspiratoire aux motoneurones phréniques. Ces deux régions (VRGc et VRGr) se projettent et reçoivent des afférences de trois structures essentielles à mise en place de la CCR : le noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG), une autre structure ventrale qui sera détaillée plus loin, et deux structures bilatérales comprises dans le VRG :

- **Le complexe de Bötzing (BotC)**: il est composé majoritairement de neurones expiratoires (Alheid & McCrinmon, 2008; Smith, 2007). Il a été démontré que les neurones GABAergiques et glycinergiques de ce complexe inhiberaient les neurones inspiratoires ce qui permettrait la transition inspiration/expiration du cycle respiratoire.
- **Le complexe de pré-Bötzing (PreBotC)** : c'est une structure bilatérale caudale au BotC et essentielle à la mise en place du rythme respiratoire (Smith, 1991). Ce complexe est composé majoritairement de neurones glutamatergiques qui expriment de nombreux récepteurs spécifiques (récepteur à la Neurokinin-1, NK1-R ; Somatostatine, SST ; facteur de transcription Dbx1) (Bouvier, 2010; Gray, 2010). Des expériences ont mis en évidence que l'inactivation du gène Dbx1 entraînait l'inactivité du pré-BotC (Bouvier, 2010) et que la diminution des neurones exprimant NK1-R entraînait une respiration ataxique chez le rat (Gray, 2001) et la mort post-natale chez la souris (Hilaire, 2003). Le complexe de pré-

Botc est donc essentiel dans l'élaboration de la CCR. De récentes études ont permis de montrer que ce complexe contenait également des neurones GABAergiques (Kuwana, 2006), qui possèdent des propriétés chémosensibles au CO₂, et des neurones glycinergiques (Winter, 2009).

Le VRG est composé d'une dernière structure, adjacente au BotC et PreBotC, nommée la **médulla ventrolatérale**. Cette structure est localisée au niveau caudal du bulbe rachidien. Elle est divisée en deux régions : une caudale (VLMc) et une rostrale (VLMr). Malgré les nombreuses expériences réalisées ces dernières années sur la neuro-anatomie respiratoire, cette région a été ignorée et peu d'études se sont intéressées à sa fonction. Il semble néanmoins que cette structure possède des propriétés de chémosensibilité au CO₂ (Richerson, 2001; Wakai, 2015).

- **Le RTN/pFRG** : cette structure bilatérale est localisée à la surface ventrale du bulbe rachidien, sous le noyau facial (Smith, 2007). Cette structure était constituée d'un groupe de neurones présentant une activité rythmique pré-inspiratoire et semblait chevaucher le RTN (Onimaru & Homma, 2003). Des études récentes ont permis de caractériser le phénotype de ces neurones, montrant ainsi l'expression de Phox2B, VGlut2 et Atoh1 chez le rat (Ruffault, 2015; Stornetta, 2006; Kang, 2007). Plus récemment, il a été mis en évidence la présence de neurones glutamatergiques au niveau du RTN (Holloway, 2015; Mulkey, 2004). Les neurones exprimant les facteurs Phox2B, VGlut2 et Atoh1 ont été montrés comme étant essentiels à la mise en place de la réponse respiratoire au CO₂ aussi bien chez l'adulte (Stornetta, 2006) que chez le nouveau-né (Wang, 2013)

Le pFRG a été découvert par l'équipe de Hiroshi Onimaru lors d'études *ex vivo* chez le nouveau-né (Onimaru, 1987). Une hypothèse récente évoque la possibilité que le RTN et le pFRG soient un même noyau mais à des âges différents, suggérant une évolution au cours du développement (Thoby-Brisson, 2009). Outre le fait que cette structure soit aussi sensible au CO₂ (Onimaru, Ikeda, & Kawakami, 2008), son rôle reste à définir. Il a été démontré que ces neurones étaient impliqués dans l'expiration active (Fortuna, 2008; Molkov, 2010; Pagliardini, 2011; Silva, 2016).

Si les expériences ayant étudié le RTN et/ou le pFRG ont été réalisées chez des individus dans l'âge était supérieur à 7 jours, il a été mis en évidence la présence d'un oscillateur autonome, appelé le groupe embryonnaire parafacial (e-pF) en période péri-natale (Onimaru, 2008 ; Thoby-Brisson, 2009). La caractérisation des neurones de cette structure a montré qu'ils exprimaient des facteurs similaires au RTN/pFRG, à savoir VGLU2, NK1-R et Phox2B. (Thoby-Brisson, 2009).

- **Les raphés bulbaire**s : Cette région est composée de deux structures médiales, le raphé Obscurus (ROb) et le raphé Pallidus (RPA) et d'une structure bilatérale, le raphé Magnus (RMg). De nombreuses études se sont intéressées à cette région, et ont démontré un rôle physiologique dans le contrôle de la ventilation en condition normocapnique ainsi qu'en hypercapnie (Dias, 2007; Holtman, 1990; Hosogai, Matsuo, 1998). Ces régions contiennent des populations de neurones glutamatergiques (Minson, 1991; Nicholas, 1992) et sérotoninergiques (Richerson, 2001). De récentes expériences ont permis de mettre en évidence un rôle crucial des neurones sérotoninergiques présents dans les raphés dans la mise en place de la commande central respiratoire (Ray, 2011; Richerson, 2004). C'est la partie rostrale des raphés qui comprend le plus grand pourcentage de neurones sérotoninergiques (Gao & Mason, 2001). Différentes études se sont intéressées à l'implication de ces neurones sérotoninergiques dans les réponses ventilatoire, ce qui a permis de montrer que les neurones sérotoninergiques n'étaient pas impliqués dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Da Silva, 2013) mais qu'ils seraient impliqués dans la sensibilité au CO₂ et/ou au pH (Nattie, 2004; Richerson, 2004). Enfin, il a également été mis en évidence que les neurones sérotoninergiques exprimaient aussi NK1-R (Lacoste, 2006) et que la voie de signalisation associée au NK1-R (substance P) aurait un rôle régulateur dans la libération de la sérotonine (Guiard, 2007).

De part son rôle important dans la régulation centrale de la ventilation, il a été démontré que des modifications dans la synthèse ou l'activité de la sérotonine pouvait induire des dérégulations de la ventilation, tout au long du développement. On peut prendre l'exemple du syndrome de Rett qui est une maladie qui se caractérise par des déficits respiratoires (apnées, irrégularités du rythme respiratoire) ayant une prévalence pendant l'état d'éveil (Weese-Mayer, 2006, 2008) et qui peuvent provoquer une mortalité pour 25% des patients touchés. Cette maladie est due à une mutation du gène *Mecp2*, qui entraîne une diminution de l'expression de 5-HT au niveau cérébral (Katz, 2009; Manzke, 2008). De nombreuses expériences ont montré, chez des souris mutantes pour *Mecp2*, des anomalies respiratoires chez le nouveau-né et jusqu'à P30 (Voituron, 2010) associé à une absence de réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Voituron, 2009). Après P30, il a été observé une augmentation des irrégularités respiratoires associées à des apnées de plus en plus graves, qui entraînent la mort à environ P60 (Viemari, 2005). Une autre pathologies est la mort subite du nourrisson (SIDS, pour Sudden Infant Death Syndrome) dont les causes restent toujours à déterminé mais qui semble impliqué un défaut de 5-HT, comme le démontrent les examens post-mortem (Duncan, 2010; Paterson, 2006, 2009)

b) *Les structures pontiques*

Certaines structures de la région rostrale du bulbe rachidien se prolongent jusqu'au pont et forment ainsi d'autres groupes de neurones distincts des neurones du bulbe rachidien, qui possèdent donc leur propre fonction. De nombreuses études ont montré une implication des structures pontiques dans la transition inspiration/expiration. En effet, lorsque le pont et le bulbe rachidien, les trois phases du cycle respiratoire sont observées comme décrites précédemment. En revanche, si le pont est supprimé, on observe un cycle respiratoire en deux phases (inspiration/expiration) car la phase de post-inspiration a été perdue. Les structures pontiques joueraient donc un rôle dans la transition inspiration/expiration mais aussi dans la phase de post-inspiration, qui a une fonction importante puisque c'est pendant cette phase qu'ont lieu les comportements moteurs qui nécessitent des ajustements ventilatoires (déglutition, défécation)(Bautista, 2010; Gestreau, 2000; Hudson, 2011).

- **Pont ventrolatéral / A5** : cette région est décrite comme étant une zone de projection de structures de la colonne ventrolatérale décrite précédemment et associée avec un groupe de neurones noradrénergiques nommé A5. Seule une faible proportion de neurones catécholaminergiques est présente dans cette zone. L'étude des rôles de cette zone a montré qu'elle exerçait une action inhibitrice sur le générateur du rythme respiratoire (Hilaire, 2004) *via* les récepteurs noradrénergiques α_2 (Zanella, 2007). Dans ces différentes études, la modulation du générateur du rythme respiratoire passait par une interaction entre la région A5 et un autre groupe de neurones noradrénergiques de taille plus importante, nommée A6. Récemment, il a également été mis en évidence le rôle crucial de la région A6 et de la noradrénaline dans la mise en place d'un rythme respiratoire normal chez la souris (Viemari, 2004).

Les rôles de cette région restent encore mal connus mais il semble qu'elle soit impliquée dans la mise en place de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Okada, 1998) Ces résultats ont depuis été largement confirmés et précisés dans plusieurs études montrant que la région A5 permettait de réguler la RVH, et que cela mettrait en jeu la voie de signalisation du NO et les NMDA-R (Pyatin, 2005, 2006, 2015). L'hypoxie entraîne aussi l'activation de neurones expiratoires dans cette zone (Dick & Coles, 2000).

- **Groupe respiratoire pontique (PRG)**: en remontant au niveau dorsal du pont, on trouve le PRG, qui est composé de deux groupes de neurones respiratoires nommés le noyau Kölliker-Fuse (KF) et le parabrachial médian (PBr). Ce dernier est composé d'une partie médiale et d'une partie latérale. La particularité de ces régions vient du fait que l'on n'y retrouve pas une population homogène unique de neurones. Une grande variété de neurones inspiratoires (I, E-I, I-E) et expiratoires (E, E-Dec, E-Aug)

y a été observée (Ezure & Tanaka, 2006; Song, 2006), suggérant un rôle de ces régions dans la transition inspiration/expiration. Il a notamment été mis en évidence que les neurones du PRG seraient un relai entre les centres respiratoires du bulbe rachidien et les structures pontiques (Bianchi, 1995). De nombreuses projections de la colonne ventrolatérale ainsi que du NTS (ventrolatéral) se retrouvent au niveau du KF (Ezure & Tanaka, 2006; Yokota, 2011). Plus récemment, il a été mis en évidence que les neurones du NTS et du RTN activés par une stimulation hypoxique envoyaient des projections au niveau du KF (Song, 2011). Suite à ces observations, il a été montré que l'activité du muscle génioglosse obtenue par stimulation du RTN était diminuée en cas d'inhibition du KF. Très peu d'études se sont intéressées à l'implication de cette structure dans la mise en place des réponses ventilatoires. En 1985, Bonis a montré qu'une lésion dans cette région n'avait aucun effet sur la phase d'hyperventilation et de roll-off en réponse à l'hypoxie chez la chèvre (Bonis, 2010) mais un effet après le roll-off, principalement au niveau métabolique. En 1997, Teppema a mis en évidence une activation neuronale au niveau du KF en réponse à l'hypercapnie chez le rat (Teppema, 1997). Le même résultat a été obtenu par l'équipe de Nitsos, toujours en 1999, avec la caractérisation phénotypique des neurones qui a montré que les neurones du KF activés par l'hypoxie étaient catécholaminergiques (Nitsos & Walker, 1999). Récemment, des travaux ont mis en évidence que les neurones du KF étaient activés en hypercapnie (Berquin, 2000; Yokota, Kaur, 2015) et en hypoxie (Berquin, 2000). De plus, des lésions au niveau du PB et du KF ont entraîné la perte de réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Mizusawa, 1995).

2. Rythmogénèse respiratoire

On sait aujourd'hui que le rythme respiratoire est généré au niveau de structures localisées au niveau ponto-bulbaire. Néanmoins, les mécanismes qui permettent la mise en place de la commande centrale respiratoire à l'origine de la rythmogénèse sont encore débattus. On distingue dans la littérature trois hypothèses majeures : le modèle réseau, le modèle pacemaker et le modèle hybride (Figure 3).

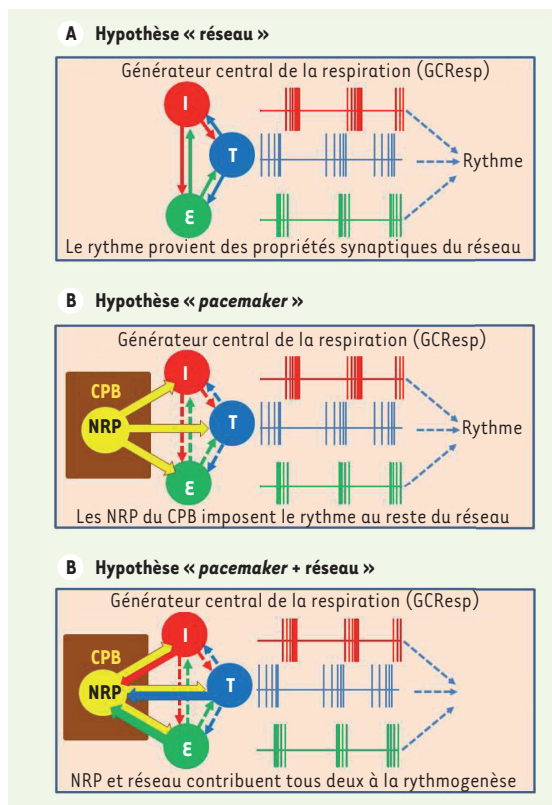


Figure 3 : Hypothèses sur l'origine du rythme respiratoire.

(D'après Viemari, 2013)

A : Modèle réseau

B : modèle pacemaker

C : Modèle hybride

a) *Modèle réseau*

Les premières études sur l'automatisme respiratoire avaient au départ suggéré que le rythme respiratoire était contrôlé par les propriétés du réseau neuronal. En effet, selon ce modèle (Figure 3A), ce sont les actions excitatrices et/ou inhibitrices des neurones et leur activité en fonction des phases du cycles respiratoire qui étaient à l'origine du rythme respiratoire.

b) *Modèle pacemaker = découverte du complexe de pré-Bötzinger*

Au 19^{ème} siècle, Flourens mets en évidence, chez les mammifères, l'existence d'une structure localisée au niveau du bulbe rachidien dont la lésion provoque l'arrêt de la respiration (Flourens, 1842, 1851). Les études sur cette zone ont été nombreuses mais ce n'est qu'en 1984 que l'équipe de Suzue a montré chez le rat nouveau-né et chez le poisson la persistance de la CCR *ex vivo* sur une préparation dépourvue d'afférences périphériques et supérieurs (Suzue, 1984). Suite à cela, des études sur des modèles *ex vivo* (Onimaru, 1987, 1988, 1989) ont permis de décrire une région du bulbe rachidien dont la stimulation provoque des inspirations et dont la lésion abolit la rythmicité respiratoire. Ce sont finalement les travaux menés par Smith en 1991 qui permettront de nommer cette zone complexe de pré-Bötzinger suite à la découverte de neurones respiratoires ayant une activité pacemaker (NRP) dans cette zone. C'est à partir de ce moment là que le modèle pacemaker a été suggéré (Smith, 1991).

Selon le modèle pacemaker, les NRP contrôlent tout le réseau neuronal respiratoire, qui a donc une position de suiveur. Ce sont les NRP qui agissent sur le réseau neuronal qui va en retour modifier son action. Le fonctionnement du pré-BotC a ensuite été largement étudié ce qui a permis de mettre en évidence une relation entre RTN et pré-BotC en fonction du stade de développement. Chez le rat, le rythme respiratoire élaboré *in vitro* lors des stades embryonnaires précoce présente une grande variabilité, mais il se stabilise dès l'apparition des NRP (Di Pasquale, 1994). De plus, il a été mis en évidence que lors du développement, le RTN/pFRG était fonctionnel plus tôt que le pré-BotC. Cette observation a suggéré le rôle de générateur de secours du RTN/pFRG. Ce dernier pourrait prendre le relais, par exemple en cas de défaillance du Pré-BotC (Mellen, 2003). Le RTN/pFRG pourrait également interagir avec donc le pré-BotC (Champagnat, 2011; Thoby-brisson, 2005). D'autres études ont permis de mettre en évidence que la maturation et le fonctionnement du pré-BotC sont modulés par les systèmes sérotoninergiques et catécholaminergiques (Bou-Flores, 2000; Viemari, 2004, 2005; Zanella, 2008).

Même si il est aujourd'hui admis que le pré-BotC joue un rôle crucial dans la mise en place de la CCR, il existe encore de nombreux débats, comme par exemple celui du rôle du pré-BotC chez le nouveau-né vs le sujet adulte et sur le rôle des NRP. Pour la première question, l'hypothèse est que le pré-BotC aurait un rôle moindre chez l'adulte. Néanmoins, des études ont mis en évidence l'existence et la fonctionnalité du pré-BotC chez le rat adulte (Tan, 2008, 2012). Chez l'homme, une structure pouvant être considérée comme étant le pré-BotC a été observée et semblait impliquée dans les pathologies respiratoires des patients (Schwarzacher, 2011).

c) *Modèle hybride*

L'apparition du modèle pacemaker a permis de mettre en évidence le rôle du preBotC, qui agirait comme un métronome respiratoire. Néanmoins, il reste à déterminer l'action des NRP sur le réseau respiratoire, et savoir si ces derniers sont indispensables ou non pour permettre l'automatisme respiratoire. Cela suggère un dernier modèle, qui est celui le plus accepté à l'heure actuelle, le modèle hybride. Il combine l'activité pacemaker et le réseau neuronal dans l'établissement de la CCR. Dans ce modèle, les NRP et le réseau peuvent agir en amont l'un de l'autre, ce qui pourrait apporter une sécurité supplémentaire dans le fonctionnement du générateur du rythme respiratoire.

B. Chémosensibilité

Chez les mammifères, la pression partielle en oxygène dans le sang artériel (PaO_2) est comprise entre 80 et 100mmHg et celle en dioxyde de carbone (PaCO_2) se situe autour de 40mmHg. Une diminution de la quantité d' O_2 dans l'air inspiré ou un frein à l'inspiration peuvent entraîner une diminution de la PaO_2 (et de PtO_2), on parle alors d'hypoxie. A l'inverse, une augmentation de la quantité de CO_2 dans l'air inspiré ou un frein à l'expiration peuvent entraîner une augmentation de la PaCO_2 (et de PtCO_2). On parle cette fois d'hypercapnie qui s'accompagne d'une acidose.

Au sein de l'organisme, il existe des structures sensibles aux moindres variations de PO_2 ou PCO_2 , qui sont les chémorécepteurs. Il en existe deux types : périphériques et centraux.

1. Chémorécepteurs périphériques

La découverte des corps carotidiens a eue lieu dès le 18^{ème} siècle. A cette époque, Albrecht von Haller et son étudiant Taube parlent de « ganglion exiguum » ou « ganglion minutuum » qu'ils décrivent comme une masse tissulaire ressemblant à un ganglion et localisée à la bifurcation de la carotide commune (Taube, 1743). Le rôle sensitif du corps carotidien a lui été découvert en 1927 par De Castro (De Castro, 1926) qui a établi l'afférence du nerf glossopharyngien à partir des corps carotidiens. Quant à son rôle fonctionnel dans l'homéostasie cardiorespiratoire, il a été mis en évidence par Jean-François et Corneille Heymans, ce qui a valu à ce dernier le prix Nobel en 1938

(Heymans, 1927, 1930, 1933, 1965). On trouve aussi les corps aortiques, situés sur l'arc ascendant de l'aorte. Des études menées dans les années 80 ont montré que les corps aortiques étaient sensibles aux variations de PaO₂, mais que leur réponse était moins importante que les corps carotidiens (Hatcher, 1978; Lahiri, 1980, 1981a, b).

Le corps carotidien est une structure bilatérale située au niveau du cou. Il est situé chez l'homme au niveau des artères carotides communes (droite et gauche), à l'endroit où ces dernières se séparent pour donner les artères carotides internes et externes (Figure 4). La localisation vis à vis des vaisseaux adjacents ainsi que la taille des corps carotidiens peuvent varier en fonction des espèces.

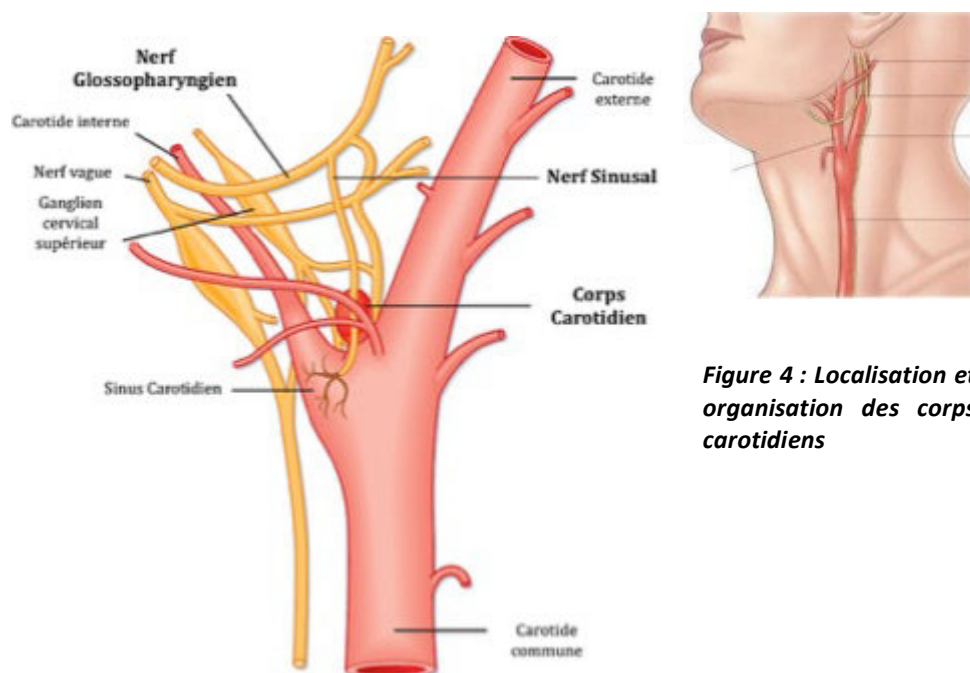


Figure 4 : Localisation et organisation des corps carotidiens

Au niveau de leur composition, on trouve deux types cellulaires majeurs. Tout d'abord les cellules de types I, qui sont des cellules d'origine neuronale, caractérisées par l'expression de marqueurs typique des cellules neurales et gliales tels que la tyrosine hydroxylase (TH), la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), la β III-Tubuline (Kameda, 1993) ou encore le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF), le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF) ou du cerveau (BDNF) (Izal-Azcárate, 2008). La fonction de ces cellules reste encore débattue mais il a déjà été démontré une sensibilité à l'hypoxie et pourraient jouer un rôle de transducteur (Donnelly, 2000, 2007; López-Barneo, 2003; López-López, 1989; Mitchell, 1972; Peers, 1990; Pietruschka & Acker, 1985). Les autres cellules des corps carotidiens sont les cellules de type II, qui sont associées aux cellules de types I et qui représentent environ 20% d'un corps carotidien (De Kock, 1954). On donne à ces cellules un rôle semblable aux cellules gliales puisqu'elles expriment des facteurs tels que la protéine de liaison du

calcium (S-100) (Kondo, 1982), la GFAP (Nurse & Fearon, 2002) et la vimentine (Kameda, 1996). La principale différence par rapport aux cellules de type I vient du fait que ces cellules ne sont pas sensibles à l'hypoxie, mais joueraient un rôle important dans la plasticité du corps carotidien.

Au niveau de son innervation, le corps carotidien est relié au nerf glossopharyngien par le nerf sinusal carotidien. Il a été mis en évidence que les voies nerveuses efférentes des corps carotidiens joueraient un rôle dans la modulation de leur chémosensibilité (Eyzaguirre & Lewin, 1961b; McCloskey, 1975; Purves, 1970) *via* une régulation du débit sanguin au niveau des corps carotidiens (Neil & O'Regan, 1971; O'Regan, 1975, 1981; Sampson, 1972; Verna, 1984).

L'étude des voies nerveuses a montré que les neurones situés au niveau des corps carotidiens possédaient des projections situées au sein du système nerveux central, au niveau du NTS (commissural et médian) (Berger, 1979; Cistulli & Sullivan, 1994; Davies & Kalia, 1981; Finley & Katz, 1992; Housley, 1987; Massari, 1996; Panneton & Loewy, 1980).

La sensibilité des corps carotidiens aux variations d'oxygène a été largement étudiée et établie, notamment par des expériences qui ont montré qu'une chute de la PaO₂ entraînait une augmentation de la fréquence de décharge du nerf sinusal carotidien (Alvarez-Buylla, 1951; Biscoe, 1970; Eyzaguirre & Lewin, 1961a; Horbein, 1961; von Euler, Liliestrand, & Zotterman, 1939). Cette réponse à l'hypoxie se fait de manière rapide. En effet, face à un stimulus hypercapnique, la réponse des corps carotidiens présentait un temps de latence de 0.2 à 0.3sec pour un pic à 1-2sec post-stimulation (Black, 1971; Ponte & Purves, 1974). Dans ces deux études, il a été mis en évidence que la réponse à un stimulus hypoxique était plus lente. La chémosensibilité des corps carotidiens aux variations de PaCO₂ ou de pH aussi a été étudiée mais reste aujourd'hui débattue. Néanmoins, de plus en plus d'études ont montré une augmentation de la fréquence de décharge des corps carotidiens en réponse à l'hypercapnie (Bruce & Cherniack, 1987; Heeringa, 1979; Nattie, 1999). De plus, il semble exister un lien entre la chémosensibilité des corps carotidiens et celle des chémorécepteurs centraux (Blain, 2010; Dahan, Nieuwenhuijs, & Teppema, 2007). Une récente étude faite chez le chien a montré que les corps carotidiens permettraient de déterminer la sensibilité des chémorécepteurs centraux au CO₂ (Smith, 2015).

2. Chémorécepteurs centraux

La chémoréception centrale décrit la détection des changements de PaCO_2 , de PaO_2 ou de la concentration des ions H^+ au niveau cérébral qui induisent des modifications ventilatoires. Chez l'animal non anesthésié, la sensibilité aux variations du pH dans le liquide céphalo-rachidien est très élevée (Pappenheimer, 1965). Une étude chez la chèvre a montré qu'une faible diminution de pH, de 7,3 à 7,25 était suffisante pour doubler la ventilation alvéolaire. L'existence d'une chémosensibilité centrale a été mise en évidence en 1954 par Leusen, qui a montré que l'application de fluides acides au niveau des ventricules cérébraux entraînait une augmentation de la ventilation (Leusen, 1954a). L'application de ce même fluide dans des zones plus précises a permis de mettre en évidence des aires plus définies (Loeschcke, 1982; Mitchell & Ham, 1998; Trouth, 1973). Ces zones étaient localisées sur la surface ventrale du bulbe rachidien (Figure 5). C'est avec une technique de dialyse que la localisation précise des chémorécepteurs centraux a été mise en évidence : Cette technique permet de créer une acidose locale dans différentes régions du système nerveux central (Li, 2002, 2006). L'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence différentes zones chémosensibles à une diminution du pH : le RTN (Li, 2002, 2006), le raphé magnus (Hodges, 2004a, b; Nattie & Li, 2001), le NTSc (Nattie & Li, 2002), le complexe de pré-Bötzinger (Krause, 2009) ainsi qu'une région du cervelet, le noyau fastigial (Martino, 2007).

Le principal chémorécepteur central est le RTN/pFRG. Les nombreux travaux de Guyenet ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette structure dans la régulation de la ventilation ainsi que sa sensibilité aux variations de CO_2 et de pH (Guyenet, 2008, 2009, 2010a,b, 2012, 2016). Plusieurs études ont confirmé son implication dans la sensibilité au CO_2 /pH : lors d'une stimulation hypercapnique, il a été mis en évidence une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du RTN (Nattie, 1993) ainsi qu'une activation neuronale au niveau du RTN (Teppema, 1994, 1997). Lors des études sur la réponse au CO_2 , il a été mis en évidence un rôle important des neurones du RTN exprimant Phox2b. En effet, il a été observé que ces neurones étaient intrinsèquement sensibles au CO_2 et aux ions H^+ (Wang, 2013). La stimulation de ces neurones entraînait une augmentation de la ventilation (Abbott, 2009) et il a été mis en évidence que la régulation de la ventilation par les neurones Phox2b était dépendante du CO_2 (Abbott, 2011). Récemment, il a été mis en évidence que les neurones du RTN exprimant Phox2b et Atoh1 étaient essentiels à la mise en place de la réponse au CO_2 (Ruffault, 2015). Ce rôle crucial de Phox2b dans la régulation a été mis en cause dans le syndrome d'Ondine (CCHS pour Congenital Central Hypoventilation Syndrom). Cette maladie est caractérisée par des anomalies au niveau du système nerveux autonome, avec notamment des réponses inadaptées à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Carroll, 2010; Rossor, 2014).

Chez les patients atteints, enfants et adultes, il a été mis en évidence des mutations du gène Phox2b (Amiel, 2003; Patwari, 2010). De plus, en 2008, un modèle de souris transgénique présentant une mutation de Phox2b a montré que les souris ne présentaient pas de réponse au CO₂ ainsi que de nombreuses apnées qui entraînait la mort prématurée de l'animal (Dubreuil, 2008).

Même si les chémorécepteurs centraux sont majoritairement décrits pour leur implication dans la détection des variations de CO₂ et/ou de pH, il a été démontré que le RTN possédait aussi la capacité à détecter les variations d'O₂. Après stimulation hypoxique, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'activité neuronale au niveau du RTN (Bodineau, 2000a, b; Larnicol, 1985; Voituron, 2006, 2011). Plus récemment, des expériences de stimulation d'hypoxie chronique aigue ont montré que l'inhibition pharmacologique du RTN/pFRG entraînait la perte de la réponse ventilatoire et nerveuse sympathique chez le rat anesthésié (Lemes, 2016).

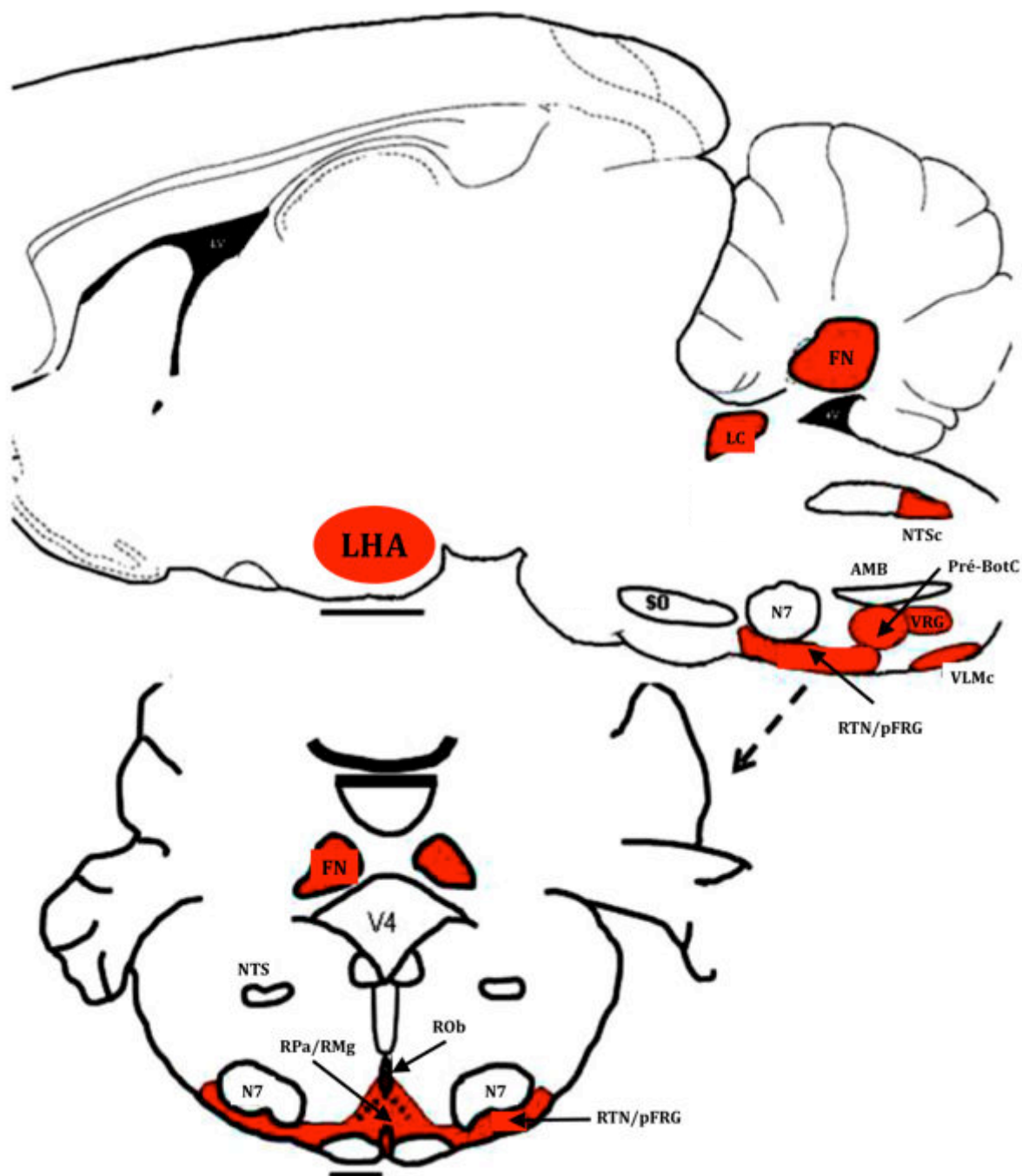


Figure 5: Localisation des chémorécepteurs centraux au niveau du bulbe rachidien et du cervelet (adapté E Nattie & Li, 2012). Abréviations : LHA, Hypothalamus latéral ; FN, Noyau fastigial ; LC, Locus ceruleus ; NTS, Faisceau commissural du noyau du tractus solitaire ; AMB, Noyau ambigu ; N7, Noyau facial, SO, Olive supérieure ; RTN/pFRG, Noyau rétrotrapezoïde/groupe respiratoire parafacial ; VRG, Groupe respiratoire ventral ; PréBotC, Complexe de pré-Bötzinger ; VLMc, Faisceau caudal de la medulla ventrolatérale ; Rpa/RMg, Raphé pallidus/raphé magnus ; Rob, Raphé obscurus ; V4, Quatrième ventricule.

Si la majorité des structures chémosensibles sont situées au niveau du bulbe rachidien, il a été mis en évidence une autre structure localisée au niveau dorso-latéral du pont, le locus coeruleus (LC, Figure 5). Cette structure contient une forte population de neurones noradrenergiques (Jacobs, 1986) et de nombreuses expériences ont permis de mettre en évidence un rôle chémosenseur de cette structure (de Carvalho, 2010; Elam, 1981; Filosa, 2002; Gargaglioni, 2010; Haxhiu, 1996; Oyamada, 1998; Patrone, 2014; Santin & Hartzler, 2013; Stunden, 2001). De plus, il a été mis en évidence que l'hypercapnie entraînait l'augmentation de la fréquence de décharge de 80% des neurones du LC (Coates, 1993; Filosa, 2002; Oyamada, 1998; Pineda & Aghajanian, 1997) ainsi que l'augmentation de l'expression de c-fos chez le rat mâle (Haxhiu, 1996; Teppema, 1997).

II. Réponses ventilatoires

A. Réponses ventilatoires à l'hypoxie

Comme déjà vu dans la partie précédente, les variations de PO_2 sont détectées par des chémorécepteurs situés au niveau du système nerveux central et au niveau périphérique (corps carotidiens).

Les cascades de signalisation associées qui permettent d'obtenir des modifications de la ventilation sont aujourd'hui de plus en plus décrites. Avant de commencer la description précise des mécanismes mis en jeu dans cette réponse ventilatoire, il faut savoir qu'il existe deux phénomènes de réponse à l'hypoxie : une réponse à une hypoxie aiguë (HVR), qui correspond à une stimulation courte (quelques minutes) entraînant une réponse ventilatoire transitoire, et une réponse à l'hypoxie chronique, qui est caractérisée par une augmentation à long terme de la ventilation en réponse à une hypoxie prolongée (quelques heures à plusieurs mois).

1. Réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë (RVH)

La sensibilité et la réponse de l'organisme à l'hypoxie se fait dès le stade in utero. Les mouvements respiratoires, coordonnés à la contraction des muscles respiratoires apparaissent à environ 10 semaines d'aménorrhée chez l'Homme (Boddy, 1974; Clewlow, 1983; Dawes, 1981) et à E14 pour la souris. Ces mouvements respiratoires fœtaux ont été retrouvés chez toutes les espèces de mammifère étudiées à ce jour (Bocking, 2003; Jansen & Chernick, 1983; Kobayashi, 2001; Rigatto,

1984; Stark, 1994; Walker, 1995). Lorsque l'on induit une stimulation hypoxique chez la brebis gestante, on observe une inhibition de ces mouvements respiratoires associé à une diminution du métabolisme et une augmentation du débit sanguin cérébral, résultats qui ont aussi été observés chez le rat et le singe (Bocking, 2003; Boddy, 1974; Clewlow, 1983; Dawes, 1984; Koos, 1987; Pearce, 2006). Les études sur les mécanismes de cette inhibition ont mis en évidence l'implication de structures anatomiques du système nerveux central, comme le noyau parabrachial et Kölliker Fuse ou encore le noyau parafasciculaire, au niveau du thalamus (Dawes, 1983, 1984; Gluckman & Johnston, 1987; Johnston & Gluckman, 1993; Koos, 1992; Walker, 1983, 1995, 2000).

a) RVH chez l'adulte

Chez les individus adultes, la RVH est un phénomène biphasique caractérisé par une phase d'hyperventilation suivie par une diminution progressive de la ventilation, que l'on nomme « roll-off » (Maxová & Vízek, 2001; Teppema & Dahan, 2010) (Figure 6). Pendant le roll-off, la réponse à l'hypoxie s'atténue progressivement par rapport au pic mais en restant toujours supérieure aux valeurs pré-hypoxiques.

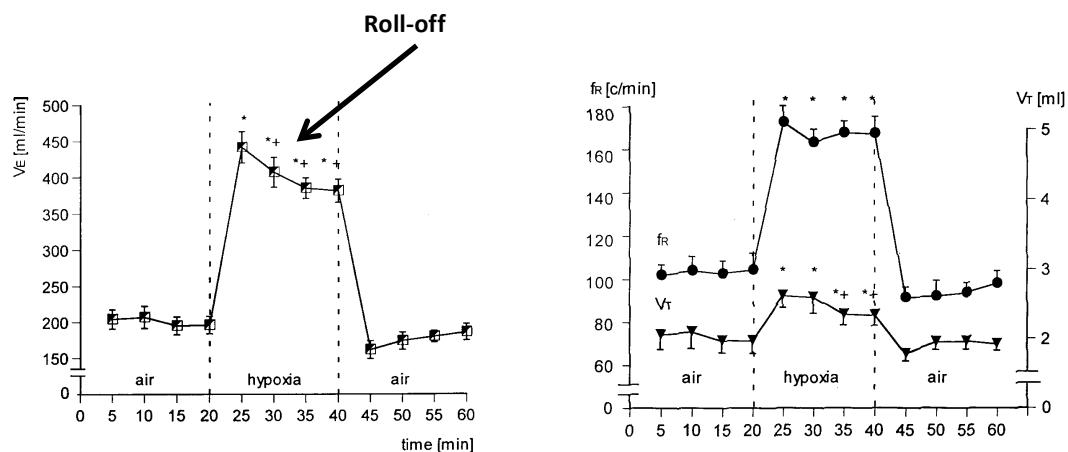


Figure 6 : Représentation de l'HVR biphasique chez le rat adulte. A, VE ; B, fr et Vt. Adapté de Maxova, 2001

Phase d'hyperventilation : La réponse ventilatoire à l'hypoxie chez l'adulte s'observe pour des stimulations comprises entre 2 et 5min (Powell, 1998). Il a été mis en évidence que l'augmentation progressive du débit ventilatoire observée pendant cette phase d'hyperventilation était due à une augmentation du volume courant et de la fréquence respiratoire.

Lors de stimulations hypoxiques, les réponses ventilatoires décrites précédemment dépendent d'une activation neuronale dans différentes zones du SNC impliquées. Afin de caractériser ces zones, puis les neurones impliqués dans la mise en place de ces réponses ventilatoires, la technique la plus couramment utilisée est une immunohistochimie dirigée contre le proto-oncogène *c-fos*, qui est un marqueur de l'activité neuronale (Cf. Annexe 2).

L'étude de l'expression de *c-fos* chez l'adulte (rat, souris, chat) soumis à une stimulation hypoxique a alors permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de *c-fos* au niveau du RTN (Larnicol, 1984 ; Bodineau, 2000), du NTS (Berquin, 2000; Bodineau & Larnicol, 2001; King, 2012; Pascual, 2002) ainsi qu'au niveau de la VLM (Bodineau & Larnicol, 2001; Wakai, 2015). Comme déjà décrits précédemment (Cf. Introduction-I-B), les chémorécepteurs périphériques ont un rôle crucial dans la RVH et notamment dans la phase d'hyperventilation, de part leur réponse rapide (Black, 1971 ; Ponte, 1974). De plus, il a été mis en évidence dans de nombreuses expériences que la chémodénervation, qui vise à sectionner le nerf sinusal carotidien, entraînait une perte de l'hyperventilation en réponse à l'hypoxie (Pascual, 2004; Roux, 2000).

Phase de roll-off : la dépression ventilatoire survient après environ 20min de stimulation hypoxique. Elle est due à une diminution progressive du débit ventilatoire caractérisé par une diminution de la fréquence respiratoire et du volume courant.

Chez l'adulte, l'étude des mécanismes impliqués dans la phase de roll-off a tout d'abord mis en évidence que ce phénomène n'était pas dû à une modification de l'activité des corps carotidiens, suggérant une origine centrale (Vizek, 1987). Cependant, de récentes études suggèrent une implication des corps carotidiens. En effet, en 2001, une étude sur des rats chémodénervés a mis en évidence que ces animaux présentaient toujours une HVR après 50min de stimulation hypoxique, mais plus faible que chez les animaux intacts. En revanche, il n'a pas été observé de phénomène roll-off chez ces animaux chémodénervés (Maxova & Vizek, 2001)(Figure 7).

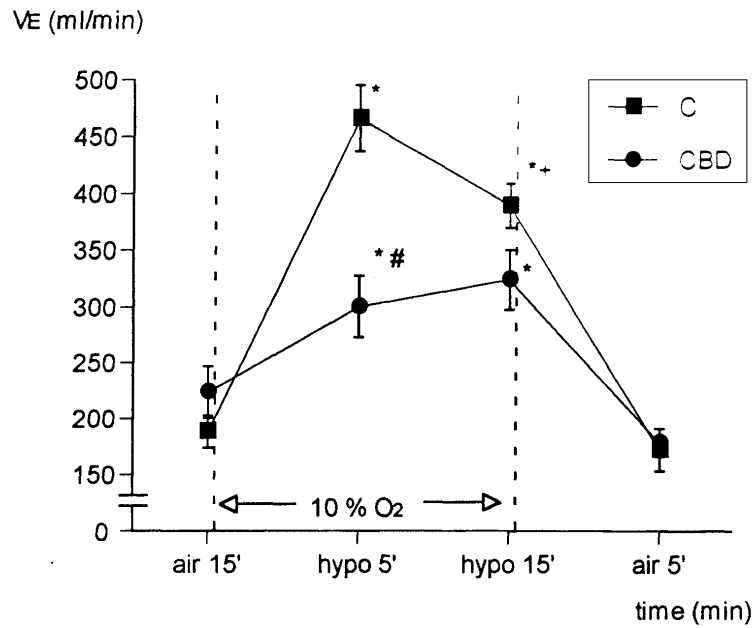


Figure 7 : Ventilation en réponse à l'hypoxie (10% O₂) chez des rats contrôles (C) ou chémodénergés (CBD). Adapté de Maxova, 2001

Cette étude suggère que la dépression ventilatoire en hypoxie n'est pas uniquement liée à un effet central mais nécessite l'intervention des corps carotidiens. Néanmoins, on remarque que dans cette étude, la phase d'hyperventilation est également touchée, ce qui pourrait expliquer l'absence de roll-off.

b) RVH bi-phasique et neurotransmetteurs

La mise en place de la RVH fait appel à des structures du bulbe rachidien réparties sur les faces ventrales et dorsales, ce qui fait que ces différentes zones peuvent être influencées par un grand nombre de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs présents au sein du SNC. Parmi les neurotransmetteurs les plus étudiés, on trouve le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA), les monoamines (Sérotonine, Dopamine) et le NO.

Le glutamate est le neurotransmetteur le plus répandu dans le système nerveux central. Il possède 3 récepteurs ionotropes, qui sont des récepteurs-canaux : NMDA, AMPA et Kainate. Les différentes études ont permis de mettre en évidence un rôle excitateur du glutamate sur la RVH (Ang, 1992; Burton & Kazemi, 2000; Ohtake, 1998). Notamment une étude récente, faite chez le rat en utilisant des agonistes et des antagonistes des récepteurs glutamatergiques afin d'étudier leurs effets sur la

ventilation en normoxie et en hypoxie. Cette étude a montré une augmentation de la ventilation basale et une augmentation de la RVH après injections d'agonistes des récepteurs NMDA et AMPA. L'utilisation d'antagonistes (MK-801 et NBQX) a eu pour effets de diminuer la ventilation en normoxie et la RVH (Pamenter, 2014). En 1988, il a été mis en évidence que les fibres afférentes provenant des corps carotidiens stimulaient les neurones au niveau du NTS afin d'entraîner la libération de glutamate ce qui in fine entraînait une augmentation de la ventilation (Housley & Sinclair, 1988). Cette observation a été confirmée par des expériences qui ont montré que la chémodénervation entraînait une diminution de libération de glutamate au niveau du NTS (Hoop, 1999). De part ces différentes projections, le NTS va aussi stimuler les structures de la surface ventrale du bulbe rachidien, ce qui va entraîner dans cette zone une libération de glutamate et participer à l'augmentation de la ventilation (Holloway, 2015b). Si l'hypoxie entraîne une libération de glutamate, qui a un rôle excitateur, elle a aussi un impact sur le GABA. En effet, en hypoxie, il y a une augmentation de production d'acide glutamique, qui entraîne la formation de GABA à partir du glutamate. Le GABA ayant une action inhibitrice, sa production au niveau du SNC conduit à une baisse de la ventilation, qui pourrait participer au phénomène de roll-off. Cependant, une ancienne étude a montré une absence de rôle majeur des systèmes GABAergiques dans la phase de roll-off (Richter, 1999).

La voie du glutamate semble donc être la principale voie impliquée dans la mise en place de la réponse à l'hypoxie. Quand le glutamate se fixe sur son récepteur NMDA, cela entraîne une cascade de signalisation conduisant à l'activation de la calmoduline et du nNOS, ce qui induit une libération de NO. Malgré une récente étude, (Pamenter, 2015) il a été mis en évidence que la voie du NO n'était pas impliquée dans la réponse à l'hypoxie (RVH et VAH). Cependant l'étude de Gozal a montré qu'en utilisant un inhibiteur sélectif du nNOS (SMTc), on obtenait une diminution de la RVH chez le rat, qui était due à une diminution du V_T et de la f_R (Gozal, 1996). Cela met en évidence une implication du NO sur la régulation de la ventilation en hypoxie.

Le rôle des monoamines, plus principalement la sérotonine et la dopamine, reste largement discuté aujourd'hui (Barros & Branco, 2002; Huey, 2000; Nakano, 2002). Les études sur l'implication de la Dopamine dans la mise en place de la RVH ont montré que :

- L'utilisation de souris transgéniques présentant un blocage des transporteurs de la dopamine, induisant un état hyperdopaminergique entraînait une diminution de la ventilation basale (via V_T et f_R) et une diminution de la RVH (Vincent, 2007).
- Une injection de Dopamine entraînait une diminution de la ventilation, même à faible dose (Barros & Branco, 2002; Cardenas & Zapata, 1981; Guner, 2002; Yasuhara, 1980).

D'autres études ont aussi suggéré que la dopamine pourrait avoir un rôle modulateur sur les chémorécepteurs centraux et périphériques (Huey, 2003; Prieto-Lloret, 2007).

Pour ce qui est de la sérotonine, les études ont montré que l'utilisation d'un agoniste entraînait une diminution du V_T associé à une augmentation de la f_R en normoxie mais n'avait aucun effet sur la RVH (Taylor, 2005).

c) RVH chez le nouveau-né

Chez le nouveau-né, la RVH est aussi un phénomène biphasique mais qui diffère de celle observée chez l'adulte. En effet, la phase d'hyperventilation est beaucoup plus faible chez le nouveau-né comparé à celle observée chez des individus adultes (Bissonnette, 2000). Cette différence vient du fait qu'il existe un phénomène de maturation de l'HVR, phénomène mis en évidence chez le mouton, le chat, le rat et le cochon (Bonora & Gautier, 1984, 1987; Bureau & Bégin, 1982; Eden & Hanson, 1987; Elnazir, 1996; Hanson, 1989; Liu, 2000; Marchal, 1992; Rigatto, 1988). Juste après la naissance, chez l'agneau, il a été mis en évidence une modification du seuil de PaO_2 qui entraîne l'activation des corps carotidiens (Blanco, 1984, 1988). Cette modification est suivie par une augmentation progressive de la sensibilité à l'hypoxie des corps carotidiens ainsi que d'une amélioration de la capacité de ces derniers à maintenir une fréquence de décharges élevée pendant une hypoxie prolongée (Carroll, 1993; Donnelly & Doyle, 1994; Marchal, 1992; Pepper, 1995). En fonction des différentes espèces, ces changements dans la sensibilité à l'hypoxie se font en quelques jours ou quelques semaines, jusqu'à obtenir une réponse à l'hypoxie de la même intensité que celle observée chez l'adulte (Bamford, 1999; Bureau, 1985; Eden & Hanson, 1987; Marchal, 1992; Pepper, 1995; Wasicko, 1999). Au niveau anatomique, il a déjà été mis en évidence des modifications au sein du SNC pendant le développement, notamment au niveau du NTS, qui rappelons-le est la principale zone de projection des afférences périphériques et notamment provenant des corps carotidiens. Cela impliquerait notamment des modifications au niveau de la densité et de l'expression des récepteurs NMDA (Ohtake, 2000; Simakajornboon & Kuptanon, 2005) du facteur de croissance PDGF (Simakajornboon, 2005) ainsi que d'un changement dans l'expression du récepteur GABA au niveau du NTS et du complexe de pré-Bötzinger (Wong-Riley & Liu, 2008).

Au niveau central, il a été observé une augmentation du nombre de neurones exprimant le gène *c-fos* au niveau du RTN majoritairement (Berquin, 2000; Voituren, 2006), mais aussi au niveau de la VLM (caudale et rostrale) et du NTS (Berquin, 2000).

Les études de la phase d'hyperventilation ont montré une implication des corps carotidiens. En effet, lors d'expériences de chémodénervation, la phase d'hyperventilation est fortement diminuée, voire abolie (Bureau, 1985; Darnall, 1991; Fung, 1996; Lowry, 1999a,b; Suguihara, 1994).

Chez le nouveau-né, la phase de diminution progressive de la ventilation est une dépression ventilatoire vraie. En effet, cette dépression ventilatoire est plus importante que la phase d'hyperventilation, ce qui se traduit par un retour à une ventilation basale plus basse qu'en normoxie et donc à une hypoventilation relative. L'étude des mécanismes à l'origine de la dépression ventilatoire sont encore mal connus mais il semblerait qu'ils puissent être similaires aux mécanismes induisant l'arrêt des mouvements respiratoires fœtaux, via notamment une implication des chémorécepteurs périphériques (Carroll, 1987, 1993; Fung, 1996; Marchal, 1992) ou du Locus coeruleus au niveau du SNC (Moore, 1996). D'autres études ont suggéré une immaturité des mécanismes à l'origine de la phase d'hyperventilation, notamment les corps carotidiens, ce qui expliquerait la faible phase d'hyperventilation observée chez les nouveau-nés. Ensuite, au fur et à mesure de la maturation des corps carotidiens, l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (hyperventilation) devient de plus en plus grande, rendant la de roll-off de plus en plus « petite » au regard de la phase d'hyperventilation, ce qui maintient une ventilation plus élevée par rapport à la normoxie.

2. Réponse à l'hypoxie chronique

a) *Acclimatation ventilatoire à l'hypoxie*

Nous avons mis en évidence précédemment une réponse biphasique de l'organisme en cas d'hypoxie aiguë, réponse qui se termine par une diminution progressive de la ventilation et un retour au niveau basal. Lorsque l'hypoxie se prolonge, on parle d'hypoxie chronique. L'organisme peut se trouver en condition d'hypoxie chronique par exemple lors de séjours prolongés en altitude, où la pression en O₂ dans l'atmosphère est plus faible, ce qui diminue la prise en oxygène, et donc réduit la concentration en O₂ au niveau des tissus. L'hypoxie chronique peut aussi survenir lors de pathologies cardiorespiratoires. On observe alors ce que l'on appelle une acclimatation ventilatoire à l'hypoxie (VAH), caractérisée par une augmentation progressive de la ventilation de manière temps-dépendant, pour une exposition allant de quelques heures à plusieurs jours (Janssen, 1998; Powell, 1998) (Figure 8). De plus, cette acclimatation ventilatoire persiste après l'arrêt de l'exposition à l'hypoxie, ce qui

met en évidence l'existence d'une plasticité du réseau respiratoire dans la mise en place de la VAH (Aaron & Powell, 1993; Hupperets, 2004).

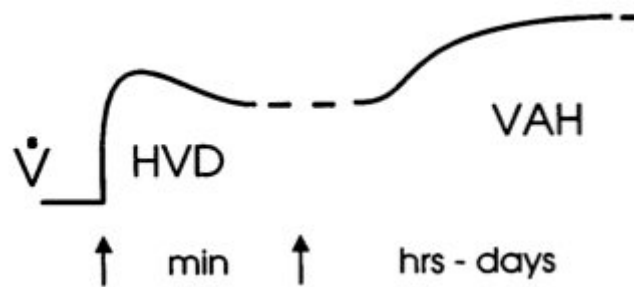


Figure 8 : Adaptations ventilatoires en réponse à l'hypoxie
(Powell, 1998)

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans cette acclimatation ventilatoire, notamment le rôle des chémorécepteurs périphériques et centraux. Dès 1995, Bisgard avait observé une augmentation de la sensibilité des corps carotidiens en réponse à une hypoxie chronique (Bisgard, 1995). Ces résultats ont été précisés plus récemment dans des études qui suggèrent un équilibre entre des mécanismes inhibiteurs et activateurs au niveau des corps carotidiens (Bisgard, 2000).

Comme pour la RVH, il a été observé une implication des différents neurotransmetteurs dans la VAH, notamment le glutamate et la dopamine. Chez des animaux acclimatés à l'hypoxie chronique, l'injection d'agonistes des récepteurs NMDA et AMPA a montré une augmentation de la ventilation basale et une augmentation de la RVH alors que l'utilisation d'antagonistes de ces mêmes récepteurs a montré une diminution de la ventilation basale et l'abolition de la RVH (Pamenter, 2014). Pour le rôle du NO, il a été montré par notre équipe (El Hasnaoui-Saadani, 2007) qu'une injection de SMTC avait pour effet de réduire l'augmentation du V_E observée pendant l'acclimatation à l'hypoxie chez des souris mais pas chez un animal adapté à l'hypoxie chronique comme le plateau pika (Pichon, 2009). Différentes études ont aussi mis en évidence une implication de la dopamine dans la VAH (Jackson & Nurse, 1997; Janssen, 1998a, b; Zapata, 1996)

b) Réponse cellulaire à l'hypoxie chronique

Lorsque l'organisme est en situation d'hypoxie chronique, il existe une réponse cellulaire qui vise à augmenter la transcription de gènes spécifiques qui vont contribuer à maintenir l'homéostasie de l'organisme, via une augmentation de l'oxygénation des tissus. En hypoxie, on observe l'activation d'un facteur de transcription spécifique HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Wang & Semenza, 1993a). Ce facteur de transcription est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice α (HIF-1, HIF-2 et HIF-3) et une sous-unité β exprimée constitutivement.

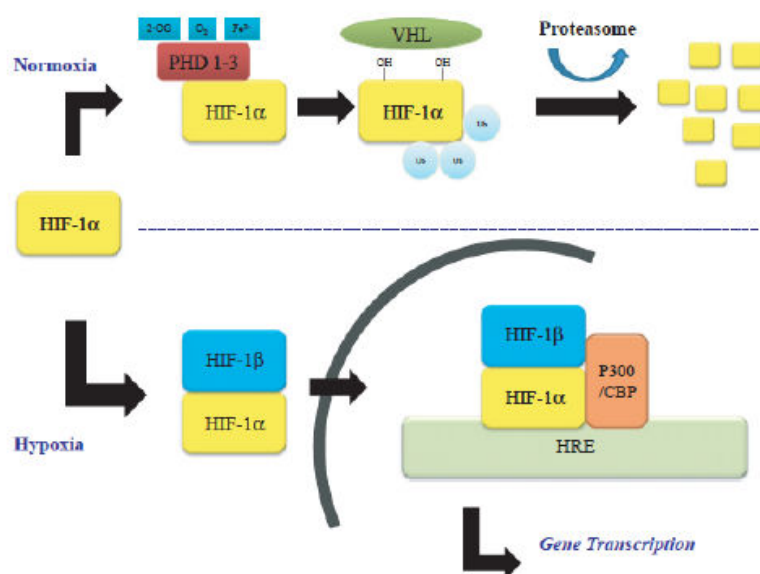


Figure 9 : Régulation de HIF-1. (Corcoran & O'Connor, 2013).

En normoxie (Figure 9, haut), la sous-unité β est stable contrairement à la sous-unité α . Cette dernière est cytoplasmique et est synthétisée en permanence dans la cellule, mais immédiatement dégradée par le système ubiquitine/protéasome. Brièvement, les résidus proline de la sous-unité α sont hydroxylés par une enzyme de la famille des prolyl-4-hydroxylases (PHD) en présence d'O₂. Cette modification post-traductionnelle permet l'interaction de HIF- α avec la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) et une ubiquitine ligase. Cette sous-unité est ensuite poly-ubiquitinylée puis adressée au protéasome pour être dégradée (Semenza, 2004a, 2004b). La demi-vie de HIF- α dans le plasma est donc très courte, ce qui empêche sa liaison avec la sous-unité β (Hon, 2002; Huang, 1998).

En hypoxie (Figure 9, bas), l'activité des PHD est inhibée, ce qui empêche le processus d'hydroxylation de HIF- α qui est donc stable dans le cytoplasme et peut donc se lier à HIF- β . Le complexe ainsi formé est recruté par des protéines tels que le co-activateur P300/CREB Binding Factor (CBP) qui favorise sa fixation sur de nombreux gènes impliqués dans la régulation de

l'homéostasie de l'O₂, notamment celui de l'Epo (Semenza, 1991; Wang & Semenza, 1993a, 1993b; Wenger & Gassmann, 1997). Le facteur de transcription HIF permet de moduler l'expression de 70 à 200 gènes selon les cellules, afin d'adapter le métabolisme en fonction des conditions hypoxiques (Semenza, 2004a, 2004b; Tzouvelekis, 2007) via une séquence spécifique située dans la région promotrice des gènes cibles appelée « Hypoxia Response Element (HRE) ». L'activité biologique de ces gènes dépend donc des niveaux d'O₂ tissulaires. Parmi les gènes portant cette séquence HRE, on trouve notamment le gène codant pour l'Epo (Semenza, 1991), le VEGF, le NOS ou encore l'hepcidine.

3. Réponse à l'hypercapnie

Nous avons déjà vu précédemment que la PaCO₂ chez les mammifères se situait autour de 40mmHg. La PaCO₂ dans l'organisme est étroitement liée au pH sanguin. En effet, dans le sang, le CO₂ est transporté majoritairement sous forme d'ions bicarbonate : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Une augmentation de la quantité de CO₂ dans l'air inspiré (ou un frein à l'expiration) entrainera donc une libération de protons et aura pour finalité une diminution du pH sanguin, que l'on nomme acidose. La détection des variations de CO₂ et/ou de pH est un système très sensible, il suffit en effet d'une augmentation de l'ordre de 2mmHg de la PaCO₂ pour doubler la ventilation (Nattie, 2000).

La sensibilité de l'organisme aux variations de PaCO₂ et/ou de pH a été mise en évidence très tôt. Dejours en 1962, puis Fitzgerald en 1982 ont mis en évidence qu'une augmentation de la PaCO₂ et/ou de la concentration en ions H⁺ avait pour effet d'augmenter la fréquence de décharge des corps carotidiens (Dejours, 1962; Fitzgerald & Dehghani, 1982). Ces expériences ont donc mis en évidence très tôt une implication des corps carotidiens dans la sensibilité au CO₂. Dans le même temps, une autre équipe a mis en évidence l'existence de chémorécepteurs centraux sensibles à ces mêmes variations (Leusen, 1954a, 1954b). L'étude de la réponse ventilatoire à l'hypoxie étant aujourd'hui un phénomène bien connu, de plus en plus d'études se penche sur la mise en place de la réponse à l'hypercapnie et des facteurs impliqués. Notamment, même si les travaux précédents ont mis en évidence une implication des chémorécepteurs périphériques et centraux dans la mise en place de cette réponse, les études cherchent aujourd'hui à déterminer le rôle et le niveau d'implication de chacun. En 1994, il a été mis en évidence que 30 à 40% de la réponse ventilatoire induite par une augmentation de la PaCO₂ était initiée par les corps carotidiens, ce qui suggère une réponse essentiellement centrale. Récemment, l'équipe de Smith a réalisé une étude qui suggère que les chémorécepteurs périphériques déterminent la sensibilité des chémorécepteurs centraux au CO₂ (Smith, 2015).

a) HcVR chez l'adulte

La réponse ventilatoire à l'hypercapnie et les mécanismes associés commence à être de plus en plus étudiés et précisés. Les études existantes ont déjà permis de mettre en évidence une augmentation du débit ventilatoire en réponse à une stimulation hypercapnique (4-7% CO₂) chez le rat et la souris (Hodges, 2008; Saiki & Mortola, 1996). Cette augmentation du débit ventilatoire est due à une augmentation significative du volume courant mais qui n'est pas associée à une augmentation de la fréquence respiratoire et cela même après 45min de stimulation hypercapnique (Granjeiro, 2016; Wakai, 2015) (Figure 10).

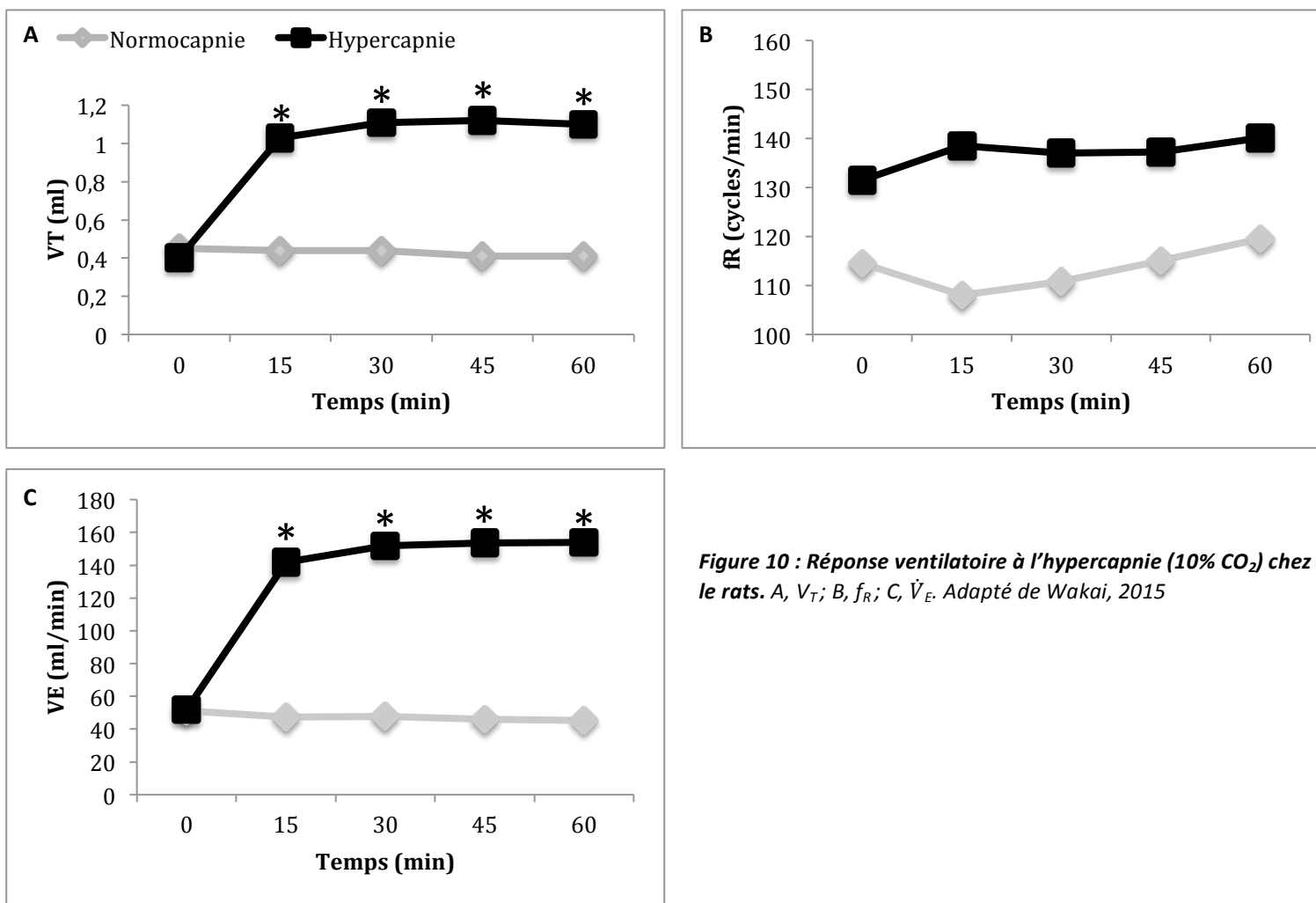


Figure 10 : Réponse ventilatoire à l'hypercapnie (10% CO₂) chez le rat. A, V_T; B, f_R; C, V̇_E. Adapté de Wakai, 2015

Comme vu précédemment pour l'hypoxie, la caractérisation des régions du SNC impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie a été réalisée via l'étude du marqueur d'activité neuronale c-fos. Chez le rat nouveau-né, l'équipe de Wickström en 2002 a mis en évidence une augmentation de l'expression de c-fos en hypercapnie au niveau du NTS (NTSc et NTSm), de la VLMr et du RPa

(Wickström, 2002). Chez l'adulte, une augmentation de l'expression de c-fos a été mise en évidence au niveau du RTN et de la VL_{Mr} (Berquin, 2000 ; Wakai, 2015). La caractérisation phénotypique des neurones activés par l'hypercapnie a montré que ces neurones pouvaient être catécholaminergiques, notamment au niveau de la VLM (Haxhiu, 1996) ou sérotoninergiques au niveau des raphés pallidus et magnus (Iceman, 2013). La chémosensibilité au CO₂ semble donc être multisite au sein du SNC, mais il semblerait que le RTN/pFRG ait un rôle important, c'est pourquoi nous avons cherché à étudier cette zone dans notre étude (Cf. Résultats-II-A et C). De plus, comme déjà décrit précédemment, les corps carotidiens semblent impliqués dans la RVHc (Cf. Introduction-I-B).

b) RVHc chez le nouveau-né

Contrairement à ce qui a été décrit précédemment pour la réponse à l'hypoxie, les études menées sur la réponse à l'hypercapnie ont montré une réponse identique entre les individus nouveau-nés et les individus adultes. En 1996, l'équipe de Mortola a étudié la RVHc chez des rats (P6) et des chiots (P4-6). Il a été mis en évidence une augmentation du débit ventilatoire via une augmentation du V_T, sans aucune modification de la fréquence respiratoire (J. Mortola & Saiki, 1996). La présence d'une HcVR tôt après la naissance avait déjà été mise en évidence par la même équipe (Mortola & Lanthier, 1996). Néanmoins, dans une étude plus récente, la RVHc a été mesurée chez le raton entre P0 et P10. Il a alors été observé une augmentation du V_T en réponse à l'hypercapnie, seulement à partir de P10, même si une activation neuronale en réponse à cette même stimulation a été observée dès P1 (Wickström, 2002). Une autre étude chez le rat a mis en évidence une RVHc de la naissance à P4 et à partir de P10, alors qu'aucune RVHc n'est observée entre P5 et P9 (Putnam, 2005). Ces résultats suggèrent quand même une certaine maturation dans la mise en place de la réponse à l'hypercapnie. Le phénomène de maturation de la RVHc a été ensuite mis en évidence en 2006 dans une étude qui a mesuré la RVHc de différentes lignées de rats (Brown Norway, Sprague-Dawley et Dahl S) tous les 3 jours entre P0 et P21 puis à P29 et P30. Les résultats obtenus ont montré que pour les 3 lignées, l'exposition à l'hypercapnie (CO₂ 7%) augmentait la VE, mais que la RVHc devenait de plus en plus grande à partir de P15 pour atteindre un pic à P19-P21. A P30, la RVHc était sensiblement la même que celle observée chez l'adulte (Davis, 2006).

c) *RVHc et neurotransmetteurs*

La chémosensibilité du SNC dans la RVHc est multisite, et les hypothèses actuelles suggèrent que le RTN soit le principal site. Nous avons déjà décrit le phénotype des neurones présents au sein du RTN (Cf. Introduction-I-A-1), avec notamment l'expression de *Phox2b*, *ATOH1* et des récepteurs au glutamate. Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des neurones sérotoninergiques présents dans les raphés, dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Des études avaient notamment montré que l'inhibition de la sérotonine entraînait l'apparition d'apnées (Aleksandrin, 2005). Cependant, l'hypothèse d'une potentielle chémosensibilité des neurones 5-HT a longtemps été réfutée. En effet, des études mettaient en évidence que l'hypercapnie n'entraînait pas de réponse de ces neurones *in vivo* (Depuy, 2011; Guyenet, 2008; Mulkey, 2004). Néanmoins, dans ces études, les animaux étaient anesthésiés et il a été démontré que cela pouvait entraîner des diminutions de la RVHc normalement observées chez des animaux éveillés, notamment par l'action inhibitrice qu'ont les produits anesthésiants sur les neurones 5-HT (Johansen, 2015; Massey, 2015; Ray, 2011; Meltzer, 2012). L'absence de réponse à l'hypercapnie observée dans ces études ne peut donc pas être comparée aux résultats obtenus sur des animaux éveillés. Deux études principales ont permis, grâce à une technique d'enregistrement *in vivo*, de mettre en évidence une réponse des neurones 5-HT à l'hypercapnie qui passe par une augmentation de leur fréquence de décharge (Richerson, 2004, 2005; Veasey, 1995). Ces résultats s'ajoutent à ceux décrits dans la partie précédente qui montraient que les neurones *c-fos* au niveau des raphés exprimaient des marqueurs de la sérotonine. En ce qui concerne l'étude de la RVHc, les résultats de différents laboratoires ont permis de mettre en évidence qu'un défaut d'expression ou une inhibition de la sérotonine avait pour effet de diminuer voire d'abolir la RVHc (Hodges, 2008; Li & Nattie, 2008; Taylor, 2005). En 2009, l'équipe de Ptak a mis en évidence grâce à des manipulations électro-physiologiques une stimulation du réseau respiratoire par les neurones sérotoninergiques des raphés et notamment les neurones du pré-BotC, via une libération de substance P (Ptak, 2009).

Les études de l'implication de la voie du NO dans la mise en place de la RVHc ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs AMPA (NBQX) ou NMDA (MK-801) n'entraînait aucun effet sur la RVHc (Taranakov, 2005; Whitney, 2000).

Récemment, des études se sont intéressées aux récepteurs GABAergiques. Le GABA est un autre neurotransmetteur important de SNC. Il a été mis en évidence que les neurones inhibés par une stimulation hypercapnique au niveau des raphés étaient GABAergiques (Iceman & Harris, 2014). Cette chémosensibilité des neurones GABAergiques avait déjà été mise en évidence au niveau de la

surface ventrale du bulbe rachidien (Kuribayashi, 2008) et plus récemment au niveau du noyau Kölliker-Fuse (Yokota, 2015). Ces neurones seraient impliqués dans la RVHc chez l'adulte (Gourine & Spyer, 2001) mais aussi au cours du développement embryonnaire (Zhang, 2003). Récemment, une équipe a réalisé des expériences consistant à soumettre des souris à un stimulus hypercapnique pendant le sommeil, ce qui a permis de mettre en évidence un rôle de ces neurones dans le réveil (Kaur, 2013).

Un autre facteur impliqué dans la RVHc serait l'ATP. En effet, il a été démontré qu'une augmentation de la PCO_2 entraînait une libération d'ATP au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien qui précède les adaptations ventilatoires (Gourine, 2005a, b). De plus, il a été montré que la libération d'ATP se faisait au niveau des cellules gliales (Spyer & Gourine, 2009) et de manière intéressante, les cellules gliales ont été localisées au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien, là où se trouve notamment le RTN/pFRG (Erlichman, 2004).

4. Hormones sexuelles et réponses ventilatoires

Dès les premières études sur la réponse ventilatoire induite par l'hypoxie, il a été mis en évidence des différences entre les mâles et les femelles (Aitken, 1986; Tatsumi, 1991). Aujourd'hui encore, de nombreuses équipes se penchent sur le rôle des hormones sexuelles (progestérone, œstradiol et testostérone) dans le contrôle de la ventilation.

a) Présentation générale des hormones sexuelles

On trouve trois hormones sexuelles principales : la progestérone, l'œstradiol et la testostérone. Ces 3 hormones stéroïdiennes dérivent du cholestérol. Ce dernier est transformé en pregnenolone puis en progestérone et c'est à partir de la progestérone que seront synthétisés l'œstradiol et la testostérone.

Progestérone

La progestérone est synthétisée en forte quantité par le corps jaune de l'ovule à partir du 14^{ème} jour du cycle menstruel, qui correspond à l'ovulation. S'il n'y a pas de fécondation, la concentration de progestérone va diminuer car les cellules du corps jaune vont être éliminées alors que s'il y a fécondation, la synthèse de progestérone va être maintenue grâce à une hormone produite par l'ovule fécondé (HCG). Il a été mis en évidence que la progestérone était synthétisée au niveau du SNC (Zwain & Yen, 1999) et que son récepteur était présent au niveau du corps carotidiens (Joseph, 2006).

Œstradiol

L'œstradiol (E2 ou 17 β -œstradiol) fait partie de la famille des estrogènes. On trouve aussi dans cette famille l'œstrone (E1) et l'œstriol (E3) mais c'est l'œstradiol qui a le plus fort effet œstrogénique. Cette hormone est produite tout le long du cycle menstruel. On distingue deux types de récepteurs aux estrogènes, ER α (ESR1) et ER β (ESR2), qui diffèrent par leur taille mais présente une similarité de structure au niveau de leurs domaines de liaisons au ligand et à l'ADN (Tanenbaum, 1998).

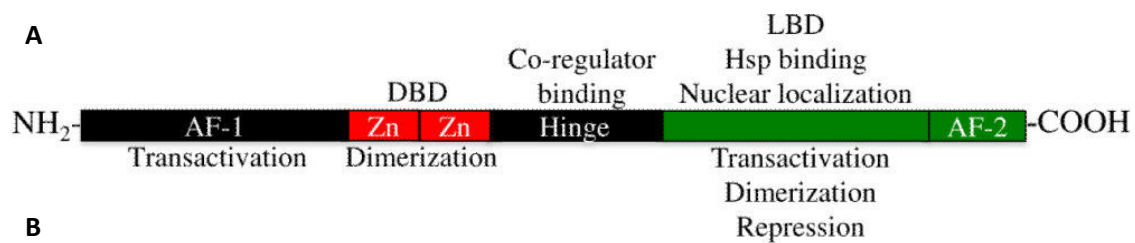
Testostérone

La testostérone est produite par les testicules chez l'homme et par les ovaires chez la femme, dans une moindre mesure. La testostérone fait partie du groupe des androgènes avec la dihydrotestostérone (DHT) qui est le produit de la transformation de la testostérone par la 5 α -réductase. Si les deux hormones ont la capacité de se fixer sur le récepteur spécifique aux androgènes (AR), c'est la DHT qui possède la plus forte affinité pour ce récepteur. La testostérone est responsable de la virilisation chez l'homme et chez le rongeur, comme le rat, c'est elle qui est responsable du comportement sexuel. De manière intéressante, il a récemment été démontré une action de la testostérone sur l'érythropoïèse *via* une augmentation de la synthèse d'Epo (Bachman, 2014).

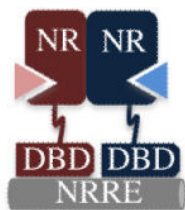
Ces différentes hormones vont entraîner des cascades de signalisation par l'intermédiaire de leurs récepteurs, qui sont des récepteurs nucléaires.

b) Généralité sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des homodimères, dont chaque dimère est constitué de 6 domaines, notés de A à F (Figure 11). Les domaines A et B constituent la partie N-Terminale, impliquée dans l'interaction protéine-protéine et dans l'activation et l'expression des gènes cibles ; la région C correspond au domaine de liaison de l'ADN (DNA Binding Domain, DBD) et est nécessaire à la dimerisation ; le domaine D correspond à la région charnière, qui fait le lien entre les deux derniers domaines et contient généralement la séquence d'adressage au noyau (Nuclear Localization Sequence, NLS) ; les domaines E et F constituent la région C-Terminale, qui correspond à la zone de liaison du ligand (Ligand Binding Domain, LBD).



B Steroid hormone receptors



AR, ER α et β , PR

Figure 11 : Structure des récepteurs nucléaires. A, Organisation générale des différents domaines ; B, Récepteurs aux stéroïdes (Malek & Lad, 2014).

Brièvement, en absence d'hormones, les récepteurs sont inactifs car maintenus dans le cytoplasme pour les récepteurs à la progestérone et à la testostérone (PR et AR) via des protéines Heat Shock (HSP) ou bien inactifs via des corépresseurs (SMRT, NCoR) pour le récepteur aux œstrogènes (ER). La fixation de l'hormone sur son récepteur entraîne un changement de conformation du domaine LBD, une dimérisation des monomères et la translocation du récepteur vers le noyau (et le relargage des corépresseurs pour ER), via une séquence de transport spécifique. La transcription de gènes cibles se fait via les éléments de réponse à la progestérone (Progesterone Responsive Elements, PRE), aux œstrogènes (Estrogen Responsive Elements, ERE) ou à la testostérone (Androgen Responsive Elements, ARE) (Malek, 2014).

c) Effets des hormones sur la ventilation basale

Il a été mis en évidence très tôt une implication des hormones sexuelles dans le contrôle de la ventilation. Entre 1987 et 1992, les travaux de Bayliss ont permis de mettre en évidence l'effet stimulant des hormones sexuelles sur la ventilation, en observant une augmentation de l'activité du nerf phrénique chez le chat traité par de la progestérone (Bayliss, 1987, 1992). Cet effet stimulant a aussi été retrouvé chez le rat par Favier en 1997 (Favier, 1997), dans une étude qui a montré une augmentation de la ventilation (via le V_T) suite à l'administration de progestérone et d'oestradiol (Tableau 1).

«Tableau 1 : Paramètres ventilatoires avant et après administration de progestérone et d'oestradiol.

	Mâles contrôle	Mâles (Progestérone + Oestradiol)
f_R (cycles/min)	120.7 ± 4.4	118.1 ± 3.9
f_R (cycles/min)	120.7 ± 4.4	118.1 ± 3.9
\dot{V}_E (ml/min/kg ^{0.75})	457.1 ± 25.5	556.4 ± 13.2*
V_T (ml/kg ^{0.75})	3.85 ± 0.25	4.80 ± 0.21
f_R (cycles/min)	120.7 ± 4.4	118.1 ± 3.9

* $p < 0.05$ vs contrôle. Adapté de Favier, 1997.

f_R (cycles/min) 120.7 ± 4.4 118.1 ± 3.9

f_R (cycles/min) 120.7 ± 4.4 118.1 ± 3.9

Différentes études ont par la suite permis de mettre en évidence la présence des récepteurs aux hormones stéroïdiennes au niveau du système nerveux central, et notamment au niveau du NTS, mais aussi au niveau des chémorécepteurs périphériques (Brinton, 2009; Shughrue & Merchenthaler, 2001). Il a d'ailleurs été mis en évidence un effet des hormones sexuelles sur les corps carotidiens (Joseph, 2002) et sur le SNC (Bayliss, 1992). En revanche, même si la progestérone peut agir seule en tant que stimulateur, ce n'est pas le cas de l'oestradiol, dont l'action potentialise celui de la progestérone (Regensteiner, 1989, 1990).

d) Effets des hormones sexuelles sur les réponses ventilatoires

Lorsqu'on s'intéresse aux études portant sur les différences de ventilation en réponse à l'hypoxie selon le sexe des individus, on remarque une très grande mixité des résultats. Dans certaines études, la RVH est plus grande chez les mâles que chez les femelles (Hirshman, 1975; White, 1983), dans d'autres ce sont les femelles qui présentent une RVH plus grande que les mâles (Mortola & Saiki, 1996; Tatsumi, 1991) alors que certaines études ne montre aucune différence de la RVH entre les deux sexes (Loeppky, 2001; Rebeck, 1973). Cette grande variabilité dans les résultats pourrait être due aux différentes tranches d'âges des individus utilisés et à l'effet des cycles menstruels chez la femelle qui pourraient avoir une influence sur les taux d'hormones présents dans l'organisme. Dans une étude de 2009, l'équipe de Wenninger a étudié la réponse à l'hypoxie chez les rats mâles et femelles en fonction de l'âge. La première observation est que les taux d'hormones ne présentent pas de variations avec l'âge. En ce qui concerne la réponse à l'hypoxie, aucune différence n'a été observée entre les mâles et les femelles pour les souris jeunes et d'âge moyen. En revanche, les souris âgées femelles avaient une meilleure réponse à l'hypoxie que les mâles du même âge (Wenninger, 2009). Chez l'Homme, il a été mis en évidence que la RVH augmentait progressivement avec l'âge chez les hommes, mais que cet effet était aboli (ou moins prononcé) chez les femmes ménopausées (Lhuissier, 2012; Richalet & Lhuissier, 2015).

Afin de préciser le rôle des hormones sexuelles dans la RVH chez les souris femelles, d'autres expérimentations ont été utilisées, comme des ovariectomies ou des injections d'hormones ou d'inhibiteurs de leurs récepteurs. En 1985, Tatsumi a mis en évidence une diminution de la RVH, liée à une diminution de l'activité du SNC chez des chattes après ovariectomie (Tatsumi, 1991).

Si le rôle des hormones sexuelles sur la RVH est bien décrit, l'impact sur la RVHc a été beaucoup moins étudié. En 2015, les observations de Marques chez le rat ont mis en évidence que les phases du cycle oestral ne modifiaient pas la ventilation en normocapnie et en hypercapnie. Néanmoins, les animaux ayant subi une ovariectomie présentaient une RVHc moins importante que les animaux intacts pendant la phase d'oestrus (Marques, 2015). Comme pour la RVH, les études sur la RVHc en fonction des phases du cycles ont montré une grande variabilité de résultats : dans certains études la RVHc est plus importante en phase lutéale (Edwards, 1996; Schoene, 1981) et dans d'autre elle n'est pas influencée par les phases du cycle (Marques, 2015; White, 1983)

Plus récemment, il a été mis en évidence une implication du récepteur nucléaire à la progestérone (nPR) dans la RVHc chez la souris (Marcouiller, 2014). Dans cette étude, l'utilisation d'une lignée de souris présentant une mutation du nPR (PRKO) ont montré qu'un traitement par de la progestérone

entraînait une augmentation de la réponse à l'hypercapnie (5% CO₂) uniquement chez les animaux WT. Enfin, dans une dernière étude ayant utilisé des siARN contre les deux types de récepteurs membranaires à la progestérone (mPR α et mPR β), il a été mis en évidence un effet du mPR β sur les réponses ventilatoires. En effet, l'injection de si ARN contre mPR β a entraîné une abolition de la RVH et une diminution (environ 50%) de la RVHc (Boukari, 2016).

B. Etude d'un animal adapté à la vie en haute altitude : le plateau Pika

1. Présentation générale et réponse à l'hypoxie

Le plateau Pika (*Ochotona curzoniae*) est un petit lagomorphe d'environ 100 à 140g vivant sur les plateaux Tibétains, entre 3200 et 5300m d'altitude, dans un environnement froid et sec (Manabe & Broccoli, 1990; Yang, 2014). C'est un animal diurne qui ne présente pas de période d'hibernation. Les fossiles de Pikas retrouvés sur les plateaux tibétains sont datés de 20 à 30 millions d'années, ce qui fait du Pika un animal particulièrement bien adapté à la vie en altitude (Mason, 2003; Wang, 2008; Zhu, 2005). Comme d'autres espèces animales, le Pika est un animal vivant dans des terriers. Des études se sont déjà intéressées aux variations des concentrations en O₂ et CO₂ au sein des terriers, montrant que le taux d'oxygène pouvait varier entre 17 et 10% et le taux de dioxyde de carbone entre 3 et 10% (Boggs, 1984; Kuhnen, 1986; Lechner, 1976; Williams & Rausch, 1973). De part ce mode de vie et la haute altitude de ses espaces de vie, le Pika est un animal adapté à un environnement hypoxique-hypercapnique.

Chez d'autres espèces animales vivants dans des terriers comme la taupe, le hamster, l'écureuil, des adaptations ventilatoires ont été observées : ces espèces présentent une réponse ventilatoire à l'hypoxie ou à l'hypercapnie faible voir inexistante (Arieli & Ar, 1979; Barros, 2001; Boggs & Birchard, 1989; Walker, 1985). Il a notamment été mis en évidence qu'une stimulation hypoxique n'entraînait pas d'augmentation de l'expression de HIF-1 chez le plateau Pika (Chen, 2007). Cette stratégie ventilatoire permettrait de faciliter la vie en condition extrême, en limitant le coût énergétique de la ventilation et en préservant ainsi de l'énergie.

Chez le pika, les effets de l'hypoxie ont été étudiés au niveau du foie (Chen, 2007), du système neuroendocrinien (JZ & You, 1992), de la circulation pulmonaire (Ge, 1998), du cœur (Qi, 2008) ainsi que pour les adaptations génétiques et biologiques (Li & Nattie, 2008; Luo, 2008). Ces différentes études ont permis de mettre en évidence plusieurs adaptations du plateau Pika lui permettant de

vivre à haute altitude, notamment un fort ratio métabolique (Sheafor, 2003) associé à une consommation élevée d'oxygène. Il a également été mis en évidence une faible pression artérielle pulmonaire (Ge, 1998) chez le Pika. Au niveau cardiaque, le plateau Pika a montré un ratio poids du cœur/poids de l'animal plus élevé que chez le rat (Qi, 2008) ainsi qu'un plus grand débit cardiaque (Pichon, 2009, 2013). L'ensemble de ces adaptations permet au plateau Pika de conserver un transport d'O₂ suffisant vers les organes même au sein de son terrier.

Il a été démontré que les Pikas avaient un taux d'hématocrite plus faible comparé à celui des rats (Tableau 2) mais qu'ils arrivaient à maintenir une PaO₂ haute malgré leur vie en altitude (Ge, 1998). Pour ce qui est des paramètres ventilatoires, les Pikas présentent, toujours comparés aux rats, une ventilation minute ainsi qu'un volume courant plus élevés associés à un ratio Ti/Ttot plus grand et un temps inspiratoire plus faible (Pichon, 2009). A une PiO₂ de 80mmHg, ce qui correspond à l'altitude de vie du Pika, lorsque l'on compare les Pikas avec des rats acclimatés à l'altitude (8 jours à 4600m), on remarque que les Pikas possèdent toujours un V_T plus élevé, associé à une fréquence respiratoire plus faible que les rats. Cela montre bien que le Pika a développé une adaptation spécifique de la ventilation en modifiant son patron ventilatoire et en favorisant la ventilation alvéolaire. Néanmoins, malgré ces adaptations, la RVH n'était pas différent entre les Pikas et les rats.

Tableau 2: Comparaison des paramètres hématologiques entre le rat et le pika.



	Rat	Pika
Hémoglobine (g/dl)	15.92 ± 0.32	10.7 ± 0.31*
Hématocrite (%)	54.12 ± 1.23	45.8 ± 1.63*

* $p < 0.05$ vs rat (Ge, 1998)

2. Implication des neurotransmetteurs chez le Pika

Différentes études ont déjà démontré le rôle de la voie de signalisation du NO dans la réponse ventilatoire et l'acclimatation à l'hypoxie (Cf. II-1).

Des expériences ont donc été menées pour connaître l'implication du NO chez le Pika. Lorsqu'un inhibiteur du nNOS (SMTC) a été injecté chez les Pikas, aucun effet n'a été observé sur la ventilation à 80mmHg. En revanche, pour une PIO_2 de 56mmHg, l'injection de SMTC a entraîné une augmentation de la ventilation via une augmentation du V_T plus importante que sous NaCl (Pichon, 2009) montrant un rôle du NO dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë mais pas dans le phénomène d'adaptation à long terme à l'hypoxie chronique.

Un autre neurotransmetteur étudié chez le Pika est la Dopamine. Comme déjà décrit précédemment, la Dopamine semble être un modulateur de la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Afin de mettre en évidence un potentiel effet de la Dopamine chez le Pika, un antagoniste des récepteurs D1 et D2 a été utilisé : l'halopéridol. Lorsqu'elle est injectée aux Pikas, cette drogue n'a entraîné aucun effet sur la ventilation à 80 et 56mmHg, indiquant que le système dopaminergique ne serait pas impliqué dans les adaptations ventilatoires chez le Pika (Pichon, 2009).

III. L'érythropoïétine

A. Description générale

L'érythropoïétine est une hormone glycoprotéique de 34KDa (Lai, 1986), composée à 60% d'acides aminés et à 40% de glucides. Ce gène code pour une glycoprotéine de 193 acides aminés, qui sera clivée pour donner une protéine mature et fonctionnelle de 165 acides aminés. Le clonage de l'Epo a été réalisé chez de nombreuses espèces de mammifères (rat, souris, etc) et chez le poisson et la grenouille (Chou, 2004; Jacobs, 1985; McDonald, 1986; Miyake, 1977; Nogawa-Kosaka, 2010; Shoemaker & Mitscock, 1986). L'étude du gène codant pour l'Epo a montré une grande conservation entre les espèces. Le gène humain de l'Epo présente en effet une grande homologie de séquence avec celui du singe (92%) et des rongeurs ($\approx 80\%$) (Jelkmann, 1992; Nagao, 1992; Wen, 1993). Au sein de l'organisme, l'Epo a pour principale fonction de stimuler l'érythropoïèse, c'est à dire la production de nouveaux globules rouges.

L'étude de la production d'Epo chez la souris a montré que les sites de production d'Epo changent au cours du développement de manière simultanée avec les sites de production d'érythrocytes. Chez la souris, dès le 8^{ème} jour de gestation (E8) et jusqu'à E11, les érythrocytes sont produits au niveau du sac vitellin. L'Epo est quand à elle produite par les cellules de la crête neurale et du neuro-épithélium (Suzuki, 2013). A partir de E11 et jusqu'à la naissance, le foie devient le principal site de l'érythropoïèse. A ce niveau là, la production d'Epo est assurée par les hépatocytes (Obara, 2008; Suzuki, 2015). Des études ont montré qu'à ce stade de développement embryonnaire, la production hépatique d'Epo est essentielle à l'érythropoïèse. En effet, l'utilisation de souris knockout pour l'Epo ou le récepteur à l'Epo (Epo-R) ont montré une mort fœtale à E13, soit avant la mise en place de la production d'Epo par les reins (Wu, 1995). Enfin, après la naissance, la production d'érythrocytes est assurée par la moelle osseuse et la rate. L'Epo est alors synthétisé au niveau des reins (Suzuki, 2011) par les cellules rénales productrices d'Epo (REP). Ces cellules se trouvent au niveau du cortex rénal et dans les régions profondes de la médulla rénale (Obara, 2008; Pan, 2011; Yamazaki, 2013). Il a été mis en évidence récemment que l'angiotensine II, molécule impliquée dans la régulation du volume plasmatique et de la pression artérielle, serait un régulateur de la production d'Epo (Kim, 2014).

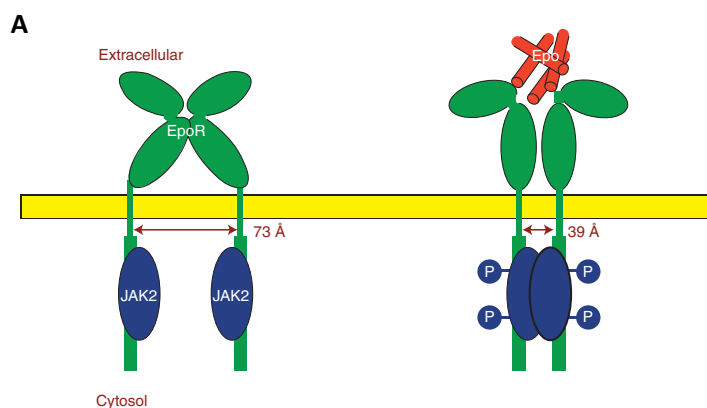
Même si la production d'Epo chez l'adulte se fait majoritairement au niveau des reins, de récentes études ont permis de mettre en évidence d'autres zones de production de l'Epo et/ou de

l'expression de son récepteur, suggérant ainsi d'autres fonctions de l'Epo au sein de l'organisme. Parmi ces autres zones, on trouve par exemple la rétine, les testicules, les poumons, le cœur, mais aussi le système nerveux central (Gassmann, 2003; Jelkmann, 2007).

1. Le récepteur transmembranaire à l'Epo (Epo-R)

Le récepteur transmembranaire est un homodimère composé de trois parties : une partie extracellulaire sur laquelle va se fixer l'Epo, une partie membranaire et une partie cytoplasmique. En configuration de base, les deux domaines cytoplasmiques (proximal et distal) sont séparés d'une distance de 73Å (Livnah, 1999). La partie proximale ne possède pas d'activité catalytique propre mais est liée à la protéine JAK2 (Janus Kinase 2), une tyrosine kinase essentielle pour l'initiation de la cascade intracellulaire (Witthuhn, 1993). La partie distale est quand à elle impliquée dans l'arrêt du signal de transduction.

Quand l'Epo se fixe sur la partie extracellulaire, celle-ci subit un changement de conformation qui entraîne le rapprochement des deux domaines cytoplasmiques à 39Å de distance (Figure 12A). Cela permet la transphosphorylation et l'activation des tyrosines JAK2 de chaque monomère et donc l'activation du récepteur (Remy, 1999). Cela entraîne le déclenchement de plusieurs voies de signalisation intracellulaire telles que STAT5, ERK, PI3K/AKT ou encore NF-κβ (Digicaylioglu & Lipton, 2001; Rossert & Eckardt, 2005) (Figure 12B). Ces voies de signalisation peuvent agir de manière directe ou indirecte sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose et/ou la prolifération cellulaire, notamment BCL2 et BCLX (gènes anti-apoptotiques) ainsi que les caspases 3 et 9 (gènes pro-apoptotiques).



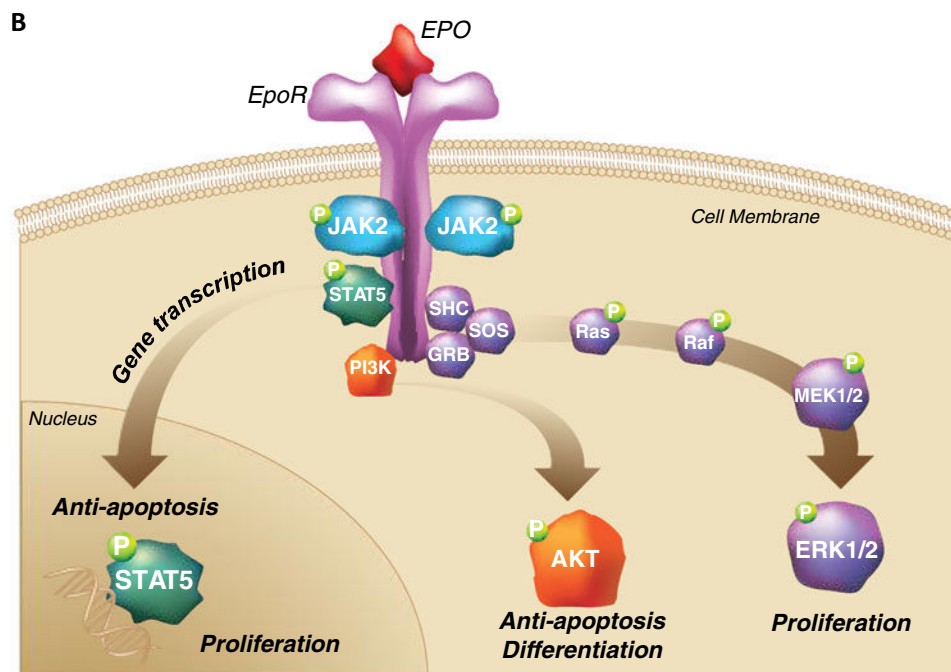


Figure 12 : Signalisation de l'érythropoïétine. A, Dimérisation du récepteur à l'Epo (Bunn, 2013) ; B, Voies de signalisation de l'Epo (Elliott, Sinclair, Collins, Rice, & Jelkmann, 2014)

2. Le récepteur soluble à l'Epo (SEpo-R)

La synthèse du récepteur soluble est réalisée par épissage alternatif à partir du gène codant pour l'Epo-R. Il n'est constitué que de la partie extracellulaire du récepteur transmembranaire (Nagao, 1992), ce qui lui permet de conserver sa capacité à fixer l'Epo. Il a été localisé dans le plasma, le foie, les reins, la moelle osseuse et dans le système nerveux central (Arcasoy, 2003; Della Ragione, 2007; Ferro, 1993; Soliz, 2007). Sa fonctionnalité et sa capacité à lier l'Epo a déjà été démontrée (Baynes, 1993; Yet & Jones, 1993). La fonction du SEpo-R reste néanmoins mal connue, même si l'on sait que les récepteurs solubles aux cytokines jouent un rôle dans la modulation d'activité de la cytokine et que le SEpo-R pourrait avoir un rôle analogue (Venkatesha, 2006, 2015). On peut penser que le SEpo-R pourrait jouer un rôle antagoniste en diminuant la concentration effective d'Epo à destination des organes. Il a été mis en évidence qu'une perfusion de SEpo-R directement dans les ventricules cérébraux avait pour effet de réduire la concentration intracérébrale (Soliz, 2007). La relation entre SEpo-R et HVR a été évaluée dans plusieurs études. En 2011, une équipe a démontré que l'hypoxie intermittente (6h par jour) entraînait une diminution de l'expression du SEpo-R chez l'Homme (Brugniaux, 2011). Dans cette même étude, il a été mis en évidence une corrélation négative entre SEpo-R et Epo mais aussi entre SEpo-R et V_T , montrant donc un lien entre réponses

ventilatoires et Epo. Plus récemment, il a été mis en évidence que l'injection de SEpo-R avait pour effet de diminuer le VT chez les mâles et la fR chez des souris femelles (Ballot, 2015) (Figure 13B, C).

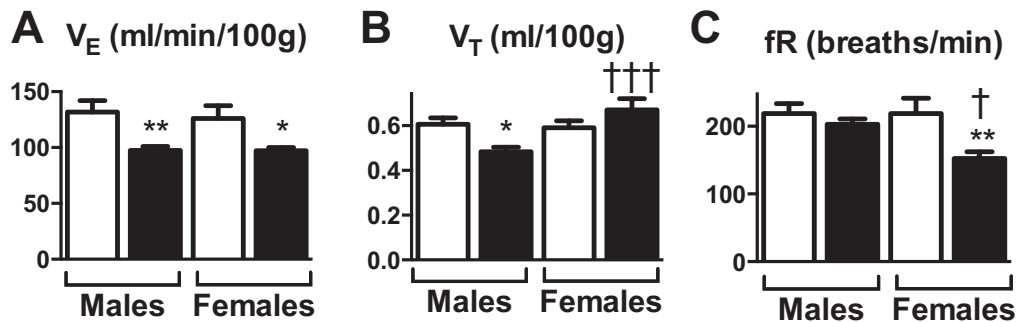


Figure 13 : Paramètres ventilatoires après injection de SEpo-R (en noir). Débit ventilatoire, A ; Volume courant, B ; Fréquence respiratoire, C. (Ballot, 2015)

3. Epo et système nerveux central

L'étude du rôle de l'Epo au sein du système nerveux central a été initiée suite à la découverte de la synthèse d'Epo directement dans le cerveau, par les neurones et les cellules gliales (Digicaylioglu, 1995; Marti, 2004). L'Epo synthétisée au niveau du SNC jouerait un rôle local, puisque l'Epo ne peut pas passer facilement la barrière hémato-encéphalique (Lieutaud, 2008; Xenocostas, 2005; Zhang, 2010). Concernant l'Epo-R, l'expression de ce dernier a aussi été retrouvée au sein du SNC, au niveau des neurones, des astrocytes et des cellules endothéliales (Bernaudin, 1999, 2000; Brines, 2000; Digicaylioglu, 1995; Marti, 2004; Masuda, 1994; Sirén, 2001a, b). Plus récemment, l'équipe de Jorge Soliz a mis en évidence une expression d'Epo-R dans le bulbe rachidien, au niveau du NTS (zone de projection des afférences périphériques des corps carotidiens) et du complexe de pré-Botzinger, régions déjà décrites comme étant des régions primordiales dans le contrôle de la ventilation (Figure 14A). Dans cette même étude, l'expression d'Epo-R a également été retrouvée au niveau des corps carotidiens, déjà décrits comme étant des chémorécepteurs périphériques (Soliz, 2005) (Figure 14B).

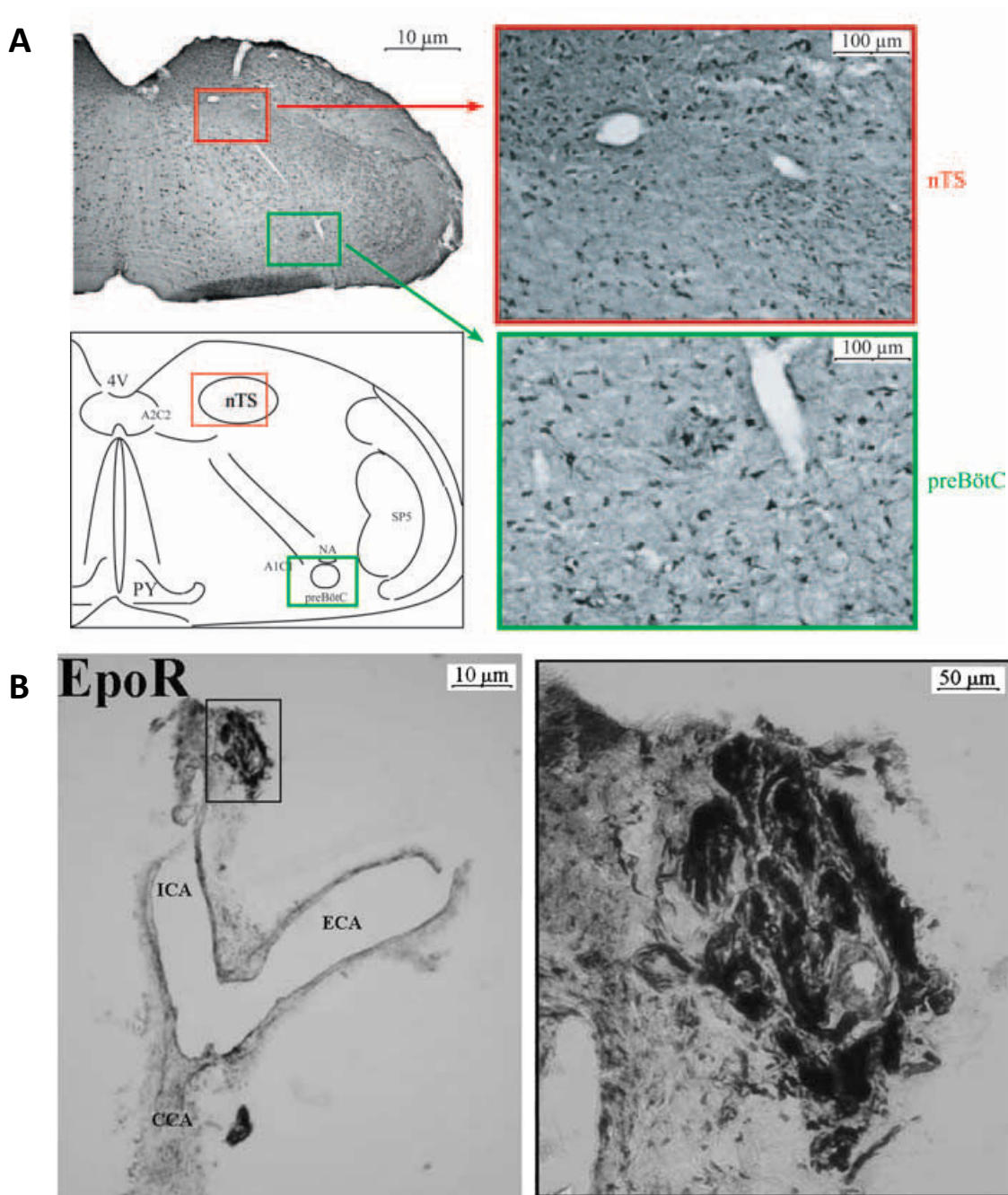


Figure 14 : Immunohistochimie montrant la présence de Epo-R. A, dans le SNC ; B, au niveau des corps carotidiens (Soliz, 2005)

Au sein du SNC, l'étude du rôle de l'Epo a permis de mettre en évidence que le couple Epo/Epo-R a un effet neuroprotecteur en cas de conditions pathologiques, comme par exemple en cas d'ischémie cérébrale (Vogel & Gassmann, 2011) ou d'encéphalopathies (Juil, 2012; Wu, 2012). Il a été démontré que cet effet neuroprotecteur passerait notamment par un effet anti-apoptotique (Silva, 1996; Sola, 2005; Tanaka, 2001) mais aussi par des effets anti-cytotoxiques (Morishita, 1996), anti-oxydatifs (Koshimura, 1999) et anti-inflammatoires (Villa, 2003). De plus, il semblerait que l'Epo ait un effet sur

la plasticité neuronale (Almaguer-Melian, 2015) et sur la prolifération des cellules progénitrice neuronales (Chen, 2007).

4. Autres rôles de l'Epo

a) Epo et muscle

Dès les années 2000, la présence d'Epo-R a été mise en évidence dans des biopsies musculaires, suggérant ainsi un rôle de l'Epo dans la fonction ou le métabolisme musculaire. Ces effets ont été depuis largement décrit chez l'Homme, notamment lors de son utilisation chez les sportifs afin d'améliorer leurs performances (Lundby, 2008, 2011). Lors d'expériences effectuées chez les animaux, il a été mis en évidence une expression de l'Epo-R au niveau des myoblastes et des cellules satellites (Ogilvie, 2000; Rundqvist, 2009). En condition d'hypoxie, des études sur des animaux déficients en Epo ont permis de mettre en évidence une adaptation qui passe par une augmentation de l'angiogenèse (Hagström, 2010). De plus, chez les souris déficientes en Epo, il n'a pas été retrouvé d'altération phénotypique ou fonctionnelle du muscle comme cela a été observé chez les souris contrôle (Hagström, 2010). Dans ces expériences, aucune expression d'Epo n'a été retrouvée dans les muscles des souris, ce qui est en concordance avec un effet indirect de l'Epo sur le tissu musculaire.

b) Epo et fonction cardiaque

De nombreuses expériences ont suggéré le cœur comme étant un des autre lieu de production d'Epo (Bin-Jaliah, 2010; Cai & Semenza, 2004). Par la suite, il a été mis en évidence une expression du gène de l'Epo dans le tissu cardiaque (Hoch, 2011; Miró-Murillo, 2011) et une expression de l'Epo-R dans les cellules progénitrices cardiaques (Zafiriou, 2014). L'étude des effets de l'Epo a permis de mettre en évidence un rôle cardioprotecteur de l'Epo qui passe par des effets pro-angiogéniques, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires au niveau du cœur (Kertesz, 2004; Marzo, 2008; Sanchis-Gomar, 2014). De plus, l'injection d'Epo stimule la différenciation des cellules progénitrices cardiaques et cellules endothéliales. Chez des souris déficientes en Epo, il a été observé une hypertrophie au niveau des deux ventricules cardiaques (Macarlupú, 2006) conduisant à un volume systolique et à un débit cardiaque plus élevés. Néanmoins, l'apport en O₂ était toujours plus faible chez ces souris comparées aux souris contrôle. En hypoxie chronique, l'hypertrophie cardiaque

normalement observée (Favret, 2001) était réduite chez les souris déficientes en Epo et ces dernières ne présentaient pas d'hypertension pulmonaire (El Hasnaoui-Saadani, 2013). L'ensemble de cette étude a permis de mettre en évidence une altération du myocarde en cas de déficience en l'Epo, qui serait à l'origine de l'absence d'adaptation observée en cas de condition pathologique (hypoxie).

B. Epo et adaptations ventilatoires

L'implication de l'Epo dans les régulations ventilatoires est un sujet d'étude récent. En 2007, Yacin et son équipe ont réalisés des injections d'Epo à différentes doses chez le rat anesthésié, montrant une stimulation des paramètres respiratoires de manière dose-dépendante (Yalcin, 2007). Parmi les paramètres stimulés, on retrouve notamment la fréquence cardiaque ainsi que le volume courant, ce qui entraîne une augmentation du débit ventilatoire, et ce dès la première minute de stimulation, et jusqu'à 40 minutes (Yalcin, 2007). Dans une étude plus récente, l'injection intrathécale d'Epo (dans le liquide céphalo-rachidien, au niveau lombaire) à différentes doses chez le rat a montré une modulation de l'activité du nerf phrénique dès 30 minutes et jusqu'à 90 minutes après l'injection (Dale, 2012). Plus récemment, une étude a montré que l'injection d'Epo carbamylée (C-Epo) chez la souris entraînait une augmentation de la ventilation en normoxie et une plus grande RVH (Khemiri, 2016). Récemment, une étude a mis en évidence que l'injection d'Epo n'entraînait aucun effet sur la RVHc (Ballot, 2015).

A ce jour, plusieurs modèles de souris transgéniques présentant des modifications d'expression de l'Epo sont disponibles :

- Les souris Epo-TAg^h : ces souris présentent une déficience systémique et cérébrale en Epo (Binley, 2002).
- Les souris Tg6 : ces souris présentent une surexpression de l'Epo au niveau plasmatique (12 fois supérieur à la normale) et central (26 fois supérieur à la normale) (Ruschitzka, 2000).
- Les souris Tg21 : ces souris présentent une surexpression d'Epo au niveau cérébral (4 fois supérieur à la normale) ce qui permet l'étude des effets centraux de l'Epo in vivo en s'affranchissant des effets périphériques (Wiessner, 2001).

1. Epo et modulation de la ventilation en normoxie

L'étude des paramètres ventilatoires en normoxie a permis de mettre en évidence une ventilation plus importante chez les souris mâles Epo-TAg^h (Macarlupú, 2006a; Macarlupú, 2006b)¹ et les souris femelles Tg6 (Gassmann, 2009). Chez ces deux lignées, la ventilation plus importante était due à une augmentation du volume courant (V_T) par rapport aux souris contrôles. De manière intéressante, les souris femelles Tg21 présentaient elles aussi une augmentation du V_T mais associée à une diminution de la fréquence respiratoire (Gassman, 2009) (Figure 15). En revanche, aucune modification de la ventilation n'a été observée chez les souris mâles Tg6 (Soliz, 2007) et Tg21 (Gassman, 2009). Ces observations en normoxie suggèrent déjà un dimorphisme sexuel dans la régulation de la ventilation que nous décrivons plus loin.

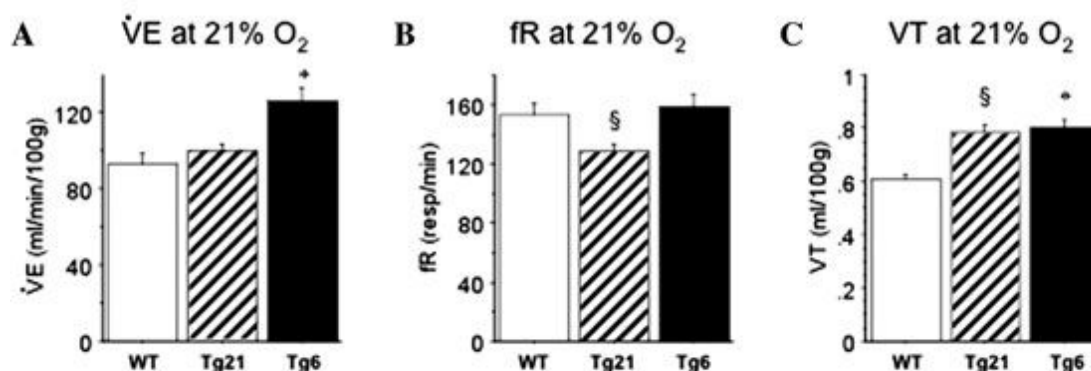


Figure 15 : Paramètres ventilatoires en normoxie chez des souris femelles WT, Tg21 et Tg6. A, $\dot{V}E$; B, fR ; C, V_T (Gassmann, 2009).

2. Expression de l'Epo et hypoxie

La transcription du gène de l'Epo est liée au niveau d'O₂ dans le sang. En effet, la séquence contient un élément de réponse à l'hypoxie (HRE). Cet élément permet sa reconnaissance et son activation par le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Wang, 1993). Les mécanismes d'activation de HIF en hypoxie ont déjà été détaillés précédemment (II-2-b). L'induction de l'expression de l'Epo par HIF-1 a été mise en évidence très tôt (Semenza, 1997) mais de récentes études semblent indiquer que HIF-2 serait le principal inducteur de l'expression de l'Epo en hypoxie (Chavez, 2006; Gruber, 2007). Chez des souris anémiques, ou soumises à l'hypoxie, il a été mis en

¹ Ce résultat n'a pas été observé dans nos récentes études (Cf. Article 1 et résultats). Ce point de différence sera abordé dans la discussion.

évidence une augmentation de l'expression d'Epo au niveau des reins (Obara, 2008 ; Susuki, 2011). En revanche, la production d'Epo au niveau du foie n'est pas suffisante pour compenser une anémie (Yamazaki, 2013). En cas d'exposition à la haute altitude (4300m), il a été observé une augmentation des taux d'Epo dans le plasma, avec un pic à 48h (Abbrecht & Littell, 1972; Robach, 2004).

a) *Epo et hypoxie aigue*

La réponse ventilatoire à l'hypoxie aigue (RVH, $O_2= 6-10\%$) a été étudiée pour les trois lignées : Epo-TAg^h, Tg6 et Tg21. Depuis 2006, les résultats observés sur les souris Epo-TAg^h par l'équipe de Jean-Paul Richalet ont montré une réponse ventilatoire à l'hypoxie plus importante chez ces souris Epo-TAg^h (Macarlupu, 2006a)².

Chez les souris Tg6 mâles, il a été mis en évidence une réponse ventilatoire à l'hypoxie modérée (10%) et sévère (6%) par une augmentation du \dot{V}_E similaire à celle observée chez les WT. Néanmoins, il a été mis en évidence une modification du patron ventilatoire. En effet, chez les WT, l'augmentation de la ventilation est due à une augmentation du V_T alors que chez les Tg6, cette augmentation est due à une augmentation de la f_R plus importante que chez les WT (Soliz, 2007). La même observation a été faite chez les souris femelles, avec en plus la mise en évidence d'une RVH plus importante des souris Tg6 par rapport aux souris WT, en hypoxie modérée et sévère (Gassman, 2009).

Chez les souris Tg21, la RVH est similaire à celle observée chez les WT pour une hypoxie modérée, mais est plus élevée en cas d'hypoxie sévère. À 6% d' O_2 , l'étude du patron ventilatoire mis en pace a montré une fréquence respiratoire plus importante chez les Tg21 (Soliz, 2005).

² Nous n'avons pas observé une RVH plus importante chez les Epo-TAg^h dans nos récentes études (Cf. Article 1). Ce point de différence sera abordé dans la discussion.

b) Epo et adaptation à l'hypoxie chronique

La caractérisation du rôle du système hématopoïétique dans les adaptations physiologiques à l'hypoxie chronique s'est fait au 19^{ème} siècle. En effet, dans son livre « Pression de l'air sur la vie de l'Homme », Jourdanet établit un lien entre la haute altitude et un changement dans la composition du sang, qu'il décrit comme devenant épais et sombre (Jourdanet, 1875). Dès 1878, Bert a suggéré que l'augmentation de globules rouges en hypoxie serait un mécanisme d'adaptation visant à augmenter le transport d'O₂ afin de compenser la diminution de la pression partielle en O₂ (Bert, 1878). Cette théorie a depuis été largement confirmée (Gunga, 2007; West, 2013). Le lien entre hypoxie chronique et expression d'Epo a été mis en évidence dès 1990. Dans cette étude, des rats ont été mis en hypoxie hypobarique pendant une durée allant de 15min à 20 jours. La mesure de la production d'Epo a permis de mettre en évidence une augmentation de la production d'Epo dès 30min d'hypoxie et qu'elle persistait après arrête de la stimulation (Cahan, 1990). En 1996, il a été mis en évidence qu'en cas de diminution des niveaux d'O₂ dans l'organisme, la synthèse rénale d'Epo pouvait augmenter jusqu'à 200 fois par rapport à son niveau de base (Marti, 1996). De plus, l'Epo joue un rôle direct qui permet d'inhiber l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et de favoriser leur différenciation et leur maturation (Jelkmann, 2013; Lacombe & Mayeux, 1999). En hypoxie, l'augmentation de la synthèse rénale d'Epo est un phénomène rapide : dans les deux heures qui suivent une exposition en haute altitude (4300m), les niveaux d'Epo plasmatiques augmentent progressivement jusqu'à atteindre un pic entre 24h et 48h en fonction de l'espèce et de l'intensité de la stimulation (Abbrecht, 1972 ; Robach, 2004).

Le rôle de l'Epo dans l'adaptation ventilatoire à l'hypoxie chronique a été précisé via des études sur les lignées Epo-TAg^h (mâles) et Tg6 (femelles). Chez les Epo-TAg^h, il a été mis en évidence une augmentation de la ventilation après 1, 5 ou 14 jours d'hypoxie chronique à une altitude simulée de 4300m (Macarlupu, 2006b), suggérant que l'Epo n'était pas indispensable à la mise en place de la RVH. Pour la lignée Tg6, après 3 jours d'exposition, les souris mâles ont montré une augmentation de la ventilation (Soliz, 2007) alors que chez les femelles, aucune adaptation à l'hypoxie chronique n'a été observée (Gassmann, 2010).

Lorsque les animaux acclimatés à l'hypoxie chronique sont ensuite soumis à une stimulation hypoxique (hypoxie aigue), il a été mis en évidence une modification du patron ventilatoire mis en place dans la RVH entre les souris WT et Tg6 (mâles et femelles), modification identique à celle observée en hypoxie aigue classique (Soliz, 2007 ; Gassman, 2010).

Si l'Epo est impliqué dans l'adaptation à l'hypoxie chronique, il semblerait que son récepteur ait aussi un rôle important. Des études ont été réalisées chez le rat *Spalax galili*, un rat taupe qui vit dans des galeries souterraines où les niveaux d'O₂ sont très bas. Les études sur cette espèce ont été réalisées car elle présente une résistance à l'hypoxie. L'analyse des récepteurs Epo-R a montré leur grand nombre au niveau des cellules hématopoïétiques. De plus, ces récepteurs présentent une mutation au niveau de leur partie extracellulaire qui entraîne des modifications au niveau de leurs propriétés de migration et de maturation. *In fine*, ces modifications permettent l'augmentation de la capacité de transport de l'O₂ en augmentant la production de globules rouges matures (Ravid, 2007). D'autres études ont montré une implication du récepteur à l'Epo dans l'homéostasie de l'oxygène : en 2014, une étude a mis en évidence que l'hypoxie stimulait l'expression de Epo-R (Beleslin-Cokic, 2004) puis en 2016, il a été démontré que la régulation de Epo-R était dépendante de l'oxygène (Heir, 2016).

Plus récemment, des études se sont intéressées à l'évolution de l'expression de SEpo-R, notamment chez des patients souffrant d'érythroïèse excessive, qui est un des symptômes du mal chronique des montagnes (CMS pour Chronic Mountain Sickness), pathologie survenant lors d'une exposition prolongée à la haute altitude. Chez ces patients, il a été mis en évidence une diminution de l'expression de SEpo-R, ce qui augmenterait la disponibilité de l'Epo, et pourrait induire une érythroïèse excessive (Villafuerte, 2014). Il a alors été suggéré l'importance du ratio Epo/SEpo-R dans l'adaptation à l'hypoxie chronique.

c) *Epo et chémorécepteurs*

Après avoir déterminé l'implication de l'Epo dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie, des équipes se sont intéressées aux mécanismes d'action permettant à l'Epo de moduler cette réponse. Au niveau du système nerveux central, l'expression d'Epo-R a été retrouvée au niveau du cerveau et plus particulièrement dans le préBotC et le NTS, chez les souris WT et Tg21, ce qui suggère que l'Epo a la capacité de moduler la ventilation en agissant directement sur le CNS (Soliz, 2005).

En 2009, l'équipe de Gassman a réalisé des injections d'Epo humaine (Rhu-Epo) chez des sujets humains et chez des souris WT. Chez les souris mâles, aucun effet de l'injection d'Epo n'a été mis en évidence sur la ventilation basale et sur la réponse à l'hypoxie sévère. Chez l'homme, l'injection d'Epo a eu pour effet de diminuer la RVH.

Chez les souris femelles, l'injection d'Epo entraîne une augmentation de la ventilation en normoxie et de la RVH. Chez la femme, seule une augmentation de la RVH a été induite par cette injection

(Gassman, 2009). Sachant que les mesures ont été faites juste après l'injection, l'Epo injectée n'a pas le temps de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, il a été mis en évidence que seul une faible proportion d'Epo pouvait passer la BHE, et cela après un temps très long (Xenocostas, 2005 ; Lieutaud, 2008 ; Zhang, 2010). Les résultats observés dans cette étude résultent donc d'un effet périphérique de l'Epo.

Dans une autre étude, des souris WT et Tg21 ont été chémodénervées, ce qui veut dire que le nerf sinusal au niveau des corps carotidiens a été sectionné, et cela de manière bilatérale (cf. Matériel et méthodes). Après chémodénervation, les souris WT perdent leur capacité à répondre à l'hypoxie aiguë. En revanche, on observe toujours une RVH chez les souris Tg21 (Soliz, 2005). L'ensemble de ces résultats montre bien l'existence d'une interaction entre l'Epo et les corps carotidiens dans la régulation de la ventilation chez les souris WT mais également une capacité de l'Epo à amplifier la réponse centrale à l'hypoxie.

Ces résultats suggèrent donc que l'Epo est capable de moduler la ventilation en agissant sur les chémorécepteurs périphériques mais également au niveau central.

Au niveau du SNC, des expériences d'injection intra-cisternale de SEpo-R ont également permis de mettre en évidence une abolition de la VAH (Soliz, 2007) et de la RVH (Ballot, 2015) chez la souris adulte et nouveau-né. En revanche, aucun effet de l'injection de SEpo-R n'a été observé sur la RVHc.

3. Epo et hormones sexuelles

Dès 1997, l'équipe de Joseph avait mis en évidence un lien entre hormones sexuelles et Epo. En administrant chez des rats mâles des hormones sexuelles femelles (Progestérone et oestradiol), il avait été mis en évidence une diminution de la concentration d'Epo. Dans cette même étude, les animaux ayant reçu les hormones présentaient une diminution de la recapture de la dopamine au niveau des corps carotidiens ainsi qu'une diminution de l'activité des neurones noradrénergiques au niveau du NTS (Favier, 1997).

En 2010, Gassman et son équipe ont étudié l'interaction entre l'oestradiol et les corps carotidiens chez les souris WT et Tg6. Ils ont mis en évidence un taux d'oestradiol 4 fois supérieur chez les souris Tg6. La première partie de l'étude consistait à chémodénervé les souris. De manière intéressante, la chémodénervation avait pour effet de restaurer une acclimatation ventilatoire à l'hypoxie chez les Tg6, suggérant que l'absence d'acclimatation chez ces souris était due à un effet inhibiteur de l'Epo

sur les corps carotidiens. La suite des expériences a consisté en une ovariectomie des souris, qui a eu pour effet une diminution de l'acclimatation à l'hypoxie chez les WT mais encore une fois une restauration de cette réponse chez les Tg6 (Gassmann, 2010). Sur ces mêmes souris ovariectomisées, l'injection d'œstradiol avait pour effet d'abolir l'acclimatation à l'hypoxie chez les Tg6. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une interaction entre Epo et œstradiol au niveau des corps carotidiens. En 2009, cette même équipe avait déjà mis en évidence une HVR différente entre les mâles et femelles des différentes lignées transgéniques. Les résultats observés sont les suivants (Figure 16) :

- WT : RVH légèrement plus grande chez les femelles
- Tg6 : RVH plus importante chez les femelles
- Tg21 : RVH identique entre les mâles et les femelles

Les autres observations sont que les mâles Tg21 ont une RVH plus élevée que les mâles WT et que les femelles Tg6 ont une RVH plus élevée que les WT et les Tg21. Il pourrait donc y avoir un effet additif de l'Epo au niveau des chémorécepteurs périphériques en présence d'hormones sexuelles femelles.

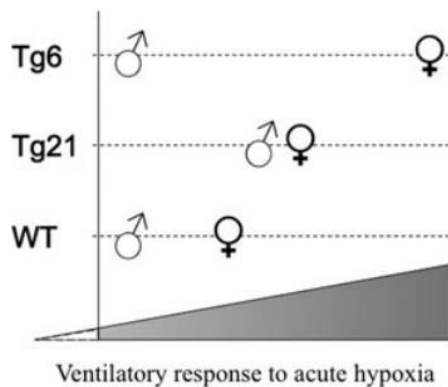


Figure 16 : Différentes réponses ventilatoire à l'hypoxie entre les souris WT, Tg21 et Tg6 (Gassmann, 2009).

IV. Objectifs de la thèse

Nous avons décrit précédemment les nombreuses études qui ont été réalisées afin de déterminer les mécanismes de régulation de la ventilation et de la mise en place des réponses ventilatoires. Dans la mise en place de la réponse à une hypoxie aiguë ou à une acclimatation ventilatoire à l'hypoxie, l'Epo jouerait également un rôle majeur, notamment via la présence de ses récepteurs au niveau du SNC et des corps carotidiens.

PARTIE 1

Les premiers travaux de cette thèse se sont donc intéressés aux **réponses ventilatoires à l'hypoxie (RVH) et à l'acclimatation ventilatoire à l'hypoxie (VAH)** ainsi qu'à l'implication de l'Epo et de différents neurotransmetteurs. Pour cela, nous avons utilisé des souris déficiente en Epo (Epo-TAG^h) mais aussi un animal adapté à l'hypoxie, le plateau Pika :

- Rôle catalyseur de l'Epo sur la voie centrale du NO dans la RVH chez des souris déficientes en Epo (Article 1)

Différentes expériences ont été réalisées dans cette étude :

- Etude de la réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë et à l'hypoxique chronique chez les animaux contrôle et déficients en Epo par pléthysmographie.
- Injection d'un inhibiteur de nNOS (SMTC) ou d'un antagoniste des récepteurs NMDA (MK-801) et mesure des paramètres ventilatoires par pléthysmographie.

- Rôle du glutamate et de la sérotonine dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez une espèce adaptée à la haute altitude : le Plateau Pika (Article 2)

Cette étude a été réalisée sur un animal adapté à l'hypoxie, le plateau Pika, sur lequel plusieurs expériences ont été réalisées :

- Mesure des paramètres ventilatoires par pléthysmographie avant et après hypoxie aiguë.
- Injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA (Memantine), d'un antagoniste des récepteurs non-NMDA (DQNX), d'un inhibiteur de la NO synthase (L-NAME) ou d'un inhibiteur de la récepteur de la sérotonine (Fluoxétine) associée à la mesure des paramètres ventilatoires par pléthysmographie.

- Comparaison des stratégies ventilatoires mises en place en réponse à l'hypoxie-hypercapnique chez le rat acclimaté et un animal adapté à l'hypoxie : le Plateau Pika (*Ochotona Curzoniae*) (Article 3)

Afin de comparer l'adaptation ventilatoire entre le rat et le plateau Pika, différentes expériences ont été réalisées :

- Comparaison des valeurs des variables ventilatoires entre le rat et le Pika avant et après hypoxie-hypercapnique par pléthysmographie.
- Mesure des gaz du sang
- Analyses biochimiques (ARNm et protéine) du nNOS et NMDA-R1.

PARTIE 2

Au début de mon travail doctoral, aucune étude n'avait été publiée sur le rôle de l'Epo et de son récepteur dans la **réponse ventilatoire à l'hypercapnie (RVHc)**. C'est donc cette partie qui a constitué le thème central de ma thèse. Les objectifs principaux portaient donc sur les points suivants :

- Rôle de l'Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

Afin de déterminer si l'Epo a une influence sur la mise en place de la RVHc, différentes séries expérimentales ont été réalisées :

- Une approche pléthysmographique avec calorimétrie indirecte, sur des animaux WT et déficient en Epo (Epo-TAg^h), mâles et femelles, afin de mesurer les paramètres ventilatoires et calorimétriques en normocapnie et en hypercapnie (4% CO₂).
- Une approche immunohistochimique, sur ces mêmes lignées, afin de déterminer l'activité neuronale en normocapnie et en hypercapnie (4% CO₂) en utilisant le proto-oncogène c-fos.
- Une approche pharmacologique, via l'utilisation d'Epo recombinante humaine : des injections intraveineuses et intracisternales (dans le liquide céphalo-rachidien) ont été réalisées afin d'objectiver l'effet de l'Epo sur le SNC et/ou les chémorécepteurs périphériques.

- Rôle des hormones sexuelles sur la RVHc

Certains résultats obtenus dans la première série expérimentale et les études déjà menées sur le rôle potentiel des hormones sexuelles sur la RVH nous ont amenés à réaliser une autre série

d'expériences chez les souris femelles (WT et Epo-TAg^h) en distinguant les phases du cycle menstruel, afin de déterminer le rôle des hormones sexuelles dans la RVHc et la RVH :

- Une approche pléthysmographique avec calorimétrie indirecte, afin d'étudier l'influence des phases du cycle oestral sur la ventilation basale, sur la RVHc (4% CO₂).
- Une approche pharmacologique, via l'utilisation de Mifepristone (RU486), afin de mettre en évidence le rôle de la progestérone sur la ventilation basale, sur la RVHc (4% CO₂).

- Rôle des chémorécepteurs centraux et/ou périphériques et effets d'une déficience en Epo sur le contrôle de la ventilation en réponse à une stimulation hypercapnique

- Etude de la réponse ventilatoire centrale intrinsèque à l'hypercapnie par une approche *ex vivo* sur des individus nouveau-nés WT et Epo-TAg^h.
- Etude du rôle de l'Epo dans la réponse ventilatoire périphérique (corps carotidiens) en hypoxie et en hypercapnie par une approche *in vivo* (Collaboration au Chili et le Pr Itturiaga et le Dr Del Rio) : enregistrement *in vivo* de l'activité du nerf sinusal carotidien en hypoxie et en hypercapnie, avec ou sans injection d'Epo intraveineuse
- Etude du rôle des chémorécepteurs périphériques dans la RVHc chez les souris WT et Epo-TAg^h par une approche *in vivo* avec section du nerf sinusal carotidien (chémodénervation) (Collaboration au Canada avec J. Soliz et en France avec le Dr Del Rio)

L'ensemble de ces expériences avait pour but de déterminer si l'Epo peut avoir un rôle dans la mise en place de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, puis de préciser ce rôle en déterminant si l'Epo a une action sur les chémorécepteurs périphériques et/ou centraux.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur un modèle de souris transgéniques présentant une anémie chronique due à une déficience en Epo ainsi que sur une espèce animale adaptée à la vie en haute altitude, le Plateau Pika. De plus, certaines de nos études ont été faites chez le rat (Sprague-Dawley et Wistar).

A. Modèle de souris déficiente en Epo : Souris Epo-TAg^h

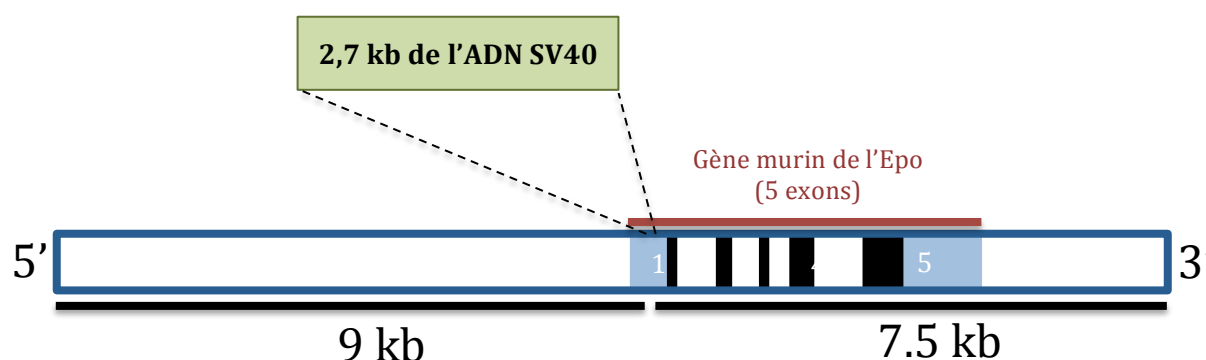


Figure 17 : Modèle de construction du transgène des souris Epo-TAg^h. Adapté de Maxwell, 1993

Ce modèle de souris déficiente en Epo (Epo-TAg^h) a été utilisé pour la première fois en 1993 afin d'identifier les cellules rénales productrices d'Epo (Maxwell, 1993). Cette lignée transgénique a été obtenue en utilisant de l'ADN préparé à partir d'un clone issu du génome de la souche BALB/c contenant le gène murin de l'Epo encadré par des séquences de 9kb en 5' et 7,5kb en 3' (Figure 17). Différentes digestions successives par des enzymes de restriction ont ensuite permis l'insertion d'une séquence du génome viral *Virus simien 40* (SV40) codant pour la séquence T Ag. Ces souris présentaient une expression d'Epo au niveau des reins en réponse à l'anémie. La caractérisation des souris Epo-TAg^h a montré une hématocrite et un taux d'hémoglobine environ 60% plus bas que les souris contrôle (Wild Type, WT) (Tableau 3). Une étude des paramètres hémorhéologiques a montré une diminution de la déformabilité des globules rouges chez les Epo-TAg^h sans impact sur la viscosité, une fois cette dernière rapportée à l'hématocrite (Pichon, 2014). Ce modèle de souris transgénique déficiente en Epo a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal *Hypoxia* (Annexe 1).

Tableau 3 : Comparaison de différents paramètres sanguins, cardiaques, ventilatoires et métaboliques entre les souris WT et Epo-TAg^h.

		WT	Epo-TAg ^h
Paramètres sanguins	Hémoglobine (g/dl)	17.1 ± 0.3	6.9 ± 0.3*
	Hématocrite (%)	54.2 ± 0.8	24.0 ± 1.6*
Paramètres cardiaques	Fréquence cardiaque (bpm)	500 ± 27	548 ± 46
	Volume d'éjection systolique (µl/g)	1.9 ± 0.19	3.2 ± 0.68*
	Débit cardiaque (ml/min/g)	0.94 ± 0.14	1.76 ± 0.43*
	Pression sanguine (mmHg)	96.7 ± 8.5	94.2 ± 5.8
	Poids ventricule droit (mg)	23 ± 1	33 ± 2*
	Poids ventricule gauche et septum (mg)	80 ± 2	113 ± 3*
	Ratio de Fulton	0.288 ± 0.013	0.297 ± 0.010
Paramètres ventilatoires	Débit ventilatoire (ml/min/g)	2.26 ± 0.48	2.17 ± 0.53
	Fréquence respiratoire (cycles/min)	261 ± 34	284 ± 54
	Volume courant (µl/g)	8.63 ± 1.26	7.62 ± 1.09
Paramètres métaboliques	Consommation d'O₂ (ml/min/kg)	93.3 ± 4.7	96.8 ± 6.5
	Consommation d'O₂ maximum (ml/min/kg)	270.7 ± 22.0	210.2 ± 12.3*

* p < 0.05 vs WT (Pichon, 2016)

B. Le Plateau Pika

Deux séries expérimentales ont été réalisées au cours de ma thèse : la première avait pour but d'étudier l'implication du glutamate et de la sérotonine dans la mise en place de la RVH chez le pika (Bai, 2015), la seconde était une étude comparative des stratégies ventilatoires entre le rat et le Plateau pika dans la réponse à une stimulation hypoxique-hypercapnique mimant les conditions de vie dans le terrier (Pichon, 2015).

Des pikas adultes ont été capturés dans leur milieu naturel, à une altitude comprise entre 4050 et 4150m dans une zone privée du plateau tibétain dans la région du Qinghai, avec l'autorisation de la préfecture autonome du Tibet et de l'administration mongole de Haixi. Les animaux ont ensuite été transportés en voiture jusqu'à Xining, où se trouvait le laboratoire (2262m d'altitude – 111mmHg). Ils ont ensuite été placés dans une chambre hypobare permettant de reproduire une altitude simulée

de 5100m ($PiO_2 = 86\text{mmHg}$) correspondant à leur altitude de vie habituelle. Dans les deux séries expérimentales, les expériences ont été réalisées entre 2 et 5 jours après la capture des animaux. Dans la deuxième série expérimentale, les pikas ont été comparés à des rats. Ces derniers provenaient de l'université de Lanzhou et étaient placés en chambre hypobare à une altitude simulée de 4100m pendant 7 jours avant le début des expériences.

II. Pléthysmographie

Toutes les expériences ont été réalisées sur des animaux WT et Epo-TAg^h, mâles et femelles, âgés d'environ 10-12 semaines pour un poids compris entre 20 et 30g.

Les variables ventilatoires ont été mesurées en utilisant la technique de pléthysmographie corps entier (Bartlett & Tenney, 1970) (Figure 18). Cette technique est basée sur la mesure des variations de pressions induite lors de la ventilation. Lorsque l'animal respire dans une enceinte hermétiquement close, l'air inspiré par l'animal est réchauffé et saturé en vapeur d'eau. L'air expiré est refroidi à température ambiante et désaturé en vapeur d'eau. Ces variations de température et de pression de vapeur d'eau, ainsi que les mouvements de la cage thoracique de l'animal induisent des changements de pression détectables par un capteur différentiel de pression (Modèle DP 45-18, Validyne Engineering Northridge, CA, USA) relié à une chambre de référence de volume identique à la chambre de mesure (200ml). Les dernières expériences réalisées pendant ma thèse ont été réalisées à l'aide d'un pléthysmographe Emka Technologies.

Ces variations de pressions lors de la présence d'un animal dans la chambre sont traduites en un signal qui est ensuite digitalisé via une carte d'acquisition puis analysé *via* le logiciel Spike 2 (CED, Cambridge Electronic Design, UK) afin d'obtenir les variables ventilatoires suivantes :

- **Volume courant ($V_T - \mu\text{l/g}$)** : il correspond au volume d'air mobilisé pour chaque cycle respiratoire. Pour cela, l'amplitude d'un cycle respiratoire est mesurée en volts. Afin de pouvoir convertir cette valeur en volume à partir de notre tracé, une calibration a été réalisée au préalable pendant l'enregistrement. Cela consiste à injecter un volume d'air connu dans notre chambre de mesure. En utilisant l'équation de Drorbaugh et Fenn (Drorbaugh & Fenn, 1955) qui prend en compte cette calibration, les températures (chambre de mesure et ambiante), les pressions de saturation en vapeur d'eau à température de la chambre et température de l'animal et la pression atmosphérique, nous obtenons une correspondance entre volume et volts, ce qui permet d'obtenir un V_T exprimé en microlitres.

$$\text{Equation de Drorbaugh et Fenn : } V_T = Pt \times \frac{V_k}{Pk} \times \frac{Tr \times (Pb - Pc)}{(Tr \times (Pb - Pc) - Tc \times (Pb - Pr))}$$

Pt : amplitude de la déflexion due à la respiration (mV)

Vk : volume d'air injecté dans la chambre pendant la calibration (μ l)

Pk : amplitude de la déviation induite par l'injection d'un volume d'air connu lors de la calibration (mV)

Tc : température de la chambre ($^{\circ}$ K)

Tr : température corporelle de l'animale (estimée à 311 $^{\circ}$ K)

Pb : pression atmosphérique (mmHg)

Pr : pression de saturation en vapeur d'eau à la température corporelle (mmHg)

Pc : pression de saturation en vapeur d'eau à la température de la chambre (mmHg)

Afin d'éviter une trop forte variabilité entre les différents animaux, ce paramètre a été rapporté au poids de chaque animal.

- **Fréquence respiratoire (f_R – cycles/min)** : elle correspond au nombre de cycles respiratoires par minute. Elle est obtenue en mesurant la durée d'un cycle respiratoire (T_{Tot} = temps inspiratoire (T_i) + temps expiratoire (T_e)) sur le tracé.
- **Ventilation minute (\dot{V}_E – ml/min/g)** : cela correspond au volume d'air mobilisé par minute. Il a été calculé de la manière suivante : $\dot{V}_E = (V_T * f_R)$.

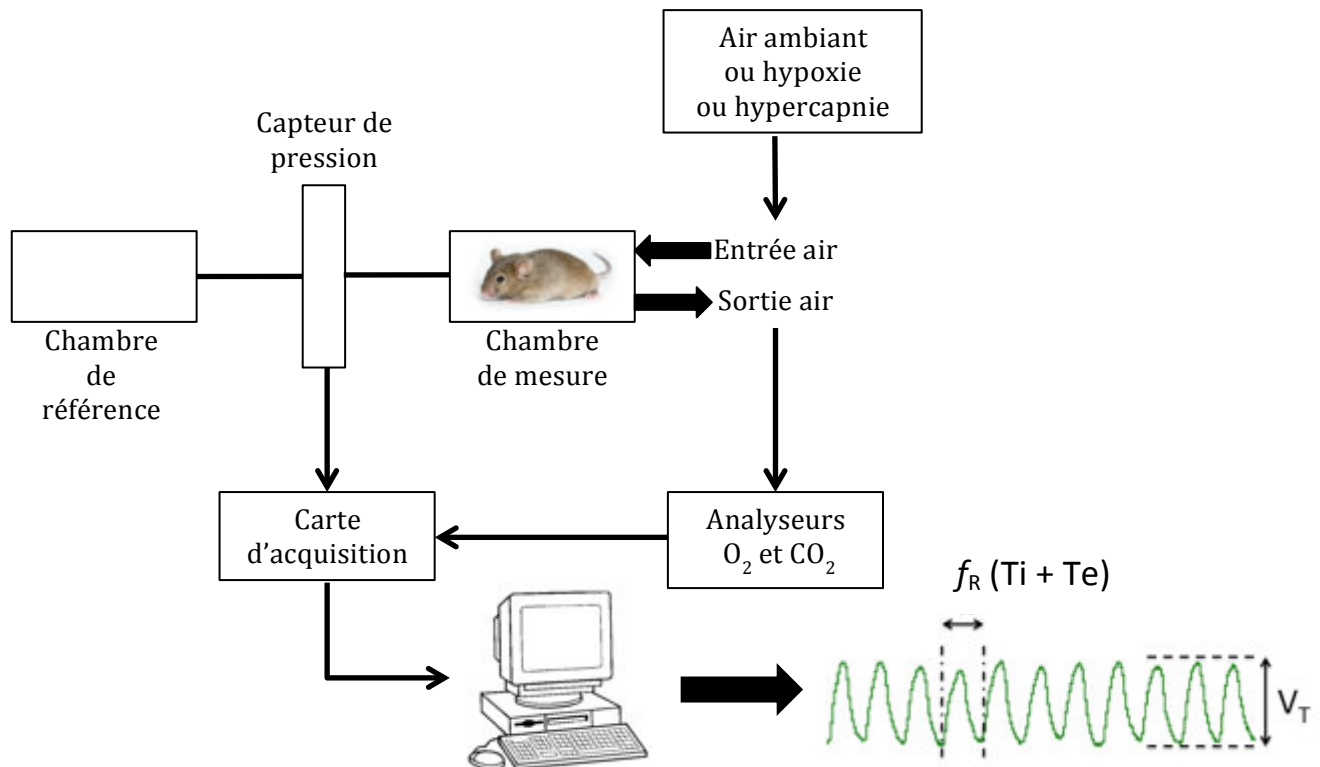


Figure 18 : Montage et exemple de tracé obtenu en pléthysmographie

Afin d'éviter le stress des animaux pendant l'expérimentation, les souris sont habituées dans le pléthysmographe pendant 30 minutes la veille de chaque série d'expériences. Le jour des expérimentations, nous avons réalisé le protocole suivant pour chaque souris:

10 minutes Air ambiant – 5 minutes Hypercapnie (4% CO₂-21% O₂-75% N₂, Air liquide) – 30minutes de repos – 10minutes Air ambiant – 5minutes Hypoxie (8% O₂-92% N₂, Air liquide).

Pour les expériences sur le plateau pika réalisées à Xining, les mesures ont été réalisées dans un pléthysmographe directement dans la chambre hypobare. Avant chaque série de mesure, les animaux (rats et pikas) ont été habitués 30min dans la chambre de mesure.

Dans la première étude, les paramètres ventilatoires ont été mesurés en normoxie (PiO₂ = 86mmHg) et en hypoxie (PiO₂ = 57mmHg – 3min).

Dans la seconde étude, la réponse à l'hypoxie-hypercapnique a été mesurée en remplaçant l'air de la chambre de mesure par un mélange de gaz (16% O₂, 5% CO₂, 79% N₂) pendant 5min. Les mesures des paramètres ventilatoires étaient réalisées après 2min et 5min d'exposition au mélange gazeux.

III. Calorimétrie indirecte

Lorsque l'organisme est mis en situation d'hypoxie ou d'hypercapnie, cela entraîne des modifications du métabolisme, ce qui se traduit par des variations dans la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) et la production de CO₂ ($\dot{V}CO_2$) (Frappell, 1992; Mortola, 1989). La méthode de mesure du métabolisme énergétique la plus utilisée est la calorimétrie indirecte. Ce terme signifie que l'énergie consommée par les processus métaboliques peut être mesurée, de façon indirecte, à partir des échanges gazeux : consommation d'oxygène et production de gaz carbonique. En ajoutant des analyseurs de gaz (O₂ et CO₂; FC-10 and CA-10 analysers, Sable system, Las Vegas, USA) à la chambre de pléthysmographie il est possible d'évaluer en temps réel les variables métaboliques (consommation d'O₂, $\dot{V}O_2$ - ml/min/kg et production de CO₂, $\dot{V}CO_2$ - ml/min/kg) des animaux. L'évaluation de ces variables est essentielle pour déterminer si les modifications ventilatoires observées entre le groupe test et le groupe témoins sont dues à des régulations au niveau du réseau neuronal respiratoire uniquement ou reflète également une altération des paramètres métaboliques du fait d'une hypo ou d'une hyperactivité métabolique.

Les mesures de calorimétrie ont été effectuées en parallèle de la pléthysmographie pour chaque condition (normocapnie, hypoxie et hypercapnie). Le débit d'air dans le pléthysmographe est

maintenu à 0.5 l/min et l'air est préalablement séché avant d'atteindre les analyseurs. $\dot{V}O_2$ et $\dot{V}CO_2$ ont ensuite été calculés en utilisant les formules suivantes (Marcouiller, 2014) :

$$\dot{V}O_2 = Flux \times \frac{[(F_iO_2 - F_eO_2) - F_eO_2 \times (F_eCO_2 - F_iCO_2)]}{(1 - F_eO_2)}$$

et

$$\dot{V}CO_2 = Flux \times \frac{[(F_eCO_2 - F_iCO_2) - F_eCO_2 \times (F_iO_2 - F_eO_2)]}{(1 - F_eCO_2)}$$

Le calcul de ces deux paramètres a permis par la suite de calculer les équivalents ventilatoires en O_2 et en CO_2 ($\dot{V}E/\dot{V}O_2$ et $\dot{V}E/VCO_2$), qui permettent d'obtenir la quantité d'air inspirée en fonction de la quantité d' O_2 consommée ($\dot{V}O_2$) ou de la quantité de CO_2 produite ($\dot{V}CO_2$), et le quotient respiratoire ($QR = \dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$), qui permet d'avoir des informations sur la nature des substrats oxydés. Quand le QR se trouve à environ 0.7, les lipides sont privilégiés comme substrat, alors que lorsque le QR tend vers 1, se sont les glucides qui sont principalement utilisés comme substrat.

Remarque : Afin d'étudier les effets des différentes stimulations sur les variables ventilatoires et métaboliques, nous avons calculer les deltas (D) pour chaque variable selon la manière suivante : D = Valeur à 4% CO_2 (ou 8% O_2 pour hypoxie) – Valeur à 0% CO_2 (ou 21% O_2 pour hypoxie).

IV. Immunohistochimie c-Fos

Afin d'identifier les structures en relation avec la réponse ventilatoire observée en pléthysmographie, nous avons utilisé une immunohistochimie basée sur la détection de la protéine c-FOS. *C-fos* est un proto-oncogène exprimé dans les cellules ayant été activées par divers stimuli. L'utilisation de cette technique comme marqueur d'activité neuronale a été récemment décrite dans un article de méthodologie publié dans JOVE (Annexe 2).

A. Perfusion des animaux et obtention des coupes

Des souris WT et Epo-TAg^h, mâles et femelles sont dans un premier temps exposé à un mélange hypercapnique (4% CO_2 – 2H) à la suite de quoi ils sont immédiatement anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital (100 mg/kg). La chirurgie est ensuite effectuée : la peau puis les muscles de l'animal sont incisés au niveau médial du thorax. Le diaphragme est ensuite ouvert et la cage thoracique découpée latéralement afin d'être retournée pour rendre le cœur

visible. Une aiguille est ensuite insérée dans le ventricule gauche du cœur. L'oreillette droite est ensuite incisée pour évacuer le liquide perfusé et la pompe est enclenchée pour démarrer la perfusion, qui se fait dans la circulation systémique de l'animal. Après rinçage avec du NaCl 0.9%, les tissus (dont l'encéphale) sont fixés par du PFA 4% pendant 10min. Le cerveau de l'animal est prélevé (Gage, 2012) et post-fixé dans du PFA 4% pendant 48h. Il est ensuite transféré dans une solution de cryoconservation contenant du sucre puis stockés à -20°C. Des coupes de 40µm sont réalisées au cryostat, puis la moitié des coupes est conservée dans du PBS 0.1M pour réaliser la suite du protocole d'immunohistochimie tandis que l'autre moitié est conservée dans une solution de cryoconservation pour être utilisée à plus long terme.

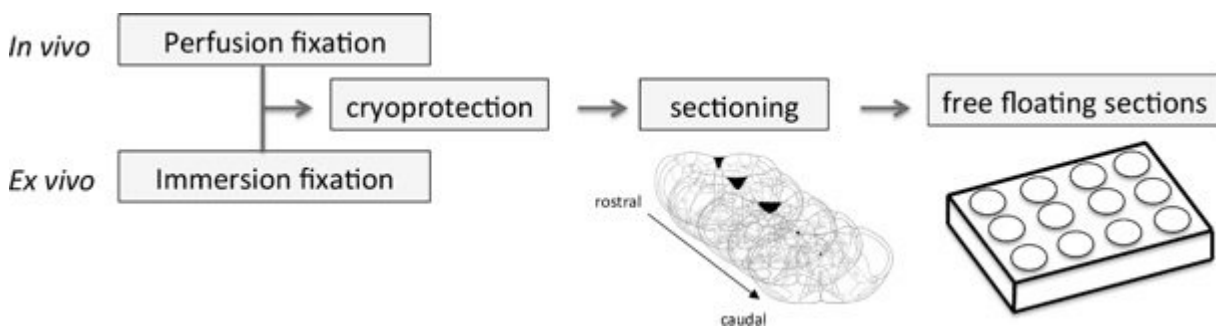


Figure 19 : Protocole d'obtention de coupes de bulbe rachidien. (Annexe 2)

B. Immunohistochimie et montage

L'immunohistochimie a été réalisée en suivant le protocole décrit en annexe (Annexe 2). Brièvement, après plusieurs lavages, les coupes sont incubées avec du sérum de chèvre (espèce chez qui est fait l'anticorps secondaire) pendant 1h puis incubées pendant 48h avec l'anticorps primaire polyclonal dirigé contre la partie N-Terminale de protéine c-FOS et produit chez le lapin (1/2000, sc-52, Santa Cruz Biotechnology INC, Santa Cruz, CA, USA). Le 3^{ème} jour, les coupes sont rincées afin d'éliminer l'anticorps primaire puis incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire anti-Ig de lapin et produit chez la chèvre (Vector laboratories, Vectastain Elite, ABC kit). Après plusieurs rinçages, la révélation se fait via l'utilisation d'un kit spécifique (VECTOR NovaRED Substrate Kit, SK-4800, Vector Laboratories). A la fin du protocole, les coupes sont étalées sur lame selon un ordre caudo-rostral. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre, déshydratées (2x30 secondes - Ethanol 100%) puis éclaircies (2x3 minutes - Xylène) et montées (DPX, Merck Chemicals).

C. Analyse de l'expression de *c-fos*

En utilisant un atlas stéréotaxique comme référence (Paxinos & Franklin, 2004), le comptage des cellules marquées a été réalisé dans les structures suivantes : le NTS (sous-divisions commissural, médiale et ventrolatérale), le PP/PO (groupe parapyramidal/ para-olivaires), la VLM (sous-divisions caudale et rostrale), le RTN/pFRG et les raphés (Obscurus, Pallidus et Magnus). Ces structures ont été choisies car elles sont impliquées dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie (Cf. Introduction-II-A-1-a). Les structures d'intérêt ont été identifiées en utilisant d'autres structures connues et présentes à proximité, par exemple le noyau facial (N7) pour le RTN/pFRG (Figure 20). Les structures médiales (RPa, ROb, NTSc) ont été comptées en entier, tandis que les structures bilatérales (RTN/pFRG, NTSm et vl, PP/PO, RMg) n'ont été comptées que d'un seul côté. Les résultats de comptage ont été exprimés en nombre moyen de neurones pas coupe.

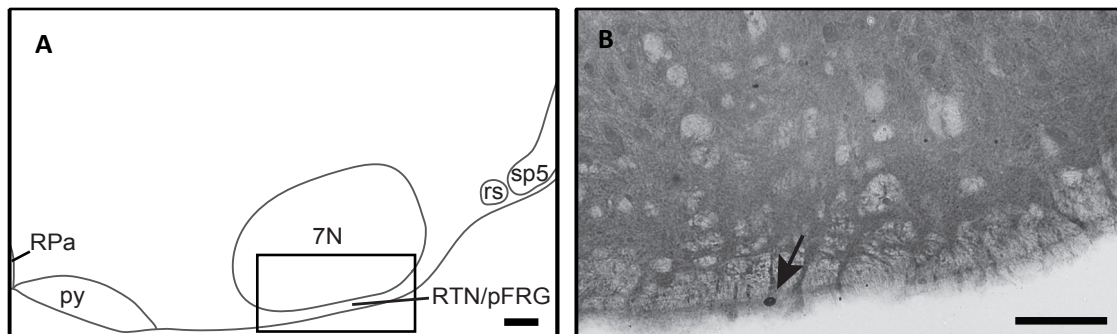


Figure 20 : Illustration (A) d'une zone du bulbe rachidien où le comptage a été effectué et photographie (B) montrant une cellule marquée (flèche). Abbréviations : 7N, Noyau facial ; RPa, raphé pallidus ; py, faisceau parapyramidal ; RTN/pFRG, noyau retrotrapezoïde/groupe respiratoire parafacial ; rs, faisceau rubrospinal ; sp5, faisceau spinal trigeminal. Echelle = 100 μ m

V. Méthodes d'étude de l'influence des chémorécepteurs périphériques et centraux sur les réponses ventilatoires

A. Chémodénervation

La chémodénervation est un acte chirurgical qui consiste à sectionner le nerf sinusal carotidien de manière bilatérale afin de bloquer la transmission des informations depuis les corps carotidiens vers le système nerveux central, et ainsi déterminer le rôle des chémorécepteurs périphériques dans les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Soliz, 2005 ; Roux, 2000). Les animaux sont préalablement anesthésiés en utilisant un mélange kétamine/xylazine (40mg/kg et 6mg/kg dans du NaCl), puis placés sur le dos. La chirurgie est ensuite réalisée sous loupe binoculaire : une incision est réalisée au niveau du cou et la zone est maintenue ouverte par des écarteurs. Les muscles sont ensuite écartés avec soin (à droite et à gauche de la trachée) jusqu'à visualiser la

bifurcation carotidienne. La zone entre la bifurcation carotidienne et le nerf glossopharyngien est ensuite dilacérée délicatement afin de visualiser et de sectionner le nerf sinusal carotidien. Cette même procédure est répétée de l'autre côté de l'animal. La plaie est ensuite refermée et désinfectée. En plus des ces animaux chémodénervés, nous avons opéré des animaux contrôle (Sham) pour lesquels nous avons uniquement écarté les muscles pour voir la bifurcation puis suturé la plaie. Le suivi post-chirurgie des animaux a été effectué pendant 7 jours (nettoyage de la plaie et traitement de la douleur) en utilisant un anesthésiant local (Xylocaïne 2%, AstraZeneca) ainsi qu'un antalgique (Doliprane enfant par voie orale, Paracétamol 2,4%, 200µl/jour). La série de mesures des paramètres ventilatoires décrites précédemment (II) est réalisée après 7 jours post-chirurgie. Les mesures sont réalisées en hypoxie et en hypercapnie, l'hypoxie nous servant de contrôle de réussite de la chirurgie chez les animaux WT car les animaux chémodénervés perdent leur capacité de réponse à l'hypoxie (Roux, 2000).

B. Etude *ex vivo* : préparation « en bloc »

Les préparations de système nerveux central isolés de rongeurs nouveau-nés, dites préparations en bloc, génèrent une activité rythmique classiquement assimilée à la commande centrale respiratoire (Suzue, 1984). Un des avantages de ce type de préparation est qu'elles sont complètement dé-afférentées. Les afférences périphériques et supra-bulbaires sont absentes, faisant de ces préparations *ex vivo* un modèle de choix pour l'étude des mécanismes centraux impliqués dans l'adaptation respiratoire à l'hypoxie à l'hypercapnie ou encore préciser le rôle centrale de l'Epo. Ces expériences ont été réalisées au sein du laboratoire INSERM UMR_S1158, avec l'aide de l'équipe du Pr. Laurence Bodineau. La microchirurgie est réalisée sur des souriceaux (âgés de 1 à 3 jours) afin d'isoler le système nerveux central (bulbe rachidien et moelle épinière). Elle se fait dans une boîte de pétri possédant un fond recouvert de sylgard afin de pouvoir y fixer le souriceau dans un liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa, 130.0mM NaCl, 5.4mM KCl, 0.8mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 26.0mM NaHCO₃, 30.0mM D-glucose) refroidi à 4°C et oxygéné en continu (LCRa 95% O₂ – 5% CO₂, pH 7,4). Après avoir isolé le bulbe rachidien (avec les premiers segments de la moelle épinière) ce dernier est placé dans une chambre d'enregistrement qui est perfusée par du LCRa oxygéné à un débit de 7,5ml/min et maintenue à 26°C. Le bulbe rachidien est alors fixé à l'aide de minuties (fines aiguilles) face ventrale vers le haut. L'enregistrement des racines cervicales ventrales C4 (voie de sortie des motoneurones phréniques innervant le diaphragme) permet donc d'obtenir une activité rythmique motrice assimilée à la commande centrale respiratoire (inspiration fictive). La racine est repérée sous loupe binoculaire et une électrode de succion est placée à proximité. Une légère dépression à l'aide

d'une seringue permet d'aspirer la racine qui rentre dans l'électrode avec du LCRa ce qui assurera la continuité électrique avec l'étage d'enregistrement. Le signal obtenu est ensuite filtré (10 Hz – 5kHz), amplifié (gain = 10 000), intégré et digitalisé par une carte d'acquisition (CED, Cambridge). L'analyse a été réalisée via le logiciel Spike 2 (CED) sur le tracé d'intégration, obtenu à partir du tracé brut d'enregistrement de la racine C4. La fréquence des bouffées a été analysée dans chaque condition (normocapnie et acidose) ainsi que les variations de l'amplitude des bouffées, exprimées en pourcentage de la valeur basale (Figure 21).

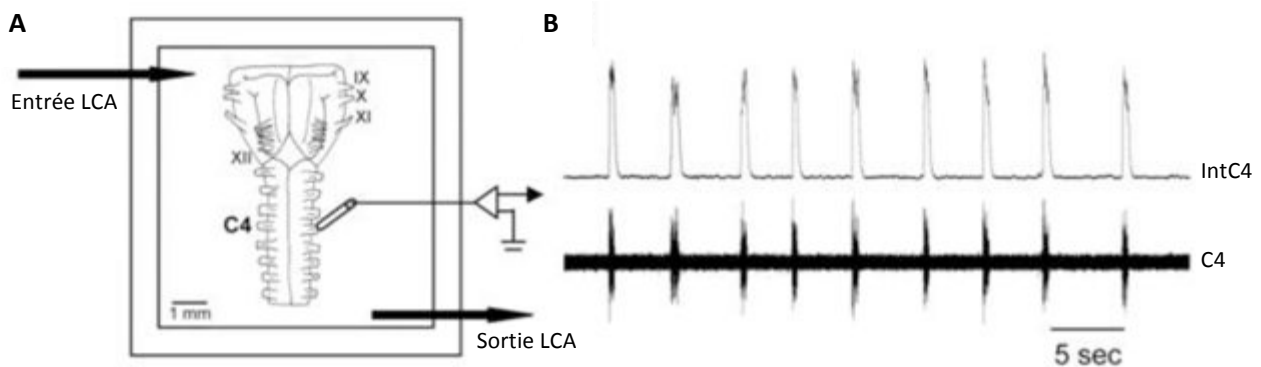


Figure 21 : Enregistrement de bulbe rachidien ex vivo. A, Illustration de l'installation de la préparation dans la cuve d'enregistrement ; B, Exemples d'enregistrements en normoxie (Rousseau, 2015).

Cette série expérimentale a été réalisée sur nos souris WT et Epo-TAg^h, pour lesquels les préparations ont été soumises à une acidose métabolique (Figure 22). La solution de LCRa utilisée pour la stimulation en acidose métabolique a été obtenue par modification de la concentration du tampon bicarbonate (de 21mM à 10mM de NaHCO₃).

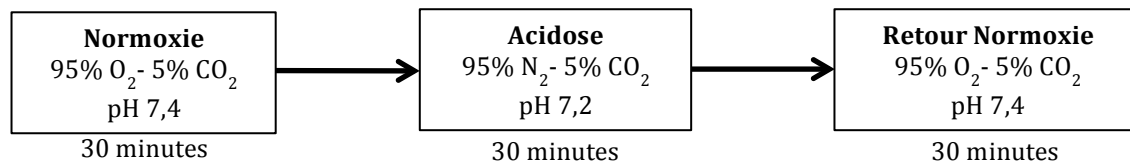


Figure 22 : Protocol suivi lors des expériences de stimulations sur préparations « en bloc ».

C. Etude *in vivo* : enregistrement de l'activité du nerf sinusal

Cette série d'expériences a été menée au sein du laboratoire du Professeur Rodrigo Iturriaga à l'université de Santiago au Chili, avec l'aide du professeur Rodrigo Del Rio. L'utilisation de cette méthode avait pour but de déterminer le rôle de l'Epo sur l'activité des corps carotidiens dans la chémosensibilité à l'O₂ et au CO₂ (Figure 23C).

Les expériences ont été réalisées sur des rats, Sprague-Dawley, mâles et femelles, selon le protocole suivant (Del Rio, 2010) : après avoir été anesthésié par une injection de Pentobarbital (60 mg/kg), l'animal est placé sur le dos sur une plaque chauffante afin de maintenir la température corporelle à $\pm 38^{\circ}\text{C}$. D'un côté, le nerf sinusal est repéré, nettoyé et placé sur une électrode bipolaire en platine puis l'ensemble est recouvert d'huile minérale, afin de permettre la continuité du signal électrique avec l'étage d'enregistrement (Figure 23A). Le signal obtenu au niveau des électrodes est pré-amplifié (Grass P511; Astro-Med Inc., West Warwick, RI, USA), filtré (30-500 Hz) puis traité par un logiciel spécifique (LabChart Pro, ADInstruments) permettant de séparer l'amplitude des potentiels d'action du bruit de fond. Le tracé obtenu représente alors la fréquence de décharge du nerf sinusal carotidien (Figure 23B). Pour permettre un enregistrement optimal, le nerf sinusal du côté opposé est sectionné afin de supprimer les effets vasculaires et ventilatoires entraînés par l'activation des chémoreflexes. Pendant toute la durée de l'expérience, la respiration de l'animal est contrôlée visuellement.

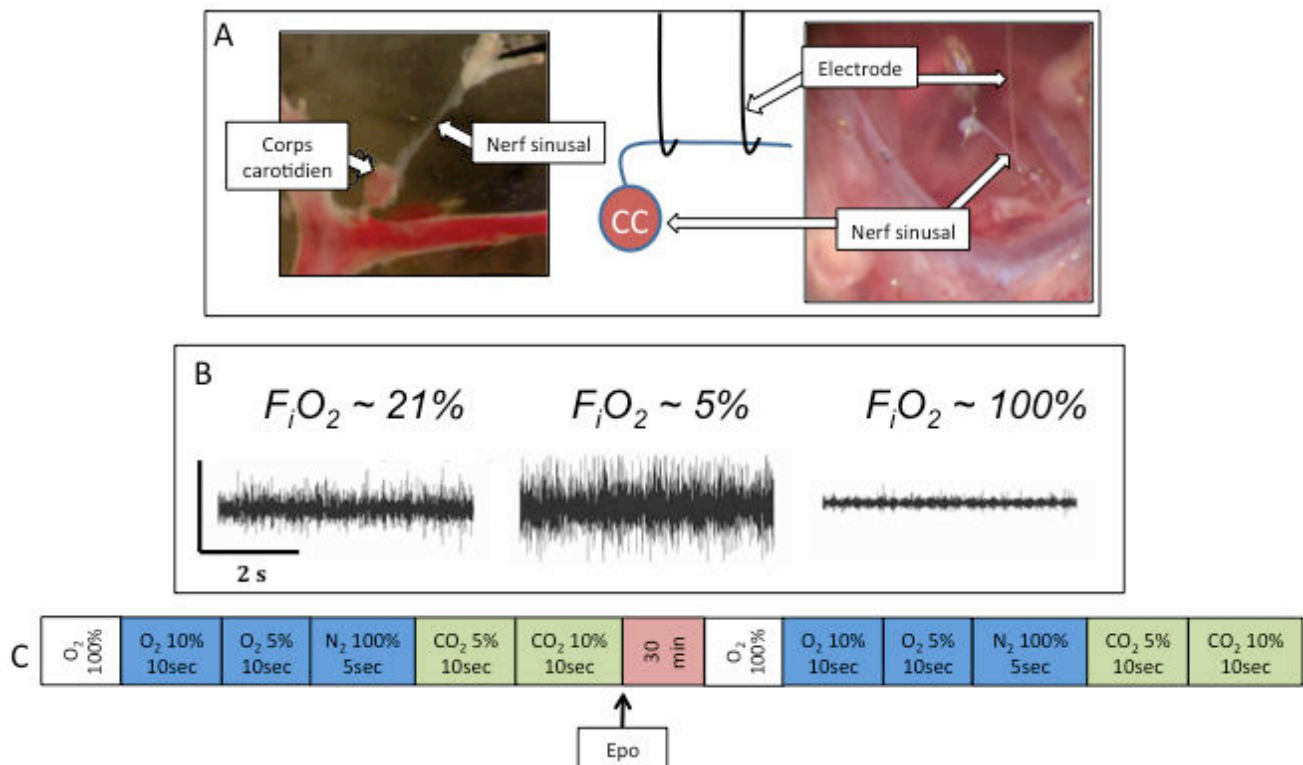


Figure 23 : Enregistrement de corps carotidiens *in vivo*. A, Illustrations du montage ; B, Exemple d'enregistrements avec stimulus hypoxique (Del rio, 2010) ; C, Protocole suivi pour nos expériences.

VI. Influence des hormones sexuelles femelles sur les réponses ventilatoires

A. Réponses ventilatoires et cycle oestral

L'objectif était de mettre en évidence une influence des différentes phases du cycle menstruel de la souris sur les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie, associée à la déficience en Epo. Pour cela, nous avons entrepris une série expérimentale en réalisant des enregistrements de pléthysmographie et de calorimétrie pour mesurer HVR et HcVR, sur des souris femelles WT et Epo-TAg^h, pendant les différentes phases de leur cycle menstruel.

Chez la souris, le cycle menstruel (ou cycle oestral) correspond aux différentes phases qui se succèdent entre deux ovulations. Ce cycle dure entre 4 et 6 jours chez le rongeur (Evans & Long, 1922; Freeman, 1988) et se compose de 4 phases qui sont facilement identifiables visuellement au niveau des parties génitales externes (Figure 24) ou par frottis de cellules vaginales.

Les quatre phases du cycle oestral sont :

- **Proestrus** (Figure 24A) : phase qui précède l'ovulation et qui correspond à la croissance folliculaire terminale.
- **Oestrus** (Figure 24B) : ovulation (Schwartz, 1964; Young, 1941). C'est au niveau de cette phase que se produit le pic de progestérone.
- **Metoestrus** (Figure 24C) : phase qui correspond à la formation du corps jaune.
- **Dioestrus** (Figure 24D) : présence du corps jaune.

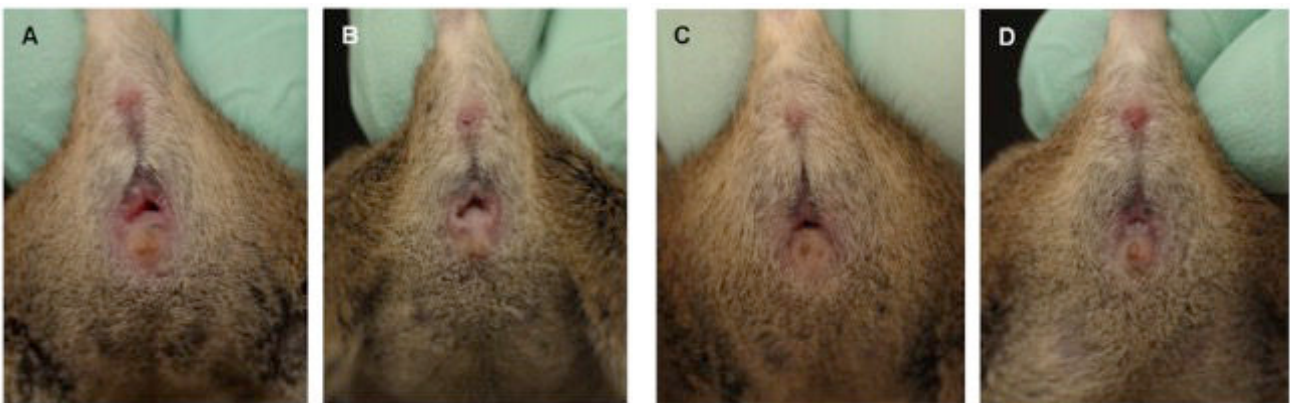


Figure 24 : Identification visuelle des différentes phases du cycle oestral chez la souris de souche agouti. A, Proestrus ; B, Oestrus ; C, Metoestrus ; D, Dioestrus (Byers, Wiles, Dunn, & Taft, 2012)

Le cycle oestral peut être divisé en deux phases : une phase folliculaire, qui s'étend de la fin de la croissance folliculaire à la fin de l'ovulation (phases proestrus et oestrus) et une phase lutéale, qui débute après l'ovulation et se termine par la régression du corps jaune (phases metoestrus et dioestrus). Ce sont ces deux phases que nous avons distinguées et étudiées dans nos expériences.

B. Réponses ventilatoires et progestérone

Afin d'étudier le rôle de la progestérone dans les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie, nous avons utilisé un antagoniste des récepteurs à la progestérone, la Mifepristone (RU486). Cette molécule est un analogue structural de la progestérone et exerce donc une action compétitive au niveau des récepteurs à la progestérone. Cette dernière a été diluée dans de l'éthanol 100% puis re-diluée dans de l'huile de maïs (Ethanol 5% final) afin d'être administrée aux souris à une dose de 40µg/Kg/jour (Fournier, 2012; Joseph, 2012). Cette dose (environ 200µl) est administrée à nos souris femelles (WT et Epo-TAg^h) tous les matins pendant 12 jours par gavage (Fournier, 2012). Les mesures des variables ventilatoires sont ensuite réalisées par pléthysmographie selon le protocole déjà décrits (II).

VII. Outils pharmacologiques

A. Injections d'Epo

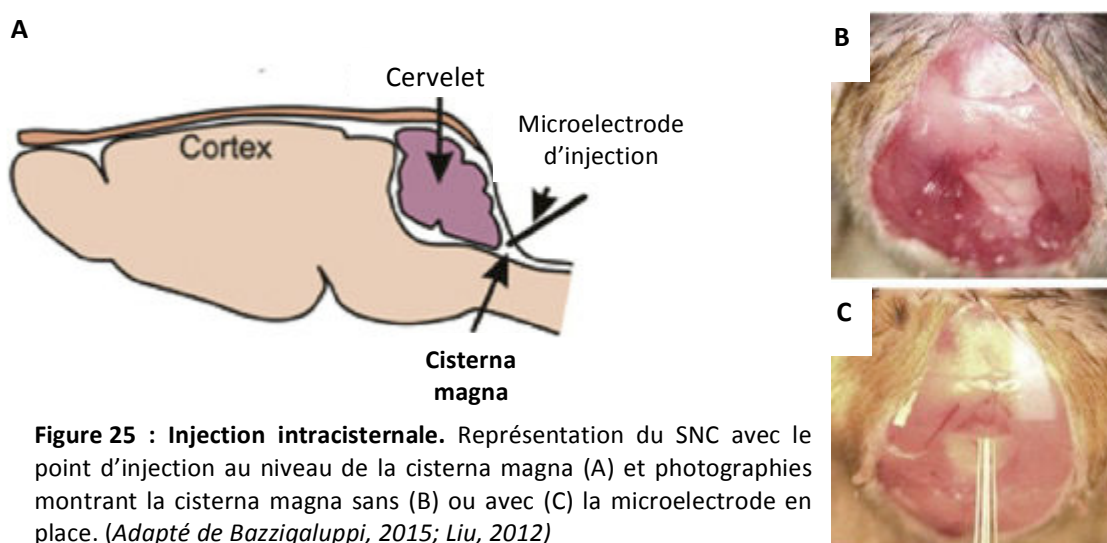
Afin d'étudier les effets périphériques et centraux de l'Epo, deux types d'injections ont été réalisées : une injection intraveineuse (IV) et une injection intracisternale (IC). Les expériences d'injection d'Epo ont été réalisées en utilisant de l'Epo recombinante humaine (Epoïetin α , Eprex, Janssen & Janssen), sur des animaux WT et Epo-TAg^h mâles et femelles.

1. Injection intraveineuse

Ce type d'injection permet d'étudier les effets périphériques de l'Epo, car cette molécule ne passe que très difficilement la barrière hémato-encéphalique, et ce après un temps très long (Xenocostas, 2005; Lieutaud, 2008; Zhang, 2010). Elle est réalisée dans une des deux veines de la queue. Les souris ont été préalablement placées dans un système de contention ne laissant dépasser que la queue. Cette dernière est ensuite plongée dans de l'eau chaude afin de dilater les vaisseaux. L'Epo (ou le NaCl pour le véhicule) est ensuite injecté à 2000UI/Kg (dilué dans du NaCl). Cette dose a été choisie suite à l'utilisation de Rhu-Epo par d'autres équipes (Demiot, 2011; Kaynar, 2012). La série de mesures décrites précédemment (II-3) a été initié après 10 minutes post-injection.

2. Injection intracisternale

Ce type d'injection permet d'administrer l'Epo directement dans le liquide céphalorachidien (LCR) et donc d'étudier les effets de l'Epo au niveau du système nerveux central. Les animaux sont préalablement anesthésiés en utilisant un mélange kétamine/xylazine (40mg/kg et 6mg/kg dans du NaCl). Une fois l'animal endormi, celui-ci est placé dans un cadre stéréotaxique. La chirurgie est alors réalisée sous loupe binoculaire. Une incision est faite au niveau du crâne puis les muscles sont écartés jusqu'à apercevoir la *cisterna magna*. Cette structure est située à la base du crâne, avant la première vertèbre cervicale (Figure 25). La dure-mère est alors doucement percée par une microélectrode (capillaire de 1.5mm de diamètre étiré) qui est laissée en place pendant 2-3min afin de laisser le temps à la dure-mère de se repositionner autour de l'électrode. L'Epo est ensuite injecté lentement à 1000UI/Kg (dilué dans du NaCl). Nous avons choisi cette dose en l'adaptant par rapport à la dose utilisée en IV, et afin de faire en sorte que les volumes injectés aux animaux ne dépassent pas 6 μ l. A la fin de l'injection, l'électrode est laissée 10min dans la citerne avant d'être retirée afin de laisser l'Epo diffuser dans le LCR et ainsi éviter qu'il ne ressorte lors de la sortie de l'électrode. La souris est ensuite retirée du cadre puis la plaie est suturée et désinfectée. Le suivi post-chirurgie de l'animal a été effectué en utilisant un anesthésiant local (Xylocaïne 2%, AstraZeneca). Dans cette expérience, la chirurgie n'a jamais excédé 20min. La série de mesures de la ventilation décrite précédemment (Cf. Matériels et méthodes - II) a été initiée après 6 heures post-injection, afin de limiter les effets résiduels de l'anesthésie tout en conservant les potentiels effets de l'Epo (Chen, 2013), cette dernière ayant un temps de demi-vie d'environ 6h (Données Janssen laboratories).



B. Etude de l'implication de la voie du glutamate, du NO et de la sérotonine dans la RVH chez le plateau Pika et la souris

Afin d'étudier l'implication de différents neurotransmetteurs dans la RVH chez le plateau pika et la souris, différentes drogues ont été injectées par voie intra-péritonéale :

- **Mémantine** : Antagoniste des récepteurs NMDA. L'administration par injection (IV ou IP) de cette drogue lui confère un temps de demi-vie de 2.3 heures environ (Hassan, 2012; Lee, 2016). La mémantine est une drogue active du SNC et peut donc traverser la BHE (Mehta, Short, & Nicolazzo, 2013). La mémantine a été injectée à une dose de 10mg/kg et les mesures ont été faites 30min après l'injection. L'utilisation de la mémantine et non du MK-801 (voir ci-dessous) chez le Pika vient du fait que la mémantine entraînait moins d'effets secondaires.
- **MK-801** : Antagoniste des récepteurs NMDA. Cette drogue a un temps de demi-vie d'environ 2h (Reid & Powell, 2005) et a la capacité de passer la BHE très rapidement, pour une faible dose injectée (Vezzani, 1989). Le MK-801 a été injecté à une dose de 3mg/kg et les mesures ont été faites 1h après l'injection.
- **DNQX** : Antagoniste des récepteurs AMPA et kainate. Le temps de demi-vie a été évalué à environ 2h (Smeraski, 1998). Le DNQX a été injecté à une dose de 10mg/kg et les mesures ont été faites 30min après l'injection.
- **L-NAME** : Inhibiteur de la NO synthase. En injection IV, le temps de demi-vie de cette drogue a été évalué à 64min dans le sang (Krejcy, 1993). Il a été mis en évidence une capacité du L-NAME à traverser la BHE pour une dose de 10mg/kg (Wagner, 1997). Le L-NAME a été injecté à une dose de 10mg/kg et les mesures ont été faites 30min après l'injection.
- **Fluoxetine** : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine. Cette molécule a un temps de demi-vie long, environ 4 jours et peut traverser la BHE (Gury & Cousin, 1999; données pharmacologiques Prozac®). La fluoxetine a été injectée à une dose de 10mg/kg et les mesures ont été faites 30min après l'injection.
- **SMTC** : Inhibiteur de nNOS. L'injection en IV ou IP de cette drogue lui confère un temps de demi-vie d'environ 40min. Cette molécule est capable de franchir la BHE (Wakefield, 2003). Cette drogue a été injectée à 10mg/kg et les mesures ont été réalisées à 30min post-injection, protocole déjà réalisé par d'autres équipes (El Hasnaoui Saadani, 2007 ; Gozal, 1996 ; Pichon, 2009).

VIII. Analyses statistiques

A. Statistiques études mâles (Article 4)

Toutes les valeurs de nos études sont présentées sous la forme moyenne \pm écart type (SD). Les analyses statistiques ont été réalisées *via* le logiciel Statistica (Stat Soft, Tulsa, USA). Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0.05$.

Le test de Kolmogorov-Smirnov nous a permis de confirmer la normalité de la distribution. Les effets de l'hypercapnie (CO_2 4% vs 0%) sur les variables ventilatoires et métaboliques chez les WT et les Epo-TAg^h ont été évalués avant et après injection d'Epo (IV ou IC). L'analyse a été réalisée en utilisant une analyse de variance multivariée (MANOVA) associée aux ajustements de Greenhouse et Geisser. Une MANOVA sur les valeurs brutes a été réalisée avec la souche (WT/Epo-TAg^h), les injections d'Epo ou de NaCl (IV ou IC) et la normocapnie ou l'hypercapnie comme facteurs puis différentes ANOVA séparées ont été réalisées pour les facteurs injection d'Epo vs véhicule (IV ou IC) et normocapnie vs hypercapnie. Pour l'IV, l'Epo a été utilisé comme facteur dépendant car chaque animal a reçu les deux traitements (mesures répétées) alors que pour l'injection IC, l'Epo a été utilisé comme facteur indépendant car un animal n'a reçu qu'un seul traitement (Epo ou véhicule). Les tests post-hoc de Newman-Keuls ont été utilisés pour évaluer les différences spécifiques entre les différents groupes.

Les mêmes analyses statistiques ont été réalisées pour les deltas (D) ainsi que pour les comptages immunohistochimiques.

B. Statistiques étude femelles

Toutes les valeurs de nos études sont présentées sous la forme moyenne \pm écart type (SD). Les analyses statistiques ont été réalisées *via* le logiciel Graphpad-Prism (Graph Pad software, La Jolla, CA, USA). Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

Le test de D'Agostino-Pearson nous a permis de confirmer la normalité de la distribution. Une Anova à deux voies suivie du test de comparaisons multiples Turkey a été utilisé afin d'évaluer les effets du traitement par le Mifepristone sur les variables ventilatoires en conditions basales. Une Anova à une

voie suivie du test de comparaisons multiples Turkey a été utilisé pour déterminer la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les WT et les Epo-TAg^h sans distinction de la phase du cycle oestral. L'interaction entre la phase du cycle oestral (folliculaire vs lutéale), la déficience en Epo et l'environnement (Normocapnie vs Hypercapnie) ainsi que l'interaction entre la phase du cycle oestral, la déficience en Epo et le traitement (Vehicle vs Mifepristone) pendant la RVHc a été étudiée en utilisant une Anova à trois voies suivie du test de comparaisons multiples Turkey.

Les mêmes analyses statistiques ont été réalisées pour les deltas (D) ainsi que pour les comptages immunohistochimiques.

RESULTATS

Les séries expérimentales menées dans le cadre de ma thèse avaient pour but de mettre en évidence l'implication de différents facteurs sur les régulations ventilatoires suite à une stimulation hypoxique ou hypercapnique. Nous avons notamment étudié dans une première partie l'implication de différents neurotransmetteurs, tels que le NO (Article 1, 2, 3), le glutamate (Article 2) et de la sérotonine (Article 2), dans la RVH et l'adaptation à l'hypoxie chronique pour différents modèles animaux adaptés ou non à l'altitude. Puis nous avons cherché à mettre en évidence un effet de l'Epo sur cette réponse ventilatoire, via des approches *in vivo* d'enregistrement de l'activité des chémorécepteurs périphériques.

Suite à cette première partie, nous avons cherché à mettre en évidence les effets d'une déficience en Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Afin de mener à bien cette étude, nous avons mis en place différentes approches visant à caractériser les effets périphériques et centraux de l'Epo dans la mise en place de la réponse une approche visant à mesurer la ventilation avant et après injection d'Epo au niveau central (IC) ou périphérique (IV) afin de différencier l'effet central et périphérique de l'Epo. Une approche visant à évaluer l'activité neuronale par immunohistochimie au sein de structures connues pour leur rôle dans la régulation de la ventilation a également été utilisée. Les observations faites sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie ont apporté une nouvelle problématique à notre étude, à savoir l'implication des hormones sexuelles dans la RVHc, ce qui a conduit à une dernière série expérimentale de mesures ventilatoires en fonction du cycle ovarien associées à un traitement par un antagoniste de la progestérone.

I. Neurotransmetteurs, érythropoïétine et réponse à l'hypoxie

A. Rôle catalyseur de l'Epo sur la voie centrale du NO dans la RVH

Article 1 :

Nicolas Voituron*, **Florine Jeton***, Yannick Cholley, Raja El Hasnaoui-Saadani, Dominique Marchant, Patricia Quidu, Fabrice Favret, Jean-Paul Richalet, Aurélien Pichon. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep.* 2014 Feb 14;2(2):e00223.

* *co premier auteurs*

La voie de signalisation récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA)/ Nitrique oxyde synthase neuronale (voie centrale du NO) est impliquée dans la mise en place de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Hasnaoui-Saadani, 2007; Gozal, 2000; Ogawa, 1995). L'objectif de notre étude était de déterminer les effets possibles d'une déficience en érythropoïétine et d'une exposition chronique à l'hypoxie sur cette voie de signalisation, et ce pendant la réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë.

Des souris mâles, WT et Epo-TAg^h, ont été hébergés en condition de normoxie (groupe Nx) ou d'hypoxie hypobarique (groupe cHx ; Pb = 435mmHg, altitude simulée de 4460m) pendant 14 jours. Les paramètres ventilatoires ont ensuite été mesurés sur les 2 groupes en normoxie (21% O₂) ou en hypoxie aiguë (8% O₂, 5 min) après une injection de NaCl (contrôle), de SMTC (inhibiteur du nNOS) ou de MK-801 (antagoniste du récepteur NMDA). La production d'oxyde nitrique et l'expression du récepteur NMDA et du nNOS au niveau du bulbe rachidien ont été quantifiées par RT-PCR en temps réel et Western Blot.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- Les souris Epo-TAg^h mâles présentaient des **paramètres ventilatoires normaux en normoxie**
- **L'expression du récepteur NMDA et du nNOS était plus élevée** chez les Epo-TAg^h

- La déficience en Epo entraînait une **perte d'acclimatation à l'hypoxie** et une **absence de réponse significative à l'hypoxie aigue**
- **La VAH** était abolie chez les WT après inhibition du nNOS
- **L'HVR** était abolie après injection de MK-801 chez les WT

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence une **implication de l'Epo dans les adaptations ventilatoires à l'hypoxie**. Un taux d'Epo adéquat semble indispensable à la mise en place des mécanismes des réponses ventilatoires à l'hypoxie, ce qui est en lien avec une étude précédente (Soliz, 2005) dans laquelle il a été démontré que l'Epo modulait la RVH en agissant sur les corps carotidiens. De plus, nous avons confirmé l'implication de la voie du NO et du NMDA dans la réponse et l'adaptation à l'hypoxie avec la mise en évidence d'un **rôle catalyseur de l'Epo** sur cette voie de signalisation. Les différences observées au niveau de la VAH et de la RVH entre les souris WT et les souris Epo-TAg^h suggèrent l'apparition d'autres mécanismes chez ces souris afin de combler la déficience en Epo. Malgré l'absence de VAH et RVH chez les souris Epo-TAg^h, l'augmentation de la RVH après hypoxie chronique suggère l'implication du nNOS et du NOx. Durant cette étude, des différences ont été mises en évidence par rapport aux observations faites par Macarlupu (2006b) et seront abordées dans la discussion.

ORIGINAL RESEARCH

Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia

Nicolas Voituron^{1,2,*}, Florine Jeton^{1,2,*}, Yannick Cholley¹, Raja El Hasnaoui-Saadani¹, Dominique Marchant¹, Patricia Quidu¹, Fabrice Favret¹, Jean-Paul Richalet^{1,2} & Aurélien Pichon^{1,2}

1 Laboratoire "Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie", Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, EA 2363, 93017, Bobigny, France

2 Laboratory of Excellence (Labex) GR-Ex, PRES Sorbonne Paris Cité

Keywords

Erythropoietin, hypoxia, NMDA receptors.

Correspondence

Nicolas Voituron, Laboratoire "Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie", Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, EA 2363, 93017 Bobigny, France.
Tel: +33148387632
Fax: +33148388924
E-mail: (nicolas.voituron@univ-paris13.fr)

Present Address

Fabrice Favret, Laboratoire "Mitochondrie stress oxydant et protection musculaire", Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, EA 3072, 67085, Strasbourg, France

Funding Information

University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Labex GR-Ex and ANR MITOXY supported this study. REH-S was supported by ANR MITOXY postdoctoral fellowship FJ was supported by a Labex GR-Ex fellowship. The Labex GR-Ex (ANR-11-LABX-0051) is funded by the program "investissements d'Avenir" of the French National Research Agency (ANR-11-IDEX-0005-02). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Received: 30 October 2013; Revised: 9 January 2014; Accepted: 11 January 2014

doi: 10.1002/phy2.223

Physiol Rep, 2 (2), 2014, e00223,
doi: 10.1002/phy2.223

*Nicolas Voituron and Florine Jeton contributed equally to this work.

Abstract

The *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors – neuronal nitric oxide synthase (nNOS) pathway is involved in the ventilatory response to hypoxia. The objective was to assess the possible effect of erythropoietin deficiency and chronic exposure to hypoxia on this pathway during ventilatory response to acute hypoxia. Wild-type (WT) and erythropoietin-deficient (Epo-TAG^h) male mice were exposed (14 days) either to hypobaric hypoxia (Pb = 435 mmHg) or to normoxia. The ventilation was measured at 21% or 8% O₂ after injection of vehicle (NaCl), nNOS inhibitor (SMTC) or NMDA receptor antagonist (MK-801). Nitric oxide production and the expression of NMDA receptor and nNOS were assessed by real-time RT-PCR and Western blot analyses in the medulla. At rest, Epo-TAG^h mice displayed normal ventilatory parameters at 21% O₂ but did not respond to acute hypoxia despite a larger expression of NMDA receptors and nNOS in the medulla. Ventilatory acclimatization to hypoxia was observed in WT but was absent in Epo-TAG^h mice. nNOS inhibition blunted the hypoxic ventilatory acclimatization of WT mice without any effect in Epo-TAG^h mice. Acute hypoxic ventilatory response (HVR) was increased after chronic hypoxia in WT but remained unchanged in Epo-TAG^h mice. Ventilatory response to acute hypoxia was modified by MK-801 injection in WT and Epo-TAG^h mice. The results confirm that adequate erythropoietin level is necessary to obtain an appropriate HVR and a significant ventilatory acclimatization to hypoxia. Furthermore, erythropoietin plays a potential catalyzing role in the NMDA-NO central pathway during the ventilatory response and acclimatization to hypoxia.

Introduction

The acute hypoxic ventilatory response (HVR) is characterized by hyperventilation followed by a relative ventilatory decline (Teppema and Dahan 2010). Then, a time-dependent increase in ventilation occurs after few hours to several weeks. This ventilatory acclimatization to chronic hypoxia (VAH) is defined by an increase in resting ventilation and in the sensitivity of the respiratory control system (Olson and Dempsey 1978; Bisgard and Neubauer 1995; Prabhakar et al. 1996; Bisgard 2000; Gozal et al. 2000; Powell et al. 2000). This increase in sensitivity includes an enhanced O₂ peripheral chemosensitivity (Bisgard 2000; Powell 2007) and an increase in central responsiveness to peripheral chemoreceptors input (Powell et al. 2000). Furthermore, the initial increase in HVR contributes to VAH and its magnitude (Bisgard and Neubauer 1995; Powell et al. 1998).

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is the most important protein regulating homeostasis in hypoxia (Gassmann and Soliz 2009). Under chronic hypoxia, HIF-1 is stabilized and regulates the activation of more than 100 target genes including erythropoietin (Epo) (Yeo et al. 2004; Fandrey et al. 2006; Gassmann and Soliz 2009), the main regulator of red blood cell production, allowing the increase in O₂ carrying capacity under chronic hypoxia (Gonzalez et al. 1998; Favret et al. 2001; Robach et al. 2004). Epo is also synthesized by the central nervous system (Digicaylioglu et al. 1995). Furthermore, it was suggested that Epo receptors (Epo-R) are largely distributed in respiratory areas of the brainstem and peripheral carotid bodies (Soliz et al. 2005). While the observation of Soliz and colleagues must be used with caution due to the lack of specificity of the antibody used (Kirkeby et al. 2007), other studies showed that cells in the nervous system express both Epo and its receptor (Masuda et al. 1994; Siren et al. 2001). Therefore, Epo could act on ventilatory control under hypoxic conditions (Soliz et al. 2005) and play a key role for acclimatization to hypoxia in mice (Soliz et al. 2007). Chronic hypoxia leads to an increase in ventilation in wild-type (WT) mice, which is reduced after neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibition (El Hasnaoui-Saadani et al. 2007). Moreover, it has been proposed that activation of N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDA-R) could be involved in the early HVR (Gozal et al. 2000). When glutamate binds to NMDA-R, the intracellular calcium concentration increases, which may activate nNOS and induce a rise in nitric oxide (NO) production, then act as an excitatory neurotransmitter in HVR (Ogawa et al. 1995). Therefore, chronic hypoxia was shown to stimulate the central pathway including NMDA-R, nNOS, and NO production. In addition, Epo was shown to increase NO

production in rat hippocampus by activating voltage-gated Ca²⁺ channels, but not through NMDA receptors (Yamamoto et al. 2004).

Considering the effects of the NMDA-R-nNOS pathway on VAH in WT mice (El Hasnaoui-Saadani et al. 2007) and the possible link between Epo and NO production, we aimed to investigate the role of Epo and its interaction with the central NMDA-NO central pathway on HVR in mice exposed to either chronic normoxic (NX-exposed) or hypoxic (HX-exposed) conditions. We supposed that Epo could play a key role in VAH and HVR mechanisms by increasing ventilatory responses to hypoxia through the central NMDA-NO pathway. To test our hypothesis, we measured ventilatory parameters in normoxia and acute hypoxia after injection of vehicle, NMDA-R antagonist (MK-801) and nNOS inhibitor (SMTc) in WT and Epo-deficient (Epo-TAg^h) NX-exposed or HX-exposed mice.

Methods

Ethics statement

Experimental protocols were approved by The Ethics Committee in Animal Experiment Charles Darwin (Ce5/2011/05), done in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and conducted in accordance with French laws for animal care (authorization number: A-93-086 for NV and A-93-072 for AP).

Animals

All experiments were performed in WT ($n = 64$) and Epo-TAg^h ($n = 52$) male adult littermates (≈ 10 weeks at the beginning of the study) born from Bl6/CBA strain. The Epo-TAg^h mice present a targeted disruption in the 5' untranslated region of the Epo gene that reduces the whole-body Epo expression (Binley et al. 2002). Mean body weight and hematocrit was 25.2 ± 0.5 g and $41.2 \pm 4.4\%$ for WT and 28.0 ± 0.8 g and $20.7 \pm 2.2\%$ for Epo-TAg^h mice, respectively.

Mice were exposed to either chronic normoxic (NX-exposed) or hypoxic (HX-exposed) conditions. The HX-exposed group was housed for 14 days in a hypobaric chamber maintained at a pressure of 435 mmHg (≈ 4460 m) by a vacuum source at flow rates sufficient to prevent CO₂ buildup. The chamber was returned to sea level (760 mmHg) twice a week for 30 min to clean the cages and to renew the water and food. The NX-exposed group was kept outside of the hypobaric chamber at 760 mmHg. All animals were housed in a 12 h/12 h light/dark cycles and had ad libitum access to water and food.

Ninety-two mice were used to analyze ventilatory parameters and 24 mice were used to quantify NMDA-R protein and mRNA and nitrate-nitrite (NOx) as markers of nitric oxide (NO) production.

Ventilatory parameters

In non-anesthetized and unrestrained mice, breathing parameters were recorded by whole-body plethysmography as previously described (Bartlett and Tenney 1970; Menuet et al. 2011). Briefly, the plethysmographic chamber (200 mL) was connected to a differential pressure transducer (model DP 45-18; Valdyne Engineering Northridge, CA), which measured pressure fluctuations within the closed chamber relative to a reference chamber of the same volume. Breathing parameters were recorded by a BIOPAC data analysis system (BIOPAC System Inc., Santa Barbara, CA). Two or three days before plethysmographic recordings for the NX-exposed groups or before entering the hypobaric chamber for HX-exposed groups, mice were accustomed to stay in the plethysmograph chamber to reduce stress effect on breathing. To check the acute ventilatory responses to hypoxia (Fig. 1), air was replaced by hypoxic gas mixture (O₂ 8%, 5 min). Routinely, WT and Epo-TAG^h mice were alternatively recorded and subjected to the same environmental challenges. Only periods of breathing without body movements were analyzed. We measured respiratory frequency (f_R , in cycle per min, $c \cdot \text{min}^{-1}$), tidal volume (V_T , μL) normalized as the ratio V_T divided by body weight (V_T , $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$), and minute ventilation (\dot{V}_E , $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). HVR was calculated as the difference in \dot{V}_E between 8% and 21% O₂. VAH was calculated as the difference in \dot{V}_E in normoxic conditions (21% O₂) between NX-exposed and HX-exposed groups.

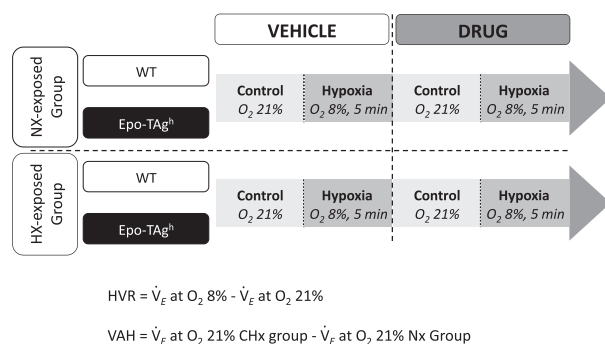


Figure 1. Study design. The ventilatory parameters were evaluated by plethysmographic approach in non-anesthetized and unrestrained mice exposed to either chronic normoxic (NX-exposed) or hypoxic (HX-exposed) conditions. The acute ventilatory response to hypoxia was checked by replacing air (control) by hypoxic gas mixture (hypoxia, O₂ 8%, 5 min) before (vehicle) and after drug injection.

Drugs

In order to test the role of medullary NO production, mice were subjected to a single intraperitoneal (i.p.) injection of either vehicle (NaCl; $n = 10$ for WT NX-exposed and for Wt HX-exposed; $n = 8$ for Epo-TAG^h NX-exposed mice and for Epo-TAG^h HX-exposed mice), MK-801 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, NMDA-R antagonist, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; $n = 8$ for WT NX-exposed and for Wt HX-exposed; $n = 6$ for Epo-TAG^h NX-exposed mice and for Epo-TAG^h HX-exposed mice) or SMTC (Sigma Aldrich, nNOS inhibitor, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; $n = 9$ for WT NX-exposed and $n = 7$ for Wt HX-exposed; $n = 6$ for Epo-TAG^h NX-exposed mice and for Epo-TAG^h HX-exposed mice). Breathing records were performed during control period and during the last minute of the acute hypoxic exposure. During the control period, breathing parameters were recorded three times at 10 min intervals and averaged. A first set of measurement was performed prior drug injection and a second one was performed 30 min (SMTC) or 1 h (MK801) after injection.

Biochemical analysis

As previously reported (El Hasnaoui-Saadani et al. 2007, 2009), at the end of either chronic normoxic or hypoxic exposure, mice were killed by cervical elongation and then beheaded. The brain was rapidly removed and the medulla quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Medulla RNA Extraction and Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from the medulla using TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and digested with RNase free DNase I (Invitrogen) for 1 h 30 min at room temperature to remove any contaminating genomic DNA. cDNA synthesis was performed using the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions ($5 \mu\text{g}$ total RNA/ $20 \mu\text{L}$ cDNA synthesis reactions, $50 \mu\text{mol/L}$ oligo (dT)20, 10 mmol/L dNTP mix).

Then, duplicate real-time PCR was performed on generated cDNA using the Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Biochemicals, Stockholm, Sweden) and gene-specific PCR primers (El Hasnaoui-Saadani et al. 2007) for quantitative analyses of genes of interest. PCR amplifications were performed according to the manufacturer's instructions. The results were represented as threshold cycle numbers (Ct values). Control cDNA of normoxic WT mice medulla was used to create standard curves. Relative amounts of mRNA, normalized by β -actin were calculated from Ct values,

according to the manufacturer's description (Roche Biochemicals).

Medulla Protein Extraction and Western Blot Analysis

Twenty-four medulla samples of WT and Epo-TAg^h mice NX-exposed or HX-exposed (six mice for each group) were homogenized in ice-cold buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich): (a) 20 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L dithiothreitol, 0.5 mmol/L NaVO₄, pH 7.5 for NMDA-R measurement, (b) 50 mmol/L Tris HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, pH 7.2 for nNOS measurements. Homogenates were centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C. Then, supernatants were collected and stored at -20°C until use.

Protein of each studied sample (100 µg) was separated by electrophoresis on 7.5% (nNOS) or 10% (NMDA-R) sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore SAS, Molsheim, France). In addition, positive controls were also loaded, and precision prestained standards were used as molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were kept overnight in 5% BSA (bovine serum albumin) / TBS (tris-buffered saline)-0.5% Tween 20 at 4°C to block nonspecific binding. Membranes were then incubated overnight at 4°C with each primary antibody (nNOS [sc-648]; NMDA-R [sc-9058]; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted at 1/500 in 1% BSA/TBS-0.5% Tween 20 (TBS-T). Membranes were washed with TBS-T and incubated for 2 h at room temperature with either 1:500 anti-rabbit or 1:500 anti-mouse IgG antibody-horse-radish peroxidase conjugate depending on the species of the primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Immunodetection was accomplished using ECL Western blot analysis detection kit (Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then probed with anti β-actin (Santa Cruz Biotechnology) as internal control. Densitometric scanning and image analysis, using ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD), were done to quantify the specific protein expression of each sample compared to internal control. Data were then expressed as the ratio of the protein of interest density to that of the β-actin.

NOx Colorimetric Assay

The total amount of NO in the medulla samples ($n = 6$ for WT and $n = 6$ for Epo-TAg^h) was assessed by the Griess reaction using a colorimetric assay kit (nitrate/nitrite

colorimetric assay kit; Cayman Chemical, MI) that detects nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻), which are stable reaction products of NO. Because the relative proportion of each metabolite may vary, the index of total NO production is best assessed by their sum (NOx). Hence, homogenates and assay procedure were carried out following the manufacturer's instructions. Briefly, cerebral cortex samples were homogenized in four volumes (W/V) of phosphate buffered saline (pH 7.6) at 4°C, ultracentrifuged at 100,000g for 60 min at 4°C. NOx determination was carried out in supernatants. The nitrate reductase reaction was first employed to convert nitrate to nitrite followed by Griess reaction in order to measure metabolites by photometric absorbance using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay plate reader. The optical density was measured at 540 nm. The quantity of NOx detected in each sample was compared to a nitrite standard curve. Finally, data were expressed as the ratio of the quantity of NOx to that of total protein.

Statistical analysis

Values are presented as mean ± standard deviation (SD). Kolmogorov–Smirnov test assessed the normality of distribution. The effects of acute hypoxia (F_IO₂ 8% vs. 21%) on ventilatory and biochemical parameters in WT and Epo-TAg^h mice were evaluated (i) after exposure to either chronic normoxic or hypoxic conditions and/or (ii) drugs injection (NaCl, SMTC or MK-801, Fig. 1). Differences were tested by a multivariate analysis of variance (MANOVA) with Greenhouse and Geisser adjustments. Newman–Keuls post hoc tests were used to assess specific differences between groups. All analyses were performed with the Statistica software (Stat Soft, Tulsa). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of Epo deficiency and exposure to chronic hypoxia on normoxic ventilatory parameters

At baseline, ventilatory parameters were similar in WT and Epo-TAg^h mice (Table 1) and rectal temperatures were not different ($35.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and $35.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$, respectively). After 14 days in the hypobaric chamber, \dot{V}_E of WT mice was significantly higher (VAH) as compared to NX-exposed mice. This increase in \dot{V}_E was mediated exclusively by an increase in V_T , as breathing frequency was unaltered in HX-exposed mice. In contrast, ventilatory parameters were not altered in Epo-TAg^h HX-exposed mice. Rectal temperatures of WT and Epo-TAg^h mice were not modified after chronic hypoxia

Table 1. Ventilatory parameters in wild-type and Epo-TAg^h mice exposed either to normoxic (NX-exposed) or hypoxic (HX-exposed) conditions tested in normoxia (F_IO₂ = 21%) and acute hypoxia (F_IO₂ = 8%).

	Acclimatization	F _I O ₂ (%)	Wild type mice			Epo-TAg ^h mice		
			NaCl	SMTC	MK-801	NaCl	8M1C	MK-801
\dot{V}_E (mL·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	NX-exposed	21	2.26 ± 0.48	2.20 ± 0.57	2.90 ± 0.38	2.17 ± 0.53	2.15 ± 0.53	2.72 ± 0.16
		8	3.61 ± 1.14 ¹	3.46 ± 0.60 ¹	2.03 ± 0.50 ³	2.59 ± 0.44	3.04 ± 0.27	3.04 ± 0.45 ¹
	HX-exposed	21	3.51 ± 0.77 ²	2.87 ± 0.81	3.16 ± 0.83	2.57 ± 0.37	2.45 ± 0.36	3.37 ± 0.29
		8	7.27 ± 1.07 ^{1,2}	6.31 ± 0.74 ^{1,2,3}	3.15 ± 0.66 ^{2,3}	3.86 ± 0.52 ^{1,2}	3.60 ± 0.40 ¹	3.72 ± 1.14
V _T (μL·g ⁻¹)	NX-exposed	21	8.63 ± 1.26	7.20 ± 1.43	10.97 ± 1.15 ³	7.62 ± 1.09	7.61 ± 1.34	12.32 ± 0.97 ³
		8	11.28 ± 2.37 ¹	12.19 ± 1.83 ¹	9.12 ± 1.37	7.68 ± 1.28	9.03 ± 0.57	9.08 ± 2.06 ¹
	HX-exposed	21	11.96 ± 1.24 ²	9.55 ± 1.66 ^{2,3}	14.27 ± 3.08 ^{2,3}	9.13 ± 1.97	7.95 ± 0.68	17.32 ± 2.61 ^{2,3}
		8	18.05 ± 2.38 ^{1,2}	15.76 ± 1.26 ^{1,2,3}	11.38 ± 2.04 ^{2,3}	10.46 ± 1.55 ²	9.25 ± 0.80	16.14 ± 4.20 ^{2,3}
f _R (c·min ⁻¹)	NX-exposed	21	261 ± 34	307 ± 53	268 ± 47	284 ± 54	282 ± 47	221 ± 19
		8	318 ± 54	284 ± 28	226 ± 56 ³	338 ± 34	337 ± 18	244 ± 27 ³
	HX-exposed	21	292 ± 49	293 ± 55	222 ± 34 ³	289 ± 48	309 ± 42	198 ± 34 ³
		8	404 ± 21 ^{1,2}	407 ± 20 ^{1,2}	280 ± 49 ³	370 ± 11 ¹	389 ± 26 ¹	227 ± 34 ³

Values are mean ± SD of ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T) and respiratory frequency (f_R). Significant differences are indicated as follows.

¹P < 0.05 versus 21% for the same group.

²P < 0.05 effect of exposure to chronic hypoxia in the same strain and the same F_IO₂.

³P < 0.05 versus NaCl in the same strain for the same F_IO₂.

(35.7 ± 0.6°C and 35.7 ± 0.7°C, respectively) as compared to mice housed in normoxia.

Effect of exposure to chronic hypoxia on HVR

In WT NX-exposed mice, exposure to acute hypoxia (8% O₂) led to an increase in V_T and \dot{V}_E (HVR) whereas Epo-TAg^h mice did not respond (Table 1, Fig. 2). HX-exposed WT mice showed a larger HVR than without acclimatization (Table 1, Fig. 2). In Epo-TAg^h HX-exposed mice, acute hypoxia (8% O₂) led to an increase in f_R and \dot{V}_E (Table 1).

Effect of injection of nNOS inhibitor and NMDA receptor antagonist on normoxia-exposed mice

In WT and Epo-TAg^h mice housed in normoxic conditions, injection of SMTC had no effect on ventilatory parameters (Table 1) whereas V_T was significantly increased after MK-801 injection in both mice strains. During the acute hypoxic challenge, SMTC had no effect on HVR (Table 1, Fig. 2), while it was completely abolished by MK-801 in WT NX-exposed mice.

Effect of interaction between drug injection and exposure to chronic hypoxia

Effect of SMTC after exposure to chronic hypoxia

SMTC injection reduced the increase in \dot{V}_E induced by 14 days of acclimatization to chronic hypoxia in WT mice

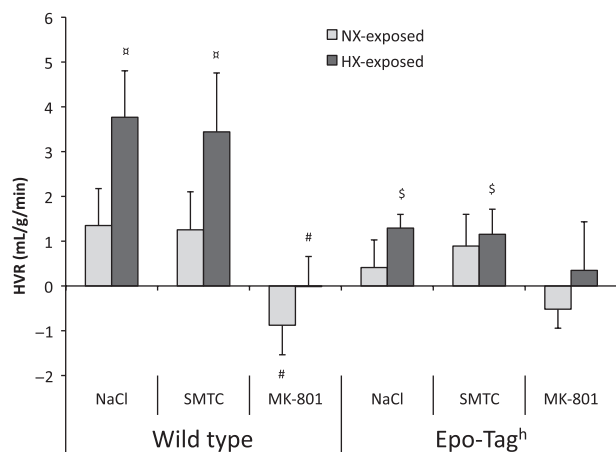


Figure 2. Effect of exposure to chronic hypoxia and drugs injections on HVR. Hypoxic ventilatory response was the difference between the recorded value at 8% O₂ and 21% O₂. Given values are obtained before and after drugs injections (NaCl, SMTC or MK-801). Values are means ± SD. ¹P < 0.05 effect of exposure to chronic hypoxia in the same strain. ²P < 0.05 versus NaCl in the same strain. ³P < 0.05 versus wild-type (WT) animals.

(Table 1) and tended to decrease the VAH (P = 0.07, Fig. 3). However, HVR persisted without change after nNOS inhibition (Fig. 2) despite a slight reduction in V_T and \dot{V}_E as compared to vehicle in WT mice HX-exposed during acute response to hypoxia (F_IO₂ = 8%, Table 1). No effect of SMTC was reported on VAH in HX-exposed Epo-TAg^h mice after 14 days of chronic hypoxia (Table 1, Fig. 3).

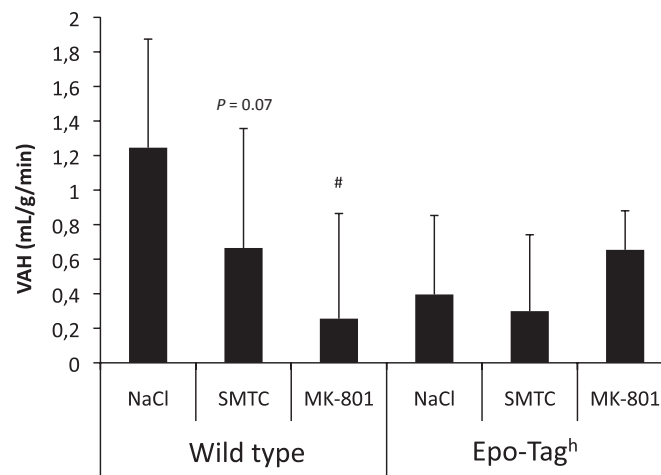


Figure 3. Effect of chronic hypoxia and drug injections on VAH. Difference in minute ventilation at 21% O₂ between mice housed in normoxia and mice exposed to chronic hypoxia in wild-type (WT) and Epo-TAG^h mice, representing the ventilatory acclimatization to chronic hypoxia (VAH) and after drug injections (NaCl, SMTC or MK-801). #*P* < 0.05 versus NaCl in the same strain. Values are means ± SD.

Effect of MK-801 after exposure to chronic hypoxia

MK-801 injection reduced the VAH induced by exposure to chronic hypoxia in WT mice (Table 1, Fig. 3). The injection of MK-801 induced a significant decrease in f_R and an increase in V_T as compared to vehicle in HX-exposed WT and Epo-TAG^h mice at 21% O₂ (Table 1). During acute hypoxia (8% O₂), MK-801 injection led to a significant decrease in \dot{V}_E , V_T and f_R in HX-exposed WT mice as compared to vehicle (Table 1). In HX-exposed Epo-TAG^h mice, \dot{V}_E was unchanged as compared to vehicle despite an increase in V_T and a decrease in f_R (Table 1). HVR after exposure to chronic hypoxia was totally abolished after MK-801 injection as compared to vehicle in WT mice (Fig. 2).

NMDA-R and nNOS expression in medulla

At baseline, in the medulla of mice housed in normoxia, NMDA-R and nNOS mRNA and protein expressions (Table 2) were higher in Epo-TAG^h mice than in WT mice. After exposure to chronic hypoxia, mRNA and protein levels of NMDA-R were significantly higher in WT mice as compared to mice housed in normoxia, while it remained unchanged in Epo-TAG^h mice. The nNOS mRNA and protein levels were higher in WT whereas only nNOS protein was higher in Epo-TAG^h mice exposed to chronic hypoxia compared with those housed in normoxia (Table 2).

NO production

Concentrations of NO metabolites were the same between WT and Epo-TAG^h mice housed in normoxia (Table 2). After 14 days of hypobaric hypoxia, NO metabolites were higher than in normoxia in both strains of mice and were significantly larger in Epo-TAG^h mice than in WT mice (Table 2).

Discussion

This study was designed to evaluate the interaction between Epo and NMDA-NO central pathway in ventilatory response to acute hypoxia and the modulation of this phenomenon by prior exposure to chronic hypoxia. Our results confirm that adequate Epo level is necessary to obtain normal HVR and VAH. Moreover, our results show that MK-801 blocks HVR and VAH and that SMTC have only an effect on VAH, suggesting that the effect of NMDA and NO pathways might be independent.

Methodological considerations

Experiments were performed on Epo-deficient SV-40 T antigen mice that display a whole-body reduced Epo expression (Binley et al. 2002). The Epo-deficient mice display also a very low hematocrit (around 20%) and did not develop polycythemia after exposure to chronic hypoxia contrary to WT mice (Macarlupu et al. 2006b). Indeed, hemoglobin concentration as well as hematocrit did not change significantly after 14 days of chronic

Table 2. Expression of mRNA and protein of NMDA-R1 and nNOS in the medulla and NO production in WT and Epo-TAg^h mice exposed either to normoxic (NX-exposed) or hypoxic (HX-exposed) conditions.

	Wild-type		Epo-TAg ^h	
	NX-exposed	HX-exposed	NX-exposed	HX-exposed
NMDA-R1 mRNA/ β -actin	8.26 \pm 1.39	20.81 \pm 1.97 ¹	26.62 \pm 0.93 ²	17.67 \pm 2.21
NMDA-R1 protein/ β -actin	2.94 \pm 0.16	4.14 \pm 0.60 ¹	4.09 \pm 0.19 ²	4.16 \pm 0.99
nNOS mRNA/ β -actin	0.96 \pm 0.19	1.72 \pm 0.23 ¹	2.30 \pm 0.21 ²	2.25 \pm 0.05
nNOS protein/ β -actin	0.57 \pm 0.07	1.71 \pm 0.11 ¹	1.03 \pm 0.12 ²	2.01 \pm 0.36 ¹
NOx (μ mol $\cdot\mu$ L ⁻¹)	103 \pm 6	146 \pm 4 ¹	85 \pm 6	242 \pm 20 ^{1,2}

Values are Mean \pm SD of the expression of mRNA and protein of NMDA-R1 and nNOS and production of NO (NOx, sum of NO₂⁻, and NO₃⁻). Significant differences are indicated as follows.

¹*P* < 0.05 effect of exposure to chronic hypoxia in the same strain.

²*P* < 0.05 versus wild-type strain with the same exposition (NX or HX).

hypoxia compared to normoxic values (Macarlupu et al. 2006b). Therefore, we cannot exclude that the observed effects are due to chronic anemia or the combined effect of Epo deficiency and anemia.

It is known that carotid bodies contribute to Epo regulation of ventilation (Soliz et al. 2005). As the pharmacological substances used in this study were injected intraperitoneally we cannot exclude a systemic effect, which could not only be limited to the medulla but could also affect peripheral chemoreceptors or other areas of the central nervous system. Consequently, we cannot determine which tissues are responsible for the difference observed in the ventilatory response of Epo-TAg^h mice (medulla and/or carotid bodies).

Effect of Epo deficiency under normoxic conditions

Epo deficiency did not modify breathing parameters and central temperature in resting condition (21% O₂) at least in male mice. In Epo-deficient mice, no significant HVR was found. These results confirm that Epo is necessary to obtain a correct HVR. Indeed, it has been previously proposed that Epo exerts a key role in HVR (Soliz et al. 2005) and improves this response in female mice (Soliz et al. 2009).

Effect of exposure to chronic hypoxia on NO pathway in WT and Epo-deficient mice

In WT mice, exposure to chronic hypoxia leads to an increase in NMDA-R expression and NO production in the medulla. These results suggest that the intracellular signaling pathways that are used by Epo at the nervous system level are similar to those implicated in tissue protection. Indeed, Epo modulates the activity of calcium channels through phospholipase C, thereby reducing the

release of excitatory neurotransmitters and increasing NO production (Brines and Cerami 2005). The decrease in the excitatory neurotransmitters could be at the origin of the observed increase in NMDA-R expression in WT mice, in order to increase the effectiveness of the neurotransmitter. In Epo-TAg^h mice, the absence of modifications in NMDA-R expression after exposure to chronic hypoxia suggests that sufficient level of Epo is necessary to maintain a correct release of neurotransmitters. Indeed, Epo directly influences neurotransmitter release as well as neuronal activity (Koshimura et al. 1999; Kawakami et al. 2000). The increase in NO production in Epo-deficient mice could suggest that other pathways could be involved.

Effect of exposure to chronic hypoxia on VAH and HVR in WT and Epo-deficient mice

As already shown by our team (El Hasnaoui-Saadani et al. 2007) and others (Powell et al. 1998), acclimatization to chronic hypoxia leads to: (i) a significant increase in ventilation (VAH) mainly due to an increase in V_T (Table 1) and (ii) a significant increase in HVR (Fig. 3). In WT mice, plasma Epo is known to increase HVR by stimulating peripheral chemoreceptors (Soliz et al. 2005). In Epo-TAg^h mice, chronic hypoxia did not induce a significant VAH despite unchanged NMDA-R but increased nNOS expression and NOx production in the medulla (Table 2). Nevertheless, Epo-TAg^h mice displayed a slight but significant increase in V_T and \dot{V}_E at 8% O₂ after chronic hypoxia exposure. These results suggest a potential role of nNOS and NOx in HVR after exposure to chronic hypoxia in Epo-TAg^h mice that partially compensates the lack of high Epo concentration. Another explanation could be that 8% O₂ was too severe for these transgenic mice to increase ventilation and that the related energetic cost of breathing was too high, given their low oxygen-carrying capacity. Exposure to chronic

hypoxia did not affect rectal temperature neither in WT nor in Epo-TAg^h mice. Therefore, metabolic rate seems unaffected by chronic hypoxia and/or Epo deficiency.

Effect of drug injection on VAH and HVR in WT mice

Effects of nNOS on ventilatory control in hypoxia

The present results confirm previous studies from our group (El Hasnaoui-Saadani *et al.* 2007) and support the idea that the increase in nNOS expression leading to a rise in NO modulates the ventilatory pattern mainly through an increase in V_T and contributes to VAH without any effect on HVR in nonacclimatized WT mice (for more details see El Hasnaoui-Saadani *et al.* (2007)).

Effects of NMDA-R on ventilatory control in hypoxia

It was clearly demonstrated that in the first stages of hypoxia, peripheral chemoreceptor stimulation elicits a rapid ventilatory increase by enhancing glutamate release (Mizusawa *et al.* 1994) and activation of postsynaptic NMDA-R in the nucleus of the solitary tract (Ohtake *et al.* 1998). Indeed, Ohtake *et al.* (1998) have shown that NMDA-R protein level increased after hypoxic exposure in the nucleus of the solitary tract of adult rats, which is in agreement with a role of NMDA in HVR in mammals (Gozal *et al.* 2000). These results were confirmed by our observation in WT mice with or without exposure to chronic hypoxia. Reid and Powell (2005) also demonstrated that systemic NMDA-R blockade (MK801) eliminated HVR in normoxic and chronically hypoxic rats.

The rise in NMDA-R in chronically hypoxic mice could explain the larger response to NMDA-R blockade on ventilatory parameters after acclimatization. Taken together, these results suggest that NMDA-R are involved in HVR after chronic hypoxia and support the hypothesis of NMDA-R plasticity with acclimatization to hypoxia. Moreover, the activation of NMDA-R, enhancing HVR, seems also to be linked to nNOS expression but only after exposure to chronic hypoxia. Indeed, a small but significant decrease in ventilation was observed after SMTC injection in acclimatized WT mice exposed to acute hypoxia, suggesting that nNOS was partially involved in HVR after acclimatization. Therefore, our results suggest that, in chronically hypoxic mice, the increase in NMDA-R may induce a rise in intracellular calcium leading to calmodulin release, which could reinforce the role of nNOS in VAH after acclimatization to hypoxia. Surprisingly, MK-801 induced a significant increase in V_T in WT mice before and after acclimatization in normoxic condi-

tions suggesting that compensatory mechanisms overwhelmed NMDA-R inefficiency.

Effect of drug injection on VAH and HVR in Epo-deficient mice

Role of nNOS and NOx on ventilatory control in hypoxia

In Epo-TAg^h mice housed at sea level, we observed that SMTC injection had no effect on ventilatory parameters (Table 1) despite a larger expression of nNOS in the medulla as compared to WT mice. Ward *et al.* (2005) showed that hypoxia induced a significant increase in nNOS protein levels (~10-fold) whereas NOS activity increased less than 1.5-fold suggesting a difference between the expression of the protein and its activity. Our results suggest that the activity of nNOS in the medulla of Epo-TAg^h mice could be lower than in WT mice, probably due to Epo deficiency, and, therefore, lead to a lower HVR. However, the slight but significant increase in V_T and \dot{V}_E at 8% O₂ observed after exposure to chronic hypoxia in Epo-TAg^h mice disappeared after SMTC injection (Table 1). As observed in WT mice (but with lower amplitude) it seems, therefore, that nNOS and NOx could be partially involved in HVR after chronic hypoxia in Epo-TAg^h mice.

Role of NMDA-R on ventilatory control in hypoxia

The injection of MK-801 had no effect on \dot{V}_E in Epo-TAg^h mice. However, significant and opposite changes were observed on V_T and f_R suggesting that NMDA-R are involved in the regulation of the ventilatory pattern in these Epo-deficient mice. Indeed, MK-801 greatly decreased f_R with a concomitant increase in V_T at 21 and 8% O₂ before and after exposure to chronic hypoxia (Table 1). This effect of MK-801 in Epo-TAg^h mice was the same, in a larger extent, as the one observed in WT mice and reinforces the hypothesis of a potential compensatory mechanism of NMDA-R blockade to maintain baseline ventilation before and furthermore after chronic hypoxia.

In Epo-TAg^h mice, NMDA-R antagonist had no significant effect on ventilation when compared to vehicle despite a significant difference after SMTC injection (Fig. 3). This result suggests that NMDA-R seems to be also partially involved in HVR in Epo-TAg^h mice.

Conclusion

This study provides evidence that nNOS is partially involved in VAH in Epo-TAg^h mice. NMDA receptors are increased in the medulla of Epo-TAg^h mice exposed to

chronic hypoxia and could also be involved in VAH. Moreover, NMDA receptors are crucial for HVR. These results are, therefore, consistent with the hypothesis of central nervous system plasticity not only partially involving nNOS for VAH and requiring NMDA receptors for HVR and VAH, but also with a potential important catalyzing role of Epo.

Translational perspective

The erythropoietic system is known to stimulate production of red blood cells in hypoxic conditions. Besides this well-known role, Epo synthesised by neurons and astrocytes modulates the ventilatory response to hypoxia. This effect has been attributed to the presence of Epo receptors in both brainstem respiratory centres and carotid bodies but little is known regarding the mechanisms involved in hypoxic ventilatory response and ventilatory acclimatisation to hypoxia. Using Epo-deficient mice, we showed that Epo could play a key-regulating role in the neural control of ventilatory acclimatisation to hypoxia and hypoxic ventilatory response probably via a catalysing role on the nitric oxide central pathway. These novel findings are relevant to better understand the respiratory regulations, especially those occurring during Epo deficiency.

Acknowledgments

Authors thank Sonia and Samira Varela for the animal's care and Rosa Cardenas Alayza for technical help and support.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Bartlett, D. Jr, and S. M. Tenney. 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10:384–395.
- Binley, K., Z. Askham, S. Iqbal, H. Spearman, L. Martin, M. de Alwis, et al. 2002. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* 100:2406–2413.
- Bisgard, G. E. 2000. Carotid body mechanisms in acclimatisation to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121:237–246.
- Bisgard, G. E., and L. A. Neubauer. 1995. Peripheral and central effects of hypoxia. Pp. 617–618 in J. A. Dempsey and A. I. Pack, eds. *Regulation of breathing*. Dekker, New York, NY.
- Brines, M., and A. Cerami. 2005. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:484–494.
- Digicaylioglu, M., S. Bichet, H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, C. Bauer, et al. 1995. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:3717–3720.
- El Hasnaoui-Saadani, R., R. C. Alayza, T. Launay, A. Pichon, P. Quidu, M. Beaudry, et al. 2007. Brain stem NO modulates ventilatory acclimatisation to hypoxia in mice. *J. Appl. Physiol.* 103:1506–1512.
- El Hasnaoui-Saadani, R., A. Pichon, D. Marchant, P. Olivier, T. Launay, P. Quidu, et al. 2009. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296:R801–R811.
- Fandrey, J., T. A. Gorr, and M. Gassmann. 2006. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71:642–651.
- Favret, F., J. P. Richalet, K. K. Henderson, R. Germack, and N. C. Gonzalez. 2001. Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280:R730–R738.
- Gassmann, M., and J. Soliz. 2009. Erythropoietin modulates the neural control of hypoxic ventilation. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3575–3582.
- Gonzalez, N. C., R. L. Clancy, Y. Moue, and J. P. Richalet. 1998. Increasing maximal heart rate increases maximal O₂ uptake in rats acclimatized to simulated altitude. *J. Appl. Physiol.* 84:164–168.
- Gozal, D., E. Gozal, and N. Simakajornboon. 2000. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir. Physiol.* 121:209–221.
- Kawakami, M., S. Iwasaki, K. Sato, and M. Takahashi. 2000. Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:293–297.
- Kirkeby, A., J. van Beek, J. Nielsen, M. Leist, and L. Helboe. 2007. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J. Neurosci. Methods* 164:50–58.
- Koshimura, K., Y. Murakami, M. Sohmiya, J. Tanaka, and Y. Kato. 1999. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J. Neurochem.* 72:2565–2572.
- Macarlupu, J. L., A. Buvry, O. E. Morel, F. Leon-Velarde, J. P. Richalet, and F. Favret. 2006b. Time course of ventilatory acclimatisation to hypoxia in a model of anemic transgenic mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 153:14–22.
- Masuda, S., M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda, and R. Sasaki. 1994. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269:19488–19493.
- Menuet, C., N. Kourdougli, G. Hilaire, and N. Voituron. 2011. Differences in serotonergic metabolism possibly contribute

- to differences in breathing phenotype of FVB/N and C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol.* 110:1572–1581.
- Mizusawa, A., H. Ogawa, Y. Kikuchi, W. Hida, H. Kurosawa, S. Okabe, et al. 1994. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarius of the rat during hypoxia. *J. Physiol.* 478(Pt. 1):55–66.
- Ogawa, H., A. Mizusawa, Y. Kikuchi, W. Hida, H. Miki, and K. Shirato. 1995. Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarius of rats during hypoxia. *J. Physiol.* 486(Pt. 2):495–504.
- Ohtake, P. J., J. E. Torres, Y. M. Gozal, G. R. Graff, and D. Gozal. 1998. NMDA receptors mediate peripheral chemoreceptor afferent input in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 84:853–861.
- Olson, E. B. Jr, and J. A. Dempsey. 1978. Rat as a model for humanlike ventilatory adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 44:763–769.
- Powell, F. L. 2007. The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157:154–161.
- Powell, F. L., W. K. Milsom, and G. S. Mitchell. 1998. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112:123–134.
- Powell, F. L., K. A. Huey, and M. R. Dwinell. 2000. Central nervous system mechanisms of ventilatory acclimatisation to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121:223–236.
- Prabhakar, N. R., S. F. Pieramici, D. R. Premkumar, G. K. Kumar, and R. N. Kalaria. 1996. Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43:341–346.
- Reid, S. G., and F. L. Powell. 2005. Effects of chronic hypoxia on MK-801-induced changes in the acute hypoxic ventilatory response. *J. Appl. Physiol.* 99:2108–2114.
- Robach, P., Y. Fulla, K. R. Westerterp, and J. P. Richalet. 2004. Comparative response of EPO and soluble transferrin receptor at high altitude. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36:493–1498, discussion 1492.
- Siren, A. L., F. Knerlich, W. Poser, C. H. Gleiter, W. Bruck, and H. Ehrenreich. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 101:271–276.
- Soliz, J., V. Joseph, C. Soulage, C. Becskei, J. Vogel, J. M. Pequignot, et al. 2005. Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J. Physiol.* 568:559–571.
- Soliz, J., M. Gassmann, and V. Joseph. 2007. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatisation to hypoxia. *J. Physiol.* 583:329–336.
- Soliz, J., J. J. Thomsen, C. Soulage, C. Lundby, and M. Gassmann. 2009. Sex-dependent regulation of hypoxic ventilation in mice and humans is mediated by erythropoietin. *Am. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol.* 296:R1837–R1846.
- Teppema, L. J., and A. Dahan. 2010. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol. Rev.* 90:675–754.
- Ward, M. E., M. Toporsian, J. A. Scott, H. Teoh, V. Govindaraju, A. Quan, et al. 2005. Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant. *J. Clin. Inv.* 115:3128–3139.
- Yamamoto, M., K. Koshimura, M. Sohmiya, Y. Murakami, and Y. Kato. 2004. Effect of erythropoietin on nitric oxide production in the rat hippocampus using in vivo brain microdialysis. *Neuroscience* 128:163–168.
- Yeo, E. J., Y. S. Chun, and J. W. Park. 2004. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem. Pharmacol.* 68:1061–1069.

Des études ayant mis en évidence d'un rôle majeur du nNOS et du NMDA dans l'acclimatation à une hypoxie chronique, nous avons voulu comprendre l'implication de cette voie de signalisation chez une espèce animale adaptée à la vie en haute altitude depuis plusieurs millions d'années (Mason, 2003 ; Wang, 2008, 2012 ; Zhu, 2005). Nous avons donc étudié les potentielles modifications de cette voie de signalisation et de la ventilation chez le Plateau Pika (Article 2).

B. Rôle du glutamate et de la sérotonine dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez une espèce adaptée à la haute altitude : le Plateau Pika

Article 2 :

Bai Z, Voituron N, Wuren T, **Jeton F**, Jin G, Marchant D, Richalet JP, Ge RL, Pichon AP.

Role of glutamate and serotonin on the hypoxic ventilatory response in high-altitude-adapted plateau Pika. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015 Jul;212-214:39-45.

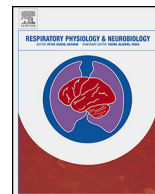
Le « plateau Pika » est considéré comme un animal adapté à l'hypoxie chronique, de part sa capacité à vivre en haute altitude depuis plusieurs millions d'années (Mason, 2003; Wang, 2008, 2012; Zhu, 2005). Nous avons émis l'hypothèse d'une implication du récepteur N-Méthyle-D-Aspartate (NMDA) et non-NMDA, de l'oxyde nitrique (NO) et de la sérotonine dans la ventilation spontanée et de la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le Pika.

Nous avons pour cela testé les effets de la mémantine (antagoniste du récepteur NMDA), du DQNX (antagoniste des récepteurs non-NMDA), du L-NAME (inhibiteur de la NO synthase) et de la fluoxetine (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine) sur la ventilation et la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le Pika. Les paramètres ventilatoires ont été mesurés avant et après l'injection des drogues ou du NaCl (contrôle) chez des animaux non anesthésiés et non contraints à une altitude correspondant à leur lieu de vie naturel ($P_iO_2 = 86\text{mmHg}$, 4100 m) et après une stimulation en hypoxie aigue ($P_iO_2 = 57\text{mmHg}$, 3minutes) afin de déterminer l'influence des chémorécepteurs périphériques dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- **Augmentation du \dot{V}_E et du V_T** en réponse à l'hypoxie chez les pikas
- **Abolition de l'HVR** après injection de mémantine et de fluoxétine
- **Augmentation de l'HVR** après injection de DQNX

Comme observé dans notre précédente étude sur la souris (Cf. Article 1), il existe également une implication majeure de la **voie du glutamate sur l'acclimatation ventilatoire à l'hypoxie** chez le Pika. Les différents résultats de cette étude ont mis en évidence une implication des récepteurs NMDA dans la RVH mais pas dans l'acclimatation à l'hypoxie. De même, les récepteurs AMPA/kainate ne sont pas impliqués dans l'acclimatation mais semblent avoir un rôle dans la régulation du patron ventilatoire. De plus, sachant que le DQNX ne passe pas la BHE, on peut penser que les récepteurs non-NMDA joueraient un rôle dans la chémoréception périphérique. De manière intéressante, la voie globale du NO ne semble pas avoir de rôle majeur dans la RVH chez le Pika peut être du fait d'interactions entre les différentes formes de NOS, mais pourrait jouer un rôle dans la modulation du patron ventilatoire, notamment sur le V_T et la f_R , ce qui est en concordance avec une précédente étude (Pichon, 2009). Nous avons également mis en évidence un **rôle de la sérotonine** dans cette acclimatation chez le Pika, car l'accumulation de 5-HT suite à une inhibition de sa recapture a entraîné une diminution de l'HVR, phénomène déjà mis en évidence chez d'autres espèces (Burnet, 2001; Richter, 1999).



Role of glutamate and serotonin on the hypoxic ventilatory response in high-altitude-adapted plateau Pika



Zhenzhong Bai^{a,1}, Nicolas Voituron^{b,c,1}, Tana Wuren^a, Florine Jeton^{b,c}, Guoen Jin^a, Dominique Marchant^b, Jean-Paul Richalet^{b,c}, Ri-Li Ge^{a,**}, Aurélien P. Pichon^{b,c,*,2}

^a Research Centre for High Altitude Medicine, Qinghai University Medical College, Xining, Qinghai, PR China

^b Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire "Hypoxie & Poumon" EA2363, Bobigny, France

^c Laboratory of Excellence GR-Ex, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 March 2015

Available online 15 April 2015

Keywords:

Hypoxia

Adaptation—control of breathing

Serotonin

Glutamate pathway

ABSTRACT

The highland "plateau Pika" is considered to be adapted to chronic hypoxia. We hypothesized that glutamate *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors, nitric oxide (NO) synthase, and serotonin are involved in hypoxic ventilatory response (HVR) in Pikas. We tested the effects of NMDA (memantine) and non-NMDA receptors (DNQX) antagonists, NO synthase inhibitor (L-NAME), and selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine) on ventilation and HVR in Pikas. Ventilatory parameters were measured before and after drug (or vehicle) injections in conscious Pikas at their natural living altitude (P_{iO_2} 86 mmHg) and after a hypoxic challenge (P_{iO_2} 57 mmHg, 3 min) to assess the influence of peripheral chemoreceptor on HVR. Minute ventilation (V_i) and tidal volume (V_t) increased during hypoxic challenge after vehicle injection, whereas the T_i/T_{tot} ratio remained unchanged. The increase in V_i and V_t observed with vehicle at P_{iO_2} -57, when compared with P_{iO_2} -86, was inhibited after memantine and fluoxetine injection, whereas the DNQX injection increased HVR. At P_{iO_2} -57, L-NAME induced an increase in the T_i/T_{tot} ratio when compared with vehicle. Therefore, the glutamate through NMDA-R/AMPA receptor bindings and serotonin pathway are implicated at the peripheral chemoreceptor level in HVR in Pikas. However, NO influences the ventilatory pattern of Pikas at their habitual living altitude.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Long-term high-altitude exposure induces cardiopulmonary adaptations to optimize tissue oxygenation under hypoxic conditions. These improvements appear at the level of ventilation (\dot{V}_I), pulmonary diffusion, circulation, and tissue diffusion (Scott and Milsom, 2007). The acute hypoxic ventilatory response (HVR) is characterized by transient hyperventilation followed by a relative ventilatory decline (Teppema and Dahan, 2010), whereas the

time-dependent increase in resting baseline ventilation occurring after several hours to months is called ventilatory acclimatization to chronic hypoxia (VAH) (Powell et al., 1998). VAH is linked to an increased sensitivity of the respiratory control system (Bisgard, 2000; Bisgard and Neubauer, 1995; Gozal et al., 2000; Olson and Dempsey, 1978; Powell et al., 2000; Prabhakar et al., 1996) due to both enhanced O_2 peripheral chemosensitivity (Bisgard, 2000; Powell, 2007) and central responsiveness to peripheral chemoreceptor input (Powell et al., 2000). However, neurotransmitters involved in adaptations of ventilatory control in highland animals have not been fully studied.

The plateau Pika (*Ochotona curzoniae*) is a small lagomorph (100–150 g) living in high-altitude Qinghai-Tibetan plateau between 3200 and 5300 m above sea level. Pika fossils found in Tibetan plateaus are up to 20/30 million years old (Mason, 2003; Wang et al., 2008, 2012; Zhu et al., 2005), and Pikas could therefore be considered as adapted to high-altitude hypoxia. Previous results showed that plateau Pikas have improved their basal ventilation in hypoxia through changes in ventilatory pattern when compared with lowland animals exposed to high altitude (Pichon et al., 2009). These adaptations are mainly due to an increase in tidal volume and

* Corresponding author at: Laboratoire "Hypoxie & Poumon" EA2363, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY Cedex, France. Tel.: +33 1 48 38 77 36; fax: +33 1 48 38 89 24.

** Corresponding author at: Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810001, Qinghai, PR China. Tel.: +86 0971 6142063; fax: +86 0971 6142063.

E-mail addresses: geriligao@hotmail.com (R.-L. Ge), aurelien.pichon@orange.fr (A.P. Pichon).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Laboratory Mobility, Aging and Exercise (MOVE), EA 6314, Faculty of Sport Sciences, University of Poitiers, France.

inspiratory time in Pikas, leading to a better ventilatory efficiency (Pichon et al., 2009).

The involvement of excitatory amino acids as major neurotransmitters in the mammalian nervous system is well established. The α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors contribute to the fast components of excitatory post-synaptic current, whereas the slow components are mediated by NMDA receptors channel (Stern et al., 1992). It has been proposed, in non-adapted animals, that the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)/nitric oxide (NO) pathway (also called NO central pathway) could be involved in HVR. Indeed, some authors have shown that activation of NMDA receptors (NMDA-R) could participate in HVR in mice (Gozal et al., 2000) or in hibernator mammals (Harris and Milsom, 2001, 2003). When glutamate binds to NMDA-R, the intracellular calcium concentration increases, which may be activated by nNOS and induce a rise in NO production, then acting as an excitatory neurotransmitter in HVR (Ogawa et al., 1995). Therefore, chronic hypoxia was shown to stimulate an NO central pathway including NMDA-R and NO synthase (NOS) and could act on ventilatory response in highland species. Indeed, previous results suggest that nNOS had no effect on baseline ventilation, but could inhibit ventilatory drive and reduce HVR in Pikas (Pichon et al., 2009) when they are exposed to acute severe hypoxia in their burrows (Kuhnen, 1986; Lechner, 1976).

Moreover, the central respiratory drive is modulated by excitatory amino acids acting on non-NMDA receptors in mice (Greer et al., 1991). Glutamate could also bind on non-NMDA receptors (AMPA/kainate receptors) and could act on the ventilatory pattern in mammals (Bonham, 1995) and especially in lagomorphs (Mutolo et al., 2005). Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is also known to play a crucial role in the control of breathing under hypoxic conditions (Hilaire et al., 2010). However, little is known about the neurotransmitters involved in the adaptation of control of ventilation induced by long-term exposure to hypoxia in mammals. Therefore, the plateau Pika is a good model to study this phenomenon.

Then, we used a pharmacological approach to test the hypothesis that NMDA/non-NMDA receptors, nitric oxide synthase, and serotonin are involved in the HVR and baseline ventilation in Pikas. Therefore, we tested the effects of NO synthase inhibitor (L-NAME), NMDA (memantine), and non-NMDA receptors (DNQX) antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine) on ventilation in Pikas at their living altitude and during a hypoxic challenge.

2. Materials and methods

2.1. Ethical statements

Qinghai University Ethics Committee gave its agreement for all procedures conducted in animals (agreement number QHURCHAMD-2013-04-441 for Research Center for High Altitude Medicine). All the experiments were carried out following the Guiding Principles in the Care and Use of Animals (Institute of Laboratory Animal Research 1996). Animals were sedated or anesthetized appropriately to reduce suffering during procedures required.

2.2. Experimental animals

Wild adult males ($n=6$) and females ($n=26$) Pikas, weighing 135 ± 14 g, were captured at an altitude between 4050 and 4150 m by traps in the Tianjun private area of Haixi Mongol and Tibetan Autonomous Prefecture on the Qinghai-Tibetan Plateau. The owners of the capture zone had given permission to capture 32 Pikas for scientific purposes. The experiments were conducted

during the 5 days following the capture. The animals were transferred from the Tianjun area to Xining by car, and they were put into the hypobaric chamber reproducing their living altitude (4100 m) half a day later. During the travel, the animals had food and water available ad libitum with one animal by cage.

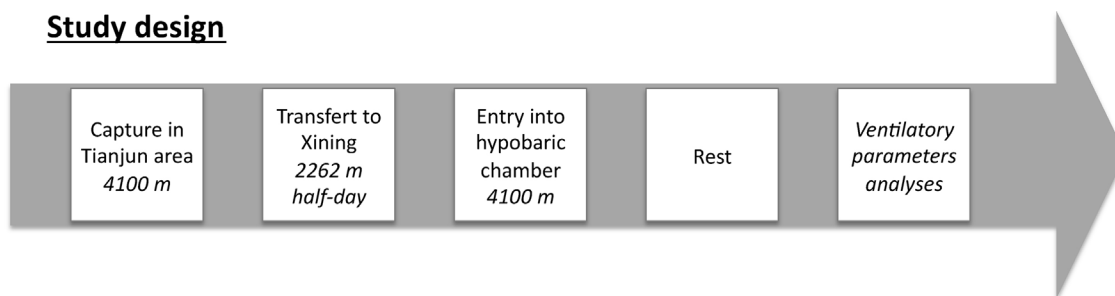
2.3. Study and experimental design (Fig. 1)

Experiments were carried out in Xining ($P_{iO_2} = 111$ mmHg, 2262 m Qinghai Province, People's Republic of China), but were performed at Pikas' usual living altitude by simulating P_{iO_2} of 86 mmHg (4100 m simulated altitude) in a hypobaric chamber ($P_{CHAMBER} = 454$ mmHg). Minute ventilation (\dot{V}_I) and HVR were first measured through the whole body plethysmograph placed in the hypobaric chamber at this simulated altitude (4100 m). Hypoxia was induced by injection of nitrogen from a tank placed in the hypobaric chamber. The plethysmograph outflow was released inside the hypobaric chamber. The Pikas were then exposed through the plethysmograph to a gas mixture with an F_{iO_2} of 13.9% to induce the hypoxic challenge at a P_{iO_2} of 57 mmHg during 3 min corresponding to a simulated altitude of 6800 m. As measurements of ventilatory parameters were done between 2.5 and 3 min, we studied the first part of the biphasic hypoxic response mainly linked to the carotid bodies (Maxova and Vizek, 2001; Teppema and Dahan, 2010). These experiments were first completed after intraperitoneal injections of NaCl (vehicle) in 32 Pikas. The following days, and after an additional 30 min within the plethysmograph for a maximal drug action and animal habituation, Pikas were re-exposed to $PIO_2 = 86$ mmHg (PIO_2 -86) and $PIO_2 = 57$ mmHg (PIO_2 -57) during 3 min (Fig. 1) to re-assess HVR. The control group was divided, and Pikas had received memantine (NMDA receptor antagonist, 10 mg/kg, $n=8$), DNQX (AMPA and kainate receptor antagonist, 10 mg/kg, $n=7$), L-NAME (NO synthase inhibitor, 10 mg/kg, $n=7$), or fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor, 10 mg/kg, $n=10$). Doses were chosen on the basis of previous experiments in which the effects of drugs on ventilation were examined on rats or mice (Ryan et al., 1996; Schwarzscher et al., 1992; Smeraski et al., 1999).

2.4. Whole body plethysmography

As already described (Pichon et al., 2009), ventilation was measured in unanesthetized and unrestrained animals via a whole body plethysmograph placed in the hypobaric chamber ($P_{CHAMBER} = 454$ mmHg). The system consisted of two 1 L high-density polyethylene rigid and transparent experimental chambers. The plethysmographic chamber was connected to a differential pressure transducer (model TSD 160A, Biopac) that measured pressure fluctuations within the closed chamber relative to a reference chamber. During each recording session, the chamber was hermetically sealed and temperature was continuously measured. The pressure signal was sent to a demodulator (model DA100c, Biopac), and data were recorded by a Biopac system (MP150, BIOPAC System Inc., Santa Barbara, California, USA). The pressure transducer was calibrated before each experiment with a manual manometer. Moreover, calibration pulses (0.2 mL) were generated by a gas-tight syringe and injection of air pulses into the plethysmograph at a rate similar to the animal's inspiratory rhythm to assess volume/pressure changes relationship. Barometric pressure was measured routinely before experiments, and temperature inside the chamber was kept stable and continuously monitored with a digital thermometer (Thermo Frigo OTAX). Relative humidity was monitored with a digital hygrometer. Rectal temperature was assessed before and after ventilation measurement using an electronic thermometer. It is known that on inspiration, the air entering the lungs is warmed and humidified,

A Study design



B Measure of ventilatory parameters

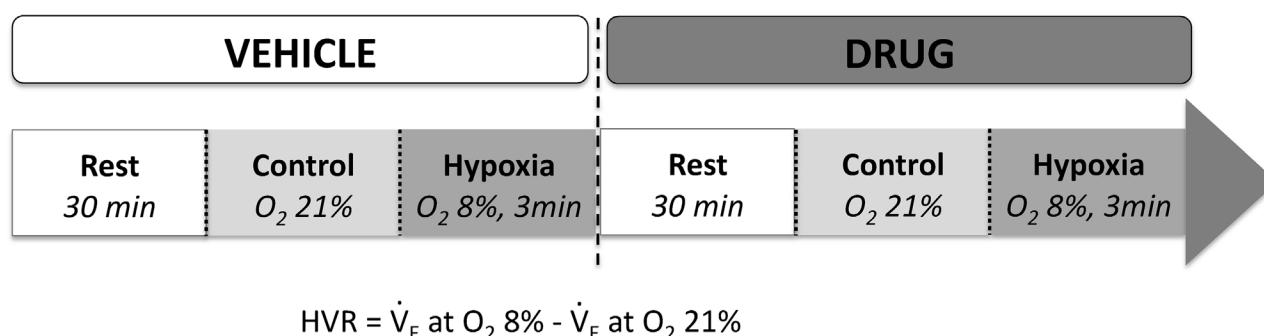


Fig. 1. Study design. The ventilatory parameters were evaluated by plethysmographic approach placed inside a hypobaric chamber (simulated altitude 4100 m). The acute ventilatory response to hypoxia was checked by replacing air (P_{iO_2} of 86 mmHg) by hypoxic gas mixture (P_{iO_2} of 57 mmHg) before (vehicle) and after drug injection.

leading to an increase in volume, which, in turn, causes a rise in pressure. Therefore, breathing was measured from the change in pressure associated with the change in volume, resulting from the warming and humidification of air during inspiration (Bartlett and Tenney, 1970; Drorbaugh and Fenn, 1955).

Each animal was habituated in the chamber for at least 30 min for familiarization before the assessment of ventilation. Measurements were made when the animals were absolutely quiet but awake. Each data file was analyzed breath-by-breath throughout all baseline and experimental periods and was stored for offline analysis to determine the respiratory frequency (f_R in breath/min), the tidal volume (V_t , mL) normalized as the ratio V_t divided by the body weight (V_t , mL/kg), the inspiratory time (T_i), and the total time of the respiratory cycle (T_{tot}). V_t calculations were based on the equation described by Drorbaugh and Fenn (1955). Minute ventilation (\dot{V}_I , mL/min/kg) was calculated as the product of f_R and V_t . Expiratory time (T_e) was calculated by subtracting T_i from T_{tot} . The T_i/T_{tot} ratio, a measure of respiratory timing, was calculated. An index of inspiratory drive was also determined by calculating the V_t/T_i ratio (Milic-Emili and Grunstein, 1976). The HVR was assessed (Fig. 1) in each animal by the changes in \dot{V}_I from 86 to 57 mmHg of P_{iO_2} ($\Delta\dot{V}_I$).

2.5. Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SD. The normality of distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. The effects of vehicle, memantine, DNQX, L-NAME, and fluoxetine and of P_{iO_2} on each ventilatory parameter were assessed by two-way ANOVAs for each drug. Newman–Keuls test was used for post hoc test. All statistical analyses were done using the Statistica software (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). A P -value <0.05 was considered as a significant difference.

3. Results

3.1. Ventilatory response to hypoxia

Whatever group of Pikas tested, animals showed a significant increase in \dot{V}_I , V_t , and V_t/T_i when exposed from P_{iO_2} of 86 to 57 mmHg after vehicle (NaCl) (ANOVA main effect, Table 1). Pikas body temperature did not change after memantine as compared to vehicle ($38.6 \pm 0.25^\circ\text{C}$ vs. $38.7 \pm 0.9^\circ\text{C}$), DNQX ($38.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ vs. $39.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$), L-NAME ($38.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$ vs. $38.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$), or fluoxetine injections ($38.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ vs. $39.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$).

3.2. Effects of NMDA receptors antagonist

Baseline \dot{V}_I at P_{iO_2} of 86 mmHg was not influenced by injection of NMDA receptors antagonist (Fig. 2A). Contrary to what was observed after vehicle injection, there was no more significant change in \dot{V}_I , V_t , and V_t/T_i after memantine injection during the hypoxic challenge (Table 1). Thus, HVR decreased after memantine as compared to vehicle, suggesting that NMDA receptors have a significant effect on HVR in Pikas (Fig. 3A).

3.3. Effects of AMPA receptors antagonist

Baseline \dot{V}_I at P_{iO_2} of 86 mmHg was not modified by injection of AMPA receptors antagonist (Fig. 2B). However, DNQX injection induced a significantly higher \dot{V}_I when compared to vehicle at P_{iO_2} of 57 mmHg, leading to an increase in HVR after AMPA receptors antagonist injection (Table 1 and Fig. 3B). This result suggests that AMPA receptors stimulation normally reduces HVR in Pikas. DNQX injection also increased the V_t/T_i ratio between P_{iO_2} of 86 and 57 mmHg.

Table 1
Tidal volume (V_t), breathing frequency (f_R), inspiratory time (T_i), total time of one breath (T_t), the inspiratory drive (V_t/T_i), and the respiratory timing (T_i/T_t) for P_{iO_2} of 57 and 86 mmHg in Pikas after injection of memantine ($n=7$), DNQX ($n=7$), L-NAME ($n=7$), and fluoxetine ($n=10$).

Drugs	P_{iO_2} (mmHg)	V_t ($\mu\text{L/g}$)	f_R (breath/min)	T_i (s)	T_t (s)	V_t/T_i (mL/kg/s)	T_i/T_t
NaCl	86	13.07 \pm 2.19	178 \pm 37	0.20 \pm 0.06	0.35 \pm 0.09	69.3 \pm 22.9	0.56 \pm 0.03
	57	20.52 \pm 3.89*	193 \pm 41*	0.18 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05	113.9 \pm 34.7*	0.58 \pm 0.03
Memantine	86	15.47 \pm 1.28	150 \pm 21	0.23 \pm 0.04 ^o	0.41 \pm 0.05	66.7 \pm 9.6	0.58 \pm 0.03
	57	19.27 \pm 3.51	166 \pm 15	0.21 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03	94.2 \pm 24.5	0.58 \pm 0.03
NaCl	86	14.54 \pm 2.54	169 \pm 27	0.21 \pm 0.04	0.36 \pm 0.06	69.7 \pm 10.8	0.58 \pm 0.04
	57	17.25 \pm 2.09*	175 \pm 25	0.20 \pm 0.04	0.35 \pm 0.05	89.2 \pm 13.8	0.56 \pm 0.04
DNQX	86	14.67 \pm 1.34	177 \pm 37	0.21 \pm 0.05	0.35 \pm 0.07	72.3 \pm 18.6	0.60 \pm 0.04
	57	19.49 \pm 4.55*	196 \pm 48	0.18 \pm 0.04	0.32 \pm 0.06	116.9 \pm 54.1*	0.57 \pm 0.03
NaCl	86	18.01 \pm 3.17	140 \pm 11	0.25 \pm 0.02	0.42 \pm 0.03	72.6 \pm 8.2	0.58 \pm 0.04
	57	21.43 \pm 4.50	178 \pm 37*	0.19 \pm 0.04*	0.34 \pm 0.07	116.2 \pm 46.0	0.56 \pm 0.03
L-NAME	86	15.57 \pm 2.35	148 \pm 23	0.23 \pm 0.03	0.41 \pm 0.06	67.5 \pm 12.2	0.57 \pm 0.04
	57	22.55 \pm 5.43*	160 \pm 27	0.22 \pm 0.03	0.38 \pm 0.06	102.2 \pm 32.4	0.59 \pm 0.03* ^o
NaCl	86	12.23 \pm 1.66	161 \pm 21	0.21 \pm 0.03	0.38 \pm 0.05	57.65 \pm 11.79	0.56 \pm 0.04
	57	17.36 \pm 5.93*	174 \pm 29	0.20 \pm 0.05	0.35 \pm 0.06	89.29 \pm 26.72*	0.56 \pm 0.06
Fluoxetine	86	13.00 \pm 3.37	165 \pm 31	0.22 \pm 0.04	0.37 \pm 0.07	60.01 \pm 17.66	0.60 \pm 0.08
	57	15.32 \pm 2.22*	159 \pm 21	0.22 \pm 0.03	0.38 \pm 0.05	71.45 \pm 13.74^o	0.57 \pm 0.04

$P < 0.05$ when compared to P_{iO_2} 86 mmHg, main effect; * $P < 0.05$ when compared to P_{iO_2} 86 for the same group; ^o $P < 0.05$ when compared to vehicle (NaCl) for the same P_{iO_2} and the same group of drug injections.

3.4. Effects of NOS inhibitor

NOS inhibitor had no effect on baseline \dot{V}_I at P_{iO_2} of 86 mmHg (Fig. 2C). At P_{iO_2} of 57 mmHg as compared to 86 mmHg, L-NAME injection increased \dot{V}_I but without difference as compared to the vehicle group (Table 1), suggesting an effect of NOS on peripheral ventilatory control. Moreover, L-NAME induced a significant increase in the T_i/T_t ratio at P_{iO_2} of 57 mmHg. However, NOS inhibitor had no significant effect on HVR (Fig. 3C).

3.5. Effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor

The injection of a selective 5-HT reuptake inhibitor had no effect on baseline \dot{V}_I at P_{iO_2} of 86 mmHg (Fig. 2D). After fluoxetine injection, \dot{V}_I and V_t/T_i were non-significantly increased during hypoxic challenge (at P_{iO_2} of 57 mmHg), conversely to what was observed after vehicle. Moreover, \dot{V}_I and V_t/T_i values at P_{iO_2} of 57 mmHg were significantly lower under fluoxetine when compared to vehicle. Taken together, these

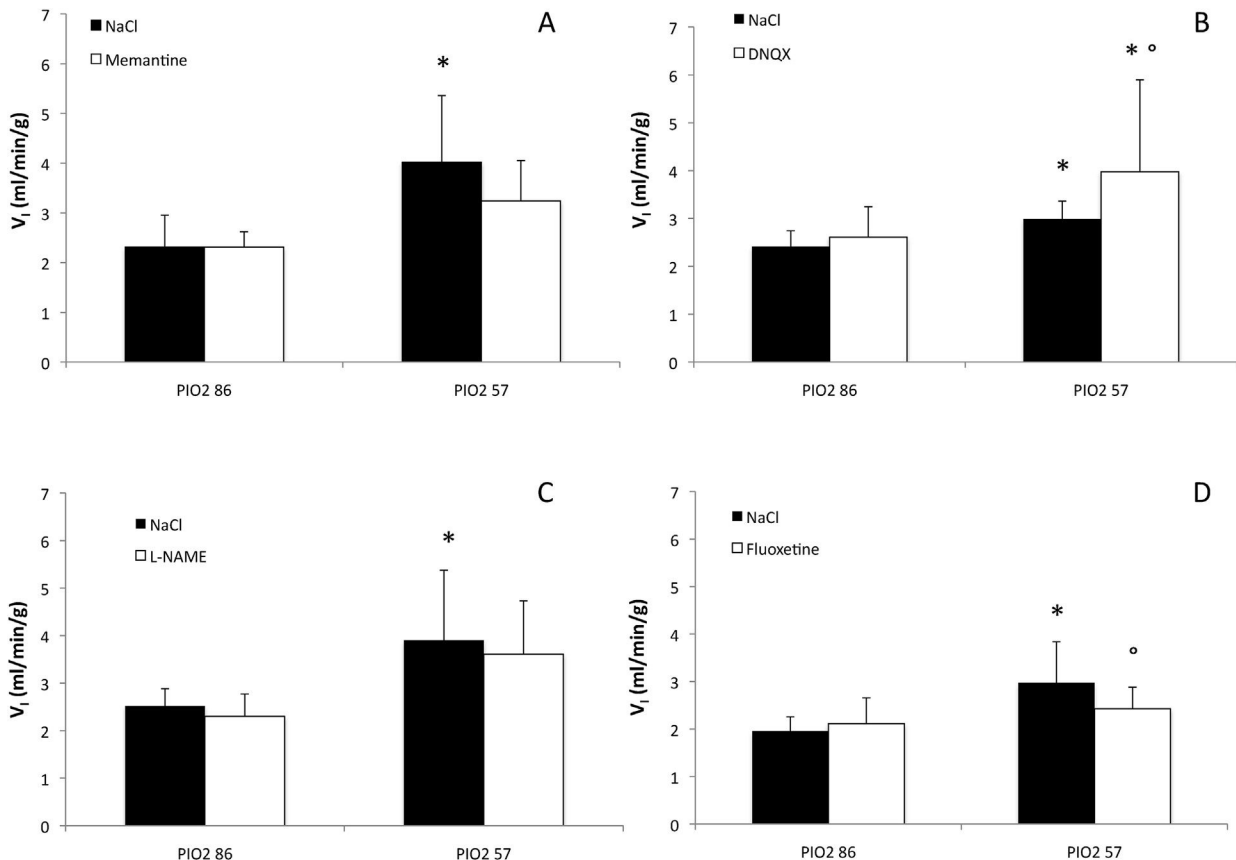


Fig. 2. Inspired ventilation (\dot{V}_I) in plateau Pikas for simulated P_{iO_2} of 57 and 86 mmHg after memantine (A), DNQX (B), L-NAME (C), and fluoxetine (D) injections as compared to vehicle (NaCl). * $P < 0.05$ when compared to P_{iO_2} -87 for the same group; ^o $P < 0.05$ when compared to vehicle (NaCl) for the same P_{iO_2} and for the same group of drug injection.

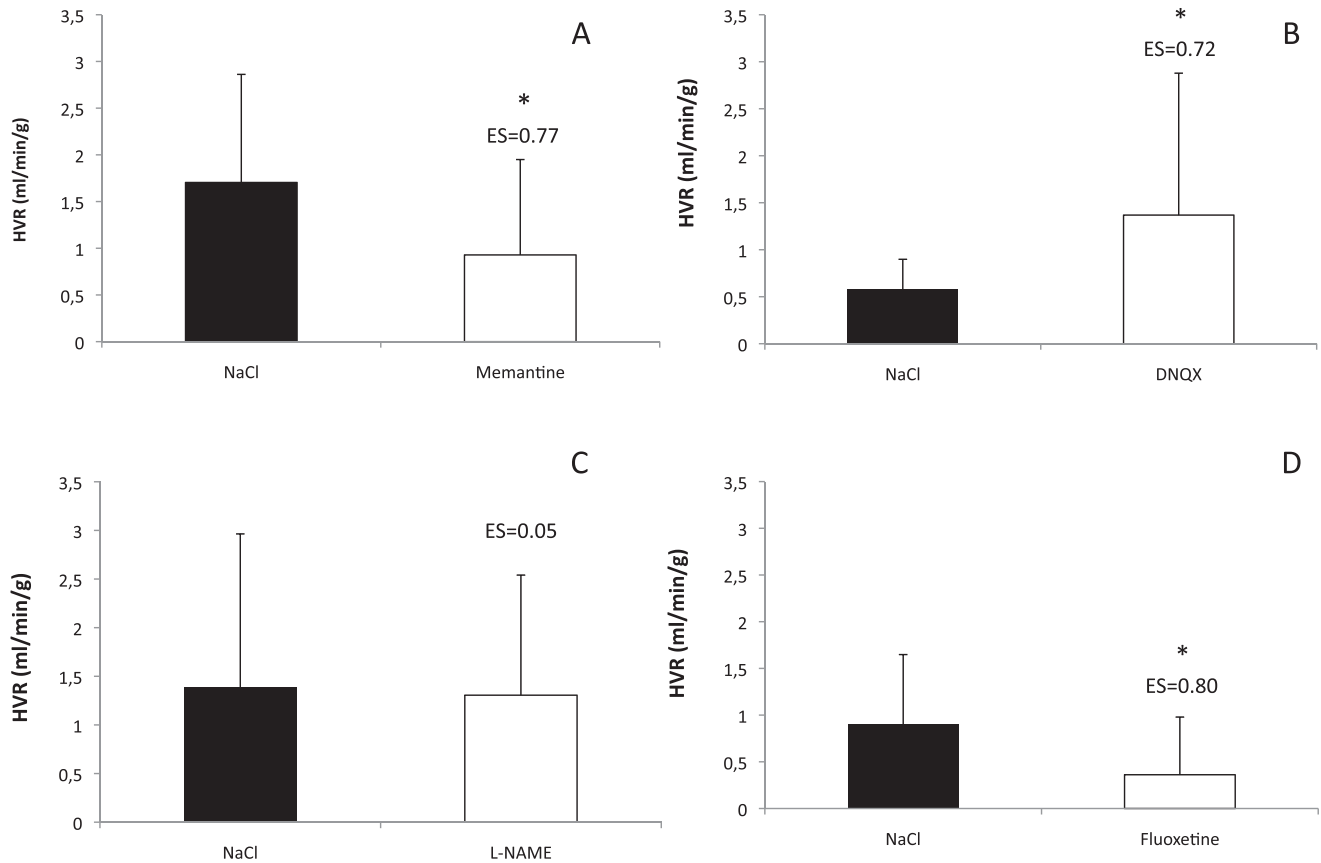


Fig. 3. Hypoxic ventilatory response (HVR) in plateau Pikas for simulated P_{O_2} of 57 and 86 mmHg after memantine (A), DNQX (B), L-NAME (C), and fluoxetine (D) injections as compared to vehicle (NaCl). Effect size (ES) from the Cohen's d -values was given on the chart, suggesting a moderate-to-large effect of drug for memantine, DNQX, and fluoxetine on HVR.

results suggest that serotonin accumulation decreased HVR (Fig. 3D).

4. Discussion

The main results of this study are that L-NAME modifies the ventilatory pattern in plateau Pikas, whereas HVR is controlled by mechanisms involving NMDA and AMPA/kainate receptors and serotonin pathways. Baseline ventilation in Pikas at their usual living altitude is insensitive to the alteration of NMDA, AMPA/kainate, and serotonin pathways, suggesting that adapted mechanisms of baseline ventilation are less sensitive (invariant) than HVR. Furthermore, systemic inhibition of NMDA receptors and the administration of the reuptake inhibitor, which would indicate an accumulation of serotonin, seem to limit HVR in this high-altitude indigenous animal by acting mainly on peripheral chemoreceptors. On the contrary, the inhibition of AMPA/kainate receptors, another target of glutamate, leads to an increase in HVR.

4.1. Methodological consideration

Given that drugs were administered systemically, the effects could be acting anywhere in the reflex pathway, from O_2 sensing to respiratory motor output, depending on the permeability of the blood–brain barrier (BBB) to the drug. Permeability of the BBB to L-NAME is controversial (Kaufmann et al., 2004; Wagner et al., 1997), and DNQX is blocked by the BBB (Tokarev and Jezova, 1997). However, memantine (Mehta et al., 2013) and fluoxetine (Warren, 2012) cross the BBB and act on the central nervous system. In the future, an injection into the fourth ventricle should be

interesting to more easily distinguish central from peripheral effects of the drugs on the ventilatory control. Moreover, as ventilatory recordings were performed during the first 3 min of hypoxic stimulation, the changes observed after drug injection were mainly due to peripheral chemoreceptors (Teppema and Dahan, 2010). Moreover, some of the drugs used in this study could act on the cardiovascular system. For example, L-NAME could induce hypertension or hypotension, depending on the doses and NO bioavailability (Kopinova et al., 2012), whereas memantine could activate the cardiovascular system (Collins et al., 2006).

4.2. Role of NMDA receptors in HVR

It is well known that glutamate and its binding on NMDA-R receptors are involved in the ventilatory control in mammals (Burton and Kazemi, 2000; Waters and Machaalani, 2005). Indeed, there is a lot of neurohistological evidence for NMDA expression in multiple brainstem regions that are known to be involved in ventilatory control, even if some discrepancies could be observed by a pharmacological approach (agonist/antagonist), probably due to differences in the experimental design or species concerned (Waters and Machaalani, 2005). In conscious rats, carotid bodies and other peripheral chemoreceptor-mediated hypoxic ventilatory responses are critically dependent on NMDA receptor activation (Ohtake et al., 1998). Moreover, it has been suggested that arterial chemosensory input during hypoxia may induce the release of glutamate in the “nucleus tractus solitarii” (Mizusawa et al., 1994). In the central respiratory centers, NMDA receptors have been identified in the ventral (Zheng et al., 1998) and dorsal parts of the pons (Dutschmann and Herbert, 1998). In this experiment,

memantine had no significant effect on basal ventilation in Pikas at their usual living altitude ($P_{iO_2} = 86$ mmHg), suggesting that NMDA is not involved in ventilatory adaptation to hypoxia in this species. Moreover, whereas ventilation is known to increase under hypoxic conditions, we observed only a slight increase in ventilation during the hypoxic challenge after injection of NMDA receptors antagonist, suggesting an effect of the NMDA pathway on HVR in Pikas.

4.3. Role of AMPA receptors in HVR

From the neonatal development (Whitney et al., 2000) to the adulthood, it has been shown that AMPA and kainate receptors could be involved in the respiratory pattern under hypoxic environment (Mutolo et al., 2005), but not in long-term facilitation (McGuire et al., 2008). In mice, at sea level, AMPA application over the pre-Böttinger complex, the C4 ventral motoneurons, and the hypoglossal motor nucleus produced an increase in the inspiratory frequency, tonic discharge on C4 ventral nerve roots, and inward currents in inspiratory hypoglossal motoneurons (Funk et al., 1997).

In our model of adaptation to hypoxia, we have shown that AMPA and kainate receptors antagonist increased ventilation of Pikas during an acute severe hypoxic challenge ($P_{iO_2} = 57$ mmHg), but not in their usual hypoxic environment ($P_{iO_2} = 86$ mmHg). These results suggest that non-NMDA (AMPA/kainate) receptors are not involved in the normal ventilatory pattern of Pikas adapted to hypoxia, at their habitual living altitude, but could decrease the hypoxic ventilatory drive, as shown by the increase in V_t/T_i after DNQX injection, and limit the increase in ventilation during acute severe hypoxia. As DNQX does not cross the BBB (Tokarev and Jezova, 1997) and we measured ventilation 2.5 min after hypoxia initiation, the non-NMDA receptors could be involved in the peripheral chemoreception to adjust the ventilatory drive at the central level.

4.4. Role of NOS in HVR

It is well known that NOS, through NMDA receptors activation, could be involved in the control of ventilation during acute (Prabhakar, 2006) or chronic (Reid and Powell, 2005) exposure to hypoxia and modulate ventilatory response at the peripheral (chemoreceptors) (Bisgard, 2000) or at the central levels (Schwenke et al., 2006). However, these possible effects of nNOS on HVR and VAH were recently contradicted in rats (Pamenter et al., 2015). In our previous work, we have shown that nNOS is probably involved in the limitation of ventilatory response to severe hypoxia in Pikas (Pichon et al., 2009). In the present experiment and in contrast to SMTC (Pichon et al., 2009), we observed no effect on HVR of a global NOS inhibitor (L-NAME). In fact, SMTC and L-NAME could have different time courses of response in rats, possibly because of the peripheral and central actions of NOS inhibitors (Gozal et al., 1996). The different NOS isoenzymes could act with different delays and different amounts of NO synthesis at the peripheral and central levels and lead to dichotomous responses of the peripheral disinhibition of the carotid bodies (Lahiri et al., 2006; Wang et al., 1994) and of the immediate activation and delayed inhibition of central respiratory centers (Gozal et al., 1996). However, L-NAME induced significant changes in V_t of Pikas (Table 1), suggesting an effect of NOS on the control of the ventilatory pattern, and more precisely on the V_t/f_R regulation (El Hasnaoui-Saadani et al., 2007; Patel et al., 1998; Voituron et al., 2014). Moreover, L-NAME increased the T_i/T_{tot} ratio significantly, which seems to be an invariant in Pikas during acute hypoxic challenge, probably because of the restriction of f_R under NOS inhibition.

4.5. Role of serotonin in HVR

In control conditions (vehicle), we observed the expected increase in ventilation during acute hypoxia in Pikas. However, after fluoxetine injection, we observed a decrease in \dot{V}_I and in the inspiratory drive (V_t/T_i) in hypoxia ($P_{iO_2} = 57$ mmHg), suggesting that 5-HT accumulation led to the reduction in HVR. 5-HT accumulation at the central level after few minutes of hypoxic challenge in cats has been shown to induce depression of the respiratory neurons excitability by activation of potassium channels, leading to a subsequent decrease in the phrenic nerves activity (Richter et al., 1999). This effect of 5-HT was also observed in MAOA-KO mice, in which the excess of 5-HT decreased the ventilatory responses to hypoxia (Burnet et al., 2001). However, 5-HT could also play a role at the peripheral level by increasing long-term facilitation and carotid bodies excitation (Peng et al., 2006). In our adapted animals, systemic fluoxetine injection decreased the ventilatory drive in hypoxia, suggesting that the central effect of 5-HT accumulation seems to be more potent than the peripheral effect in the acute ventilatory response to hypoxia. Again, 5-HT accumulation after fluoxetine injection had no effect on the normal ventilatory pattern in Pikas at their living simulated altitude (4100 m), suggesting that long-term ventilatory adaptation to high altitude is highly stable.

4.6. Conclusions

Basal ventilatory pattern of Pikas at their usual living altitude did not change after NMDA or non-NMDA receptors antagonists, or after NOS inhibitors or selective serotonin reuptake inhibitor, suggesting that the mechanisms of ventilatory adaptation are strongly invariant. However, whereas the inhibition of NMDA and the accumulation of serotonin seemed to limit HVR, NOS had no effect on HVR in Pikas. Inhibition of AMPA/kainate receptors, another target of glutamate, led to an increase in HVR. Therefore, glutamate, through NMDA-R/AMPA receptors bindings, and serotonin pathway, is involved in HVR in our model of mammals adapted to high altitude.

Authors' contribution

A.P.P. and N.V. provided part of the funding, designed, and performed the experiments, took blood samples, analyzed the data, and prepared the manuscript; Z.B. collected the Pikas, performed the experiment, analyzed the data, and corrected the manuscript; T.W., F.J., and D.M. performed the experiments, analyzed the data, and corrected the manuscript; and G.J. collected the Pikas and helped during experiments. The project was supported by grants received by R.-L.G. and J.-P.R., which included equipment purchase. They have also reviewed and assisted with the manuscript writing.

Acknowledgments

We want to thank the driver (Tan) for his help during the high-altitude sojourn in the Guan Jiao Shan area and Quanyu Yang and Qin Ga for operating the hypobaric chamber. This work was supported by the University Paris 13, the National Basic Research Program (No. 2012CB518200) of China, the Program of International S&T Cooperation (No. 052012GR0195) of China, and National Natural Science Foundation (No. 30393133) of China. F.J. was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The GR-Ex (ref ANR-11-LABX-0051) is funded by the program "Investissement d'avenir" of the French National Research agency (ref ANR-11-IDEX-0005-02).

References

- Bartlett Jr., D., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384–395.
- Bisgard, G.E., 2000. Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121, 237–246.
- Bisgard, G.E., Neubauer, L.A., 1995. Peripheral and central effects of hypoxia. In: Dempsey, J.A., Pack, A.I. (Eds.), *Regulation of Breathing*. Dekker, New York, pp. 617–618.
- Bonham, A.C., 1995. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir. Physiol.* 101, 219–230.
- Burnet, H., Bevenegut, M., Chakri, F., Bou-Flores, C., Coulon, P., Gaytan, S., Pasaro, R., Hilaire, G., 2001. Altered respiratory activity and respiratory regulations in adult monoamine oxidase A-deficient mice. *J. Neurosci.* 21, 5212–5221.
- Burton, M.D., Kazemi, H., 2000. Neurotransmitters in central respiratory control. *Respir. Physiol.* 122, 111–121.
- Collins, E.D., Vosburg, S.K., Ward, A.S., Haney, M., Foltin, R.W., 2006. Memantine increases cardiovascular but not behavioral effects of cocaine in methadone-maintained humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 47–55.
- Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O., 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81–87.
- Dutschmann, M., Herbert, H., 1998. NMDA and GABA_A receptors in the rat Kolliker-Fuse area control cardiorespiratory responses evoked by trigeminal ethmoidal nerve stimulation. *J. Physiol.* 510 (Pt 3), 793–804.
- El Hasnaoui-Saadani, R., Alayza, R.C., Launay, T., Pichon, A., Quidu, P., Beaudry, M., Leon-Velarde, F., Richalet, J.P., Duvallet, A., Favret, F., 2007. Brain stem NO modulates ventilatory acclimatization to hypoxia in mice. *J. Appl. Physiol.* 103, 1506–1512.
- Funk, G.D., Johnson, S.M., Smith, J.C., Dong, X.W., Lai, J., Feldman, J.L., 1997. Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. *J. Neurophysiol.* 78, 1414–1420.
- Gozal, D., Gozal, E., Simakajornboon, N., 2000. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir. Physiol.* 121, 209–221.
- Gozal, D., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Littwin, S.M., 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 81, 2068–2077.
- Greer, J.J., Smith, J.C., Feldman, J.L., 1991. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol.* 437, 727–749.
- Harris, M.B., Milsom, W.K., 2001. The influence of NMDA receptor-mediated processes on breathing pattern in ground squirrels. *Respir. Physiol.* 125, 181–197.
- Harris, M.B., Milsom, W.K., 2003. Apneusis follows disruption of NMDA-type glutamate receptors in vagotomized ground squirrels. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 134, 191–207.
- Hilaire, G., Voituron, N., Menuet, C., Ichiyama, R.M., Subramanian, H.H., Dutschmann, M., 2010. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 76–88.
- Kaufmann, P.A., Rimoldi, O., Gnechi-Ruscone, T., Bonser, R.S., Luscher, T.F., Camici, P.G., 2004. Systemic inhibition of nitric oxide synthase unmasks neural constraint of maximal myocardial blood flow in humans. *Circulation* 110, 1431–1436.
- Kopincova, J., Puzserova, A., Bernatova, I., 2012. L-NAME in the cardiovascular system—nitric oxide synthase activator? *Pharmacol. Rep.* 64, 511–520.
- Kuhnen, G., 1986. O₂ and CO₂ concentrations in burrows of euthermic and hibernating golden hamsters. *Comp. Biochem. Physiol. A* 84, 517–522.
- Lahiri, S., Roy, A., Baby, S.M., Hoshi, T., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2006. Oxygen sensing in the body. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 249–286.
- Lechner, A.J., 1976. Respiratory adaptations in burrowing pocket gophers from sea level and high altitude. *J. Appl. Physiol.* 41, 168–173.
- Mason, B., 2003. Himalayas age nine times overnight. *Nature*, <http://dx.doi.org/10.1038/news030929-6>
- Maxova, H., Vizek, M., 2001. Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiol. Res.* 50, 91–96.
- McGuire, M., Liu, C., Cao, Y., Ling, L., 2008. Formation and maintenance of ventilatory long-term facilitation require NMDA but not non-NMDA receptors in awake rats. *J. Appl. Physiol.* 105, 942–950.
- Mehta, D.C., Short, J.L., Nicolazzo, J.A., 2013. Memantine transport across the mouse blood–brain barrier is mediated by a cationic influx H⁺ antiporter. *Mol. Pharm.* 10, 4491–4498.
- Milic-Emili, J., Grunstein, M.M., 1976. Drive and timing components of ventilation. *Chest* 70, 131–133.
- Mizusawa, A., Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W., Kurosawa, H., Okabe, S., Takishima, T., Shirato, K., 1994. *In vivo* release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *J. Physiol.* 478 (Pt 1), 55–66.
- Mutolo, D., Bongianini, F., Nardone, F., Pantaleo, T., 2005. Respiratory responses evoked by blockades of ionotropic glutamate receptors within the Botzinger complex and the pre-Botzinger complex of the rabbit. *Eur. J. Neurosci.* 21, 122–134.
- Ogawa, H., Mizusawa, A., Kikuchi, Y., Hida, W., Milki, H., Shirato, K., 1995. Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rats during hypoxia. *J. Physiol.* 486 (Pt 2), 495–504.
- Ohtake, P.J., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Graff, G.R., Gozal, D., 1998. NMDA receptors mediate peripheral chemoreceptor afferent input in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 84, 853–861.
- Olson Jr., E.B., Dempsey, J.A., 1978. Rat as a model for humanlike ventilatory adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 44, 763–769.
- Pamenter, M.E., Go, A., Fu, Z., Powell, F.L., 2015. No evidence of a role for neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarius in ventilatory responses to acute or chronic hypoxia in awake rats. *J. Appl. Physiol.* 118, 750–759.
- Patel, G.M., Horstman, D.J., Adams, J.M., Rich, G.F., 1998. Nitric oxide synthase inhibitors alter ventilation in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology* 88, 1240–1248.
- Peng, Y.J., Yuan, G., Jacono, F.J., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2006. 5-HT evokes sensory long-term facilitation of rodent carotid body via activation of NADPH oxidase. *J. Physiol.* 576, 289–295.
- Pichon, A., Zhenzhong, B., Favret, F., Jin, G., Shufeng, H., Marchant, D., Richalet, J.P., Ge, R.L., 2009. Long-term ventilatory adaptation and ventilatory response to hypoxia in plateau pika (*Ochotona curzoniae*): Role of nNOS and dopamine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R978–R987.
- Powell, F.L., 2007. The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157, 154–161.
- Powell, F.L., Huey, K.A., Dwinell, M.R., 2000. Central nervous system mechanisms of ventilatory acclimatization to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121, 223–236.
- Powell, F.L., Milsom, W.K., Mitchell, G.S., 1998. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112, 123–134.
- Prabhakar, N.R., 2006. O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp. Physiol.* 91, 17–23.
- Prabhakar, N.R., Pieramici, S.F., Premkumar, D.R., Kumar, G.K., Kalaria, R.N., 1996. Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43, 341–346.
- Reid, S.G., Powell, F.L., 2005. Effects of chronic hypoxia on MK-801-induced changes in the acute hypoxic ventilatory response. *J. Appl. Physiol.* 99, 2108–2114.
- Richter, D.W., Schmidt-Garcon, P., Pierrefiche, O., Bischoff, A.M., Lalley, P.M., 1999. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J. Physiol.* 514 (Pt 2), 567–578.
- Ryan, S.V., Carrithers, S.L., Parkinson, S.J., Skurk, C., Nuss, C., Pooler, P.M., Owen, C.S., Lefer, A.M., Waldman, S.A., 1996. Hypotensive mechanisms of amifostine. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 365–373.
- Schwarzacher, S., Weidinger, F., Schemper, M., Raberger, G., 1992. Blockade of endothelium-derived relaxing factor synthesis with NG-nitro-L-arginine methyl ester leads to enhanced venous reactivity *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 229, 253–258.
- Schwenke, D.O., Pearson, J.T., Kangawa, K., Shirai, M., 2006. Does central nitric oxide chronically modulate the acute hypoxic ventilatory response in conscious rats? *Acta Physiol.* 186, 309–318.
- Scott, G.R., Milsom, W.K., 2007. Control of breathing and adaptation to high altitude in the bar-headed goose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R379–R391.
- Smeraski, C.A., Dunwiddie, T.V., Diao, L., Finger, T.E., 1999. NMDA and non-NMDA receptors mediate responses in the primary gustatory nucleus in goldfish. *Chem. Senses* 24, 37–46.
- Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R., Colquhoun, D., 1992. Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc. Biol. Sci.* 250, 271–277.
- Teppema, L.J., Dahan, A., 2010. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol. Rev.* 90, 675–754.
- Tokarev, D., Jezova, D., 1997. Effect of central administration of the non-NMDA receptor antagonist DNQX on ACTH and corticosterone release before and during immobilization stress. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 19, 323–328.
- Voituron, N., Jeton, F., Chollet, Y., Hasnaoui-Saadani, R.E., Marchant, D., Quidu, P., Favret, F., Richalet, J.P., Pichon, A., 2014. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol. Rep.* 2, e00223.
- Wagner, B.P., Stingle, R., Williams, M.A., Wilson, D.A., Traystman, R.J., Hanley, D.F., 1997. NO contributes to neurohypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon-induced hyperemia in cats. *Am. J. Physiol.* 273, H1994–H2000.
- Wang, C., Zhao, X., Liu, Z., Lippert, P.C., Graham, S.A., Coe, R.S., Yi, H., Zhu, L., Liu, S., Li, Y., 2008. Constraints on the early uplift history of the Tibetan Plateau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4987–4992.
- Wang, E., Kirby, E., Furlong, K.P., van Soest, M., Xu, G., Shi, X., Kamp, P.J.J., Hodges, K.V., 2012. Two-phase growth of high topography in eastern Tibet during the Cenozoic. *Nat. Geosci.* 5, 640–645.
- Wang, Z.Z., Stensaas, L.J., Bredt, D.S., Dinger, B., Fidone, S.J., 1994. Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body. *Neuroscience* 60, 275–286.
- Warren, J.B., 2012. Antidepressants and the developing nervous system. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73, 1–3.
- Waters, K.A., Machaalani, R., 2005. Role of NMDA receptors in development of respiratory control. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 149, 123–130.
- Whitney, G.M., Ohtake, P.J., Simakajornboon, N., Xue, Y.D., Gozal, D., 2000. AMPA glutamate receptors and respiratory control in the developing rat: anatomic and pharmacological aspects. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R520–R528.
- Zheng, Y., Riche, D., Rekling, J.C., Foutz, A.S., Denavit-Saubie, M., 1998. Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res.* 782, 113–125.
- Zhu, B., Kidd, W., Rowley, D., Currie, B., Shafique, N., 2005. Age of initiation of the India-Asia collision in the East-Central Himalaya. *J. Geol.* 113, 265–285.

Suite et à cette étude et afin de comprendre quels sont les mécanismes d'adaptation mis en place par le Plateau Pika pour survivre en haute altitude, nous avons entrepris une étude comparative de la réponse à l'hypoxie-hypercapnique entre le rat et le pika (Article 3).

C. Comparaison des stratégies ventilatoires mises en place en réponse à l'hypoxie-hypercapnique chez le rat acclimaté et le Plateau Pika (*Ochotona Curzoniae*)

Article 3 :

*Pichon A, Voituron N, Bai Z, **Jeton F**, Tana W, Marchant D, Jin G, Richalet JP, Ge RL. Comparative ventilatory strategies of acclimated rats and burrowing plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in response to hypoxic-hypercapnia. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2015 Sep;187:103-10*

L'objectif de cette étude était de comparer les différentes stratégies ventilatoires mise en place pour faire face à un environnement hypoxique-hypercapnique (stimulation mimant les conditions de vie dans les terriers) chez deux espèces : des rats, préalablement acclimatés pendant une semaine à la haute altitude, et le plateau Pika, qui vit sur les plateaux tibétains et est parfaitement adapté à la vie en haute altitude.

Cette série expérimentale a consisté à effectuer des prélèvements sanguins, pour des analyses biochimiques et des gaz du sang, ainsi que des mesures ventilatoires chez le plateau Pika et le rat dans les différentes conditions.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- **Hématocrite et concentration en hémoglobine plus faible** chez le plateau Pika
- Chez le Pika, **augmentation progressive et linéaire de la ventilation** lors de la stimulation hypoxique-hypercapnique
- **Inspiration plus longue et temps respiratoire invariant** chez le plateau Pika dans toutes les conditions
- Forte homologie de séquence du gène codant NMDA et nNOS entre le plateau Pika et le rat
- **Expression NMDA et nNOS plus élevée** dans le tronc cérébral chez le plateau Pika

Ces résultats ont permis de mettre en évidence une **adaptation du plateau Pika** qui lui permet de survivre dans les conditions de haute altitude et d'environnement spécifique aux terriers (hypoxie-hypercapnique). Pour cela, plusieurs adaptations auraient été mises en place chez le Pika, notamment une baisse d'hématocrite, déjà mise en évidence (Ge, 1998) ainsi qu'une plus grande affinité entre hémoglobine et O_2 . De plus nous avons observé chez le pika un **patron ventilatoire spécifique** avec une augmentation du V_T (Pichon, 2009) ainsi qu'un ratio Ti/T_{tot} plus faible et un ratio V_T/Ti plus grand ce qui permettrait une meilleure ventilation alvéolaire ainsi qu'une meilleure diffusion des gaz au niveau pulmonaire. Ces adaptations passeraient également par une modification au sein du réseau respiratoire bulbaire, via une plus grande expression du récepteur NMDA et du nNOS. *In fine*, ces modifications participeraient au maintien d'une meilleure oxygénation sanguine malgré une forte concentration en CO_2 dans les terriers et ce à haute altitude.



Comparative ventilatory strategies of acclimated rats and burrowing plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in response to hypoxic–hypercapnia[☆]



Aurélien Pichon^{a,b,*}, Nicolas Voituron^{a,b,2}, Zhenzhong Bai^c, Florine Jeton^{a,b}, Wuren Tana^c, Dominique Marchant^a, Guoen Jin^c, Jean-Paul Richalet^{a,b}, Ri-Li Ge^{c,**}

^a Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratory "Hypoxia & Lung" EA2363, Bobigny, France

^b Laboratory of Excellence GR-Ex, France

^c Qinghai University Medical College, Research Centre for High Altitude Medicine, Xining, Qinghai, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2014

Received in revised form 16 April 2015

Accepted 7 May 2015

Available online 16 May 2015

Keywords:

Hypoxia

Hypercapnia

Ventilation

Adaptation

Burrow

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the different ventilatory strategies that help in coping with hypoxic–hypercapnia environment among two species: use acclimated rats and plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) that live in Tibetan plateaus, and have been well adjusted to high altitude. Arterial blood samples taken at 4100 m of elevation in acclimatized rats and adapted pikas revealed inter-species differences with lower hemoglobin and hematocrit and higher blood pH in pikas. A linear and significant increase in minute ventilation was observed in pikas, which help them to cope with hypoxic–hypercapnia. Pikas also displayed a high inspiratory drive and an invariant respiratory timing regardless of the conditions. Biochemical analysis revealed that N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) receptor gene and nNOS gene are highly conserved between rats and pikas, however pikas have higher expression of NMDA receptors and nNOS compared to rats at the brainstem level. Taken together, these results suggest that pikas have developed a specific ventilatory pattern supported by a modification of the NMDA/NO ventilatory central pathways to survive in extreme conditions imposed on the Tibetan plateaus. These physiological adaptive strategies help in maintaining a better blood oxygenation despite high CO₂ concentration in burrows at high altitude.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is well established that chronic exposure to hypoxic–hypercapnia, such as conditions encountered in burrows, have led to adaptive changes in the ventilation and ventilatory response to hypoxia and/or hypercapnia in mammals (Dempsey and Forster, 1982). Atmospheric dry air contains 20.93% oxygen (O₂) and 0.039% carbon dioxide (CO₂) outside the burrows. In burrows, air movement is reduced, thus the ventilation of burrowing animals leads to a depletion of oxygen well below what is observed outside burrows and to increased level of CO₂. Indeed, in burrows the O₂ concentration may vary from 17% to 10%

while CO₂ concentration can rise from 3% to as high as 10% (Williams and Rausch, 1973; Lechner, 1976; Boggs et al., 1984; Kuhnen, 1986). Burrowing animals such as mole rats, hamsters, squirrels or woodchucks exhibit a small or blunted ventilatory response to hypoxia and/or hypercapnia (Arieli and Ar, 1979; Walker et al., 1985; Boggs and Birchard, 1989; Barros et al., 2001). These respiratory adaptations preserve energy and facilitate survival in extreme conditions that are present in the burrows. In the spiny rat (*Clyomys bishopi*), that lives at low altitude in a tropical forest of Brazil (Barros et al., 2004), the effect of hypoxic–hypercapnia is the addition of the independent effects of hypoxia and hypercapnia. Indeed, the ventilatory response showed an initial hyperventilation that could be linked to both hypoxic and hypercapnic stimuli followed by a relative ventilatory roll off that could be due both to inhibition of hypoxic ventilatory drive and hypoxia-induced hypometabolism (Barros et al., 2004). In addition, the hypoxic conditions encountered in burrows worsen at high altitude because of a marked decrease in O₂ partial pressure.

The plateau pika or black-lipped pika (*Ochotona curzoniae*) is a small diurnal and non-hibernating lagomorph endemic to alpine meadows of the Qinghai–Tibetan plateau (People's Republic of China) living between 3200 and 5300 m above sea level, in an area of extreme cold (down to –40 °C annual minimum temperature) and dry climate conditions (Manabe and Broccoli, 1990; Yang et al., 2014). Some pika

[☆] Authorship: AP & NV provided part of the funding, designed and performed the experiments, analyzed the data and prepared the manuscript; FJ, WT & DM analyzed the data and corrected the manuscript; ZB collected the pikas, analyzed the data and assisted in the manuscript preparation; GJ collected the pikas and help during experiments. The project was supported by grants received by RLG & JPR which included equipment purchase. They have also reviewed and assisted with the manuscript writing.

* Corresponding author at: Laboratory "Hypoxia & Lung" EA2363, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY Cedex, France.

** Corresponding author.

E-mail address: aurelien.pichon@orange.fr (A. Pichon).

¹ Present address: Laboratory MOVE (EA 6314), University of Poitiers, 4 Allée Jean Monnet, 86000 Poitiers, France.

² AP and NV equally contributed to this work.

fossil samples found on the north edge of the Qinghai–Tibetan plateau are around 37 million years old (Heath and Williams, 1981) and those found in Tibetan plateaus are up to 20 to 30 millions years old (Mason, 2003; Zhu et al., 2005; Wang et al., 2008, 2012) suggesting that this species is well adapted to high altitude (Ge et al., 1998). Plateau pikas present an adapted strategy to cope with the cold and hypoxic (partial pressure of inspired O₂, P_iO₂ 86 mm Hg, 4100 m) environment. Indeed, plateau pikas exhibit high resting metabolic rate, non-shivering thermogenesis, low pulmonary arterial pressure and high rate of O₂ utilization (Du and Li, 1982; Boggs et al., 1984; Du et al., 1984; Ge et al., 1998; Li et al., 2001; Sheafor, 2003). The Tibetan plateau pikas live in family groups within interconnected underground burrow system in the alpine meadows of the Tibetan plateau. These living conditions represent both hypoxic and hypercapnic environments (Kuhnen, 1986). This lifestyle led to particular cardio-respiratory adaptation with a better ventilation efficiency and a greater cardiac output to improve oxygen transport as compared to moderately acclimated animals (Pichon et al., 2009, 2013). However, to our knowledge, no study has concerned the analysis of breathing regulation during hypoxic–hypercapnia exposure in plateau pikas.

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-Rs) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) pathway are involved in the ventilatory response to hypoxia. Indeed, NMDA-Rs are crucial for the hypoxic ventilatory response and ventilatory acclimatization to hypoxia (Mizusawa et al., 1994; El Hasnaoui-Saadani et al., 2007; Voituron et al., 2014). Previous studies suggest an important role of NMDA-R in case of hypoxic–hypercapnia exposure in piglets (Machaalani and Waters, 2002; Fanous et al., 2006). Moreover, nNOS mechanisms could contribute to peripheral chemoreception and decrease the sensitivity to severe acute hypoxia in plateau pikas (Pichon et al., 2009).

The objective of the present study was to validate the hypothesis that plateau pikas have developed some ventilatory adaptive strategies to its fossorial lifestyle at high altitude. We also hypothesized that the nitric oxide (NO) central pathway, through the NMDA-R1 subunit, plays a role in these adaptive strategies. We compared plateau pikas, living at an altitude of 4100 m, to a more common species living at lower altitudes (Sprague Dawley rats) moderately acclimated to hypoxia.

2. Material and methods

2.1. Ethical considerations

Work was carried out under permit from Qinghai University ethics committee (agreement number QHU-RCHAMD-2013-04-441 for Research Center for High Altitude Medicine, Xining) and under the Guiding Principles in the Care and Use of Animals (Institute for Laboratory Animal Research, 2011). Wild pikas (n = 15), weighing 153 ± 24 g, were captured at an altitude between 4050 and 4150 m using traps in the Tianjun private area of Haixi Mongol and Tibetan Autonomous Prefecture on the Qinghai–Tibetan Plateau. The owners of the capture zone had given permission to capture a maximum of 50 pikas for scientific purposes.

2.2. Experimental animals

After being captured, pikas were transported from the Tianjun private area (4100 m P_iO₂–86 mm Hg, partial pressure of inspired CO₂ (P_iCO₂)–0.15 mmHg) to Xining (2262 m P_iO₂ = 111 mm Hg, Qinghai Province, People's Republic of China) by car and were maintained between 10 °C and 15 °C. The animals had food and water available ad libitum during the travel and each cage contained 1 animal. The experiments were carried out in a hypobaric chamber within the 2 days following capture simulating an altitude of 4100 m. The hypobaric chamber (Model: DYC-3000, FENGLEI, CHINA) dimensions were 3.3 m × 2 m × 17 m and depression was created by 2 water pumps and one air-proof pump (possible ascent speed of 15 m/s). We

compared male plateau pikas to male Wistar rats (n = 13). The rats were obtained from crossing animals from Lanzhou University Medical School Animal Center. The rats (weighing 304 ± 30 g) were born and raised at Xining and used in this experiment at two months of age. For seven days prior to the experiment the rats were placed in the simulated hypobaric chamber (4100 m) to acclimate them to high altitude. Then the animals (pikas and rats) were divided in 2 groups. The first group was used for plethysmography and biochemical analysis of blood gas parameters and the second group was used for the biological analysis performed on the brain.

2.3. Biochemical analysis of blood gas parameters

After application of anesthesia (xylazine 10 mg·kg⁻¹ + ketamine 50 mg·kg⁻¹ intra-peritoneal), arterial blood samples from rats and pikas were collected from the group used for the measurement of ventilation at 4100 m (n = 4 in each group). Arterial blood samples were quickly collected via left heart puncture (verified after post-mortem examination) with a heparinized syringe and analyzed using an automated blood gas analyzer (i-STAT Portable Clinical Analyzer and CHIPS i-STAT EG7, Abbott, USA) to obtain values of hemoglobin concentration (g·dl⁻¹), hematocrit (%), oxygen saturation (SaO₂, %), partial pressure of O₂ and CO₂ (PaO₂, mm Hg and PaCO₂, mm Hg), blood pH and bicarbonate concentration (HCO₃⁻, mmol·l⁻¹). Most values obtained by the i-STAT system were measured directly (ex: pH, PCO₂). PO₂ and PCO₂ values were corrected for the real temperature (T_p) of each animal according to the following formulas: PO₂(T_p) = PO₂ × 10 ^{$\frac{5.49 \times 10^{-11} \text{PO}_2^{3.88} + 0.071}{9.72 \times 10^{-9} \text{PO}_2^{3.88} + 2.30} (T_p - 37)$} and PCO₂(T_p) = PCO₂ × 10^{0.019(T_p-37)}. The device calculated other data as hemoglobin concentration, HCO₃⁻ and SaO₂. However, as automated blood gas analyzers can induce substantial bias for PaO₂ and HCO₃⁻ values due to inappropriate blood temperature corrections or differences in hematocrit values these results should be used with caution (Bleul and Gotz, 2014; Malte et al., 2014). Nevertheless, our blood gas analyzer was calibrated regularly to ensure continuously high levels of reliability and accuracy.

2.4. Whole body plethysmography

Ventilation was measured in non-anesthetized and unrestrained animals (7 rats and 9 pikas) using a whole body plethysmography approach with one-liter experimental chambers ventilated with air (3.0 l·min⁻¹) (Pichon et al., 2009). Briefly, measurement of respiratory parameters was performed using an adaptation of the technique developed by Drorbaugh and Fenn (1955) and modified by Bartlett and Tenney (1970). We used a recording chamber equipped with a temperature probe. This one was connected to a differential pressure transducer that measured pressure fluctuations within the closed chamber and compared that to a reference chamber of the same volume. Ventilation was measured with differential pressure transducer (Biopac TSD 160A), amplified using Biopac DA100c and then recorded (Biopac MP150, BIOPAC System Inc., Santa Barbara, California, USA). A calibrating syringe was connected to the system. Calibrations were recorded at the end of each recording session by injecting a volume of air in the recording chamber. During each recording session, the chamber was hermetically sealed and temperature was continuously recorded and maintained around 21 °C. Rectal temperatures of the animals were recorded before and after each experiment in order to assure that there is no change in body temperature. As the measurements were conducted in the hypobaric chamber, temperature and humidity were maintained constant at 21 °C and 45% of relative humidity.

To reduce stress, each animal (n = 7 rats and n = 9 pikas) was habituated in the chamber for at least 30 min prior to each measurement. Only periods of breathing were analyzed when the animals were in a stationary condition. We measured the mean respiratory frequency (f_R in breath·min⁻¹), tidal volume normalized by body

weight (V_T , $\mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$), minute ventilation normalized by body weight (V_E , $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, with $V_E = f_R \times V_T/1000$), the inspiratory time (T_i), the total time of the respiratory cycle (T_{tot}), and the irregularity score (IS, variability in duration of respiratory cycles (Viemari et al., 2005; Voituron et al., 2009)). The absolute values of V_T was calculated using the formula derived from the Drorbaugh and Fenn (1955) equation that takes into account the difference between the body temperature of the animal and the recording chamber temperature and the calibration. For V_T measurements, volume calibrations were performed by injecting a known volume of air in recording chambers (500 μl). IS was defined for each respiratory cycle by applying the formula for consecutive respiratory cycle period values, $100 \times \text{ABS}(P_n \times P_{n-1})/P_n^{-1}$, with P being the period (T_{tot}) of the n th respiratory cycle. The T_i/T_{tot} and V_T/T_i ratios were determined in order measure the respiratory timing and an index of inspiratory drive respectively (Milic-Emili and Grunstein, 1976). To assess ventilatory responses to hypoxic–hypercapnia, air was replaced by a gas mixture of 16% O_2 , 5% CO_2 and balanced N_2 (P_{O_2} –66 mm Hg, P_{CO_2} –23 mm Hg) for a short period of time (5 min). The ventilatory parameters were analyzed at 2 and 5 min after the onset of exposure to the hypoxic–hypercapnia conditions.

2.5. Protein and mRNA measurements

Animals from the second group ($n = 6$ rats and $n = 6$ pikas) were anesthetized by intra-peritoneal injection of xylazine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and ketamine ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and were then sacrificed by cervical dislocation. Animals were then decapitated, the brain was rapidly removed and the medulla were quickly dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C , until further use either to quantify protein ($n = 6$ for each group and each protein) or perform PCR analyses. The medulla sample was obtained after a caudal cut above the first cervical spinal roots and a rostral cut at the level of the VIII cranial nerve exit points. All procedures were done on ice to avoid protein degradation.

2.5.1. nNOS and NMDA-NR1 Western blot analysis

To compare nNOS and NMDA-R1 protein expression between different groups, equal amounts of protein (40 μg assessed by bicinchoninic acid (BCA) assay) from animals of the same species were loaded on the same gel, and Western blotting was carried out as described below. Experiments were performed using the medulla of plateau pika or rats. Samples were weighed and homogenized at low speed on ice-cold RIPA protein lysis buffer (100 mg tissue was homogenized using 1 ml of extraction buffer). Homogenates were then directly centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C for nNOS and for 50 min at 12,000 rpm at 4°C for NMDA-R1 after the incubation of homogenates at 37°C for 30 min to solubilize and denature the NMDA receptor complexes. Then supernatants for nNOS quantification were directly stored at -80°C until further use; supernatants of NMDA-R1 were diluted using equal volume of extraction buffer containing 0.1% Triton X-100. Protein concentrations in the supernatant were determined by Thermo Pierce protein assay (USA) using BSA as standard.

Proteins (15 μg for nNOS and 20 μg for NMDA-NR1) were separated by electrophoresis using 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes (Millipore, USA). Membranes were incubated at room temperature for 2 h in 5% non-fat milk powder with Tris-buffered saline–0.5% Tween 20 (TBS–T) to block non-specific binding. Membranes were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against nNOS (Abcam, UK) or NMDA-R1 (Abcam, UK). Antibodies for nNOS were diluted 1:1500 and antibodies for NMDA-NR1 were diluted 1:500 using 1% BSA/TBS–T. Membranes were washed using TBS–T and incubated for 2 h at room temperature in 1:3000 anti-rabbit IgG antibody-horseradish peroxidase conjugate (Santa Cruz Biotechnology). Anti-rabbit IgG was also diluted in 1% BSA/TBS–T. Immunodetection was accomplished using ECL Western blotting kit detection (Pierce, Thermo USA). Anti-GAPDH (Sigma, USA) was used as a loading control. Bio-Rad (USA) Gel-DOX XR with Image Lab

software was used to perform densitometric scanning to attain protein quantification per sample. The density of each sample was reported to the density of the corresponding GAPDH sample. Data were then expressed as the ratio of the control and experimental density to that of the GAPDH density.

2.5.2. Real-time PCR assay

To assess the differences between the relative gene expressions we extracted total RNA from brainstem tissues of pikas ($n = 6$) and rats ($n = 6$) using Trizol reagent (Life tech. USA). 5 μg of total RNA was used to synthesize cDNA using the RT2 first strand cDNA synthesis kit (Qiagen USA). Real time RT-PCR was performed on ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen USA). For accurate and reliable gene expression analysis, quantitative RT-PCR was performed using Qiagen Primer Assays, which were specifically designed and experimentally verified. The Primers are the following: nNOS (QT00186340), NMDA-NR1 (QT00182287) and 18 s rRNA (QT00199374). PCR reactions (25 μl reaction volume) were performed at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s for 40 cycles. 18 s ribosome RNA (18 s rRNA) was used as an internal standard to normalize mRNA levels for differences in sample concentration and loading. Fold changes in the expression of each target mRNA relative to 18 s rRNA were calculated based on the threshold cycle (Ct) as $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}[1, 2]}$, where $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{target}) - \text{Ct}(18 \text{ s rRNA})$ and $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{pika}) - \Delta\text{Ct}(\text{rat})$. Quantitative PCRs were performed in triplicates. The REST2009 software (Qiagen USA) was used to analyze real-time PCR results.

The sequencing of PCR products showed that amplicons are 100% homologous between rat and pika for the NMDA receptor gene, and 99% homologous for the nNOS gene (1 mismatch far from end of the primer) (Fig. 1).

2.6. Statistical analysis

Values are presented as mean \pm standard deviation (SD). For all statistics, differences were considered significant when $p < 0.05$. The normality of distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Comparison of the blood-gas parameters was assessed by Student's unpaired 't' test. The effects of hypoxic–hypercapnia on each ventilatory parameter were assessed by two-way ANOVAs for rats and pikas as independent factor and time as dependent factor. Newman–Keuls test was used for post-hoc test. All statistical analyses were done using the Statistica software (StatSoft, Inc, Tulsa, USA).

3. Results

3.1. Biochemical analysis of blood-gas parameters

Arterial blood samples taken at simulated altitude (4100 m) in moderately acclimated rats and adapted pikas revealed inter-species differences (Table 1). The arterial PaO_2 , PaCO_2 and SaO_2 were not significantly different in both species. Hemoglobin concentration and hematocrit were lower in pikas compared to rats. Blood pH was higher in pikas compared to rats, while bicarbonate values of pikas were not different from rats.

3.2. Comparison between rats and pikas in normoxic–normocapnia conditions

In normoxic–normocapnia conditions (control conditions), f_R , V_T and V_E values were higher in pikas than in rats (Table 2). The irregularity score (IS, Table 2), which was not different between rats and pikas, was low in the two species meaning that ventilation was regular and stable. T_i/T_{tot} ratio was lower in pikas compared to rats indicating that duration of inspiration was shorter in pikas. V_T/T_i ratio was higher in pikas than in rats, suggesting that inspiratory drive was larger in

Rattus norvegicus nitric oxide synthase 1, neuronal (Nos1), mRNA

Sequence ID: [ref|NM_052799.1](#) Length: 4592 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
185 bits(100)	6e-44	102/103(99%)	0/103(0%)	Plus/Plus
Pika 1	GAATACAGGCTGACGATGTCTCCCTGCTTCGTGAGAGGTGCCCTAGCTTCCACCTGC	60		
Rat 3853	GAATACAGGCTGACGATGTCTCCCTGCTTCGTGAGAGGTGCCCTAGCTTCCACCTGC	3912		
Pika 61	CTCGAAACCCAGGTGCCTTGCATCCTGGTTGGCCAGGCAC	103		
Rat 3913	CTCGAAACCCAGGTGCCTTGCATCCTGGTTGGCCAGGCAC	3955		

Rattus norvegicus glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Grin1), transcript variant 1, mRNA

Sequence ID: [ref|NM_001270602.1](#) Length: 4343 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
183 bits(99)	2e-43	99/99(100%)	0/99(0%)	Plus/Plus
Pika 1	GGAGTGACTGGCCGTGTGGAATTCATGAGGATGGGGACCGGAAGTTTGCCAACTATAGT	60		
Rat 1384	GGAGTGACTGGCCGTGTGGAATTCATGAGGATGGGGACCGGAAGTTTGCCAACTATAGT	1443		
Pika 61	ATCATGAACCTGCAGAACCACAAGCTGGTCAAGTGGGC	99		
Rat 1444	ATCATGAACCTGCAGAACCACAAGCTGGTCAAGTGGGC	1482		

Fig. 1. Alignment of the gene sequences of NMDA-receptor and nNOS. Comparing the sequencing of the PCR product shows that amplicons are 100% homologous between rat and pika for NMDA receptor and 99% homologous for nNOS (1 mismatch far from end of the primer).

pikas. Rectal temperature was higher in pikas than in rats in normoxic–normocapnia conditions.

3.3. Effect of acute exposure to hypoxic–hypercapnia

In pikas, hypoxic–hypercapnia exposure led to progressive and significant increase in V_E at 2 and 5 min after the onset of exposure. These increases were due to an increase in f_R and V_T early during hypoxic–hypercapnic stimulation (Table 2). On the other hand, rats did not change their V_E in these conditions. The variability of breathing tended to decrease in rats after exposure to the stimulus whereas IS did not change in pikas. The respiratory timing decreased in rats during hypoxic–hypercapnia exposure, whereas it remained unchanged in pikas. The index of inspiratory drive increased in rats and pikas during hypoxic–hypercapnic challenges (Fig. 2). There was no modification of rectal temperature 5 min after the onset of stimulation and body temperature remained higher in pikas compared to rats after the hypoxic–hypercapnia challenge.

3.4. Protein and mRNA measurements

Expressions of NMDA-NR1 and nNOS genes were 5-fold and 13-fold up regulated in pikas when compared to rats ($p < 0.05$). Pikas also

displayed a higher protein expression of nNOS and NMDA-NR1 in medulla when compared to control rats ($p < 0.03$) (Fig. 3).

4. Discussion

The present results suggest that pikas increase their ventilation when they are exposed to hypoxic–hypercapnia, whereas acclimated rats do not. Moreover, pikas displayed a high inspiratory drive and a constant respiratory timing probably due to an increase in tidal volume that could lead to an improvement in alveolar ventilation and alveolar diffusion. These differences could be attributed to their frequent exposure to hypoxic–hypercapnia in burrows and/or their long-term adaptation to high altitude on Tibetan plateaus.

4.1. Methodological considerations

It would have been better to compare the ventilatory response to hypoxic–hypercapnia in non-acclimatized pikas, but these animals inhabit areas from 3200 to 5300 m above sea level (Qu et al., 2013). In this study we compared a highland burrowing lagomorph and a lowland domestic rodent to highlight the differences in the physiological adaptive strategies. However, we cannot exclude that the observed difference could be due to physiological variation between distantly related species (lagomorph versus rodent) or wild versus domesticated animals. Pikas were born and raised at their native elevation in the wild, whereas rats were born at lower altitude (Xining, 2262 m) in laboratory condition for research purposes and only acclimated for one week. Therefore, pikas used in this study were likely exposed to developmental hypoxia (and possibly hypercapnia), which is not the case for rats. This difference in earlier environmental exposure could influence hypoxic–hypercapnia response in adult animals (Peyronnet et al., 2007; Bavis and Mitchell, 2008; Julien et al., 2008; Ferner and Mortola, 2009) due to the effect of developmental hypoxia on the respiratory and metabolic control systems. Rats were held in the hypobaric chamber for only 7 days before experiments, which is not a sufficient period of time for full acclimation. Differences observed may partially result from phenotypic plasticity, and not genetic differences between species.

Table 1

Biochemical analysis of blood-gas parameters in moderately acclimatized rats and pikas at 4100 m (P_iO_2 86 mm Hg).

	Rats (n = 4)	Pikas (n = 4)
Hemoglobin ($g \cdot dl^{-1}$)	18.5 ± 1.4	13.9 ± 2.3 ^a
Hematocrit (%)	54.0 ± 4.5	41.0 ± 6.7 ^a
SaO ₂ (%)	78.0 ± 7.0	87.7 ± 4.5
PaO ₂ (mm Hg)	36.2 ± 3.6	45.4 ± 5.6
PaCO ₂ (mm Hg)	27.5 ± 4.9	31.4 ± 9.3
pH	7.31 ± 0.11	7.61 ± 0.14 ^a
HCO ₃ ⁻ ($mmol \cdot l^{-1}$)	21.5 ± 3.4	24.3 ± 3.1

^a Indicates significant differences between rats and pikas.

Table 2
Ventilatory response to hypoxic–hypercapnia in moderately acclimatized rats and pikas at 4100 m (P_iO₂ 86 mm Hg).

	Rats (n = 7)			Pikas (n = 9)		
	Control	Hypoxic–hypercapnia		Control	Hypoxic–hypercapnia	
		2 min	5 min		2 min	5 min
\dot{V}_R (c·min ⁻¹)	138 ± 15	155 ± 13	156 ± 16	165 ± 33#	187 ± 42*#	195 ± 42*#
\dot{V}_T (μl·g ⁻¹)	11.41 ± 2.85	14.65 ± 2.21	13.77 ± 1.25	14.38 ± 2.64 #	18.65 ± 3.93*#	19.90 ± 4.30*#
\dot{V}_E (ml·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	1.57 ± 0.43	2.26 ± 0.27	2.14 ± 0.32	2.36 ± 0.61 #	3.60 ± 1.46*#	3.95 ± 1.51*#
Ti/Ttot	0.62 ± 0.04	0.56 ± 0.03*	0.55 ± 0.02*	0.55 ± 0.01#	0.55 ± 0.03	0.56 ± 0.03
\dot{V}_T/Ti (μl·g ⁻¹ ·s ⁻¹)	42.43 ± 12.83	67.12 ± 7.01*	64.82 ± 8.48*	71.10 ± 19.11#	107.23 ± 40.14*#	116.88 ± 39.48*#
IS	4.62 ± 2.58	4.24 ± 1.86	2.95 ± 0.94	6.41 ± 1.75	5.6 ± 1.83	6.16 ± 1.67#

Values are presented as mean ± SD. * indicates significant differences between control and hypoxic–hypercapnia at 2 and 5 min. # indicates significant differences between rats and pikas.

Moreover, we cannot rule out a different hypo-metabolic response to hypoxic–hypercapnia in pikas as compared to rats that could have overcompensated their ventilatory response. Indeed, it is possible that pikas slow down metabolism less than rats in hypoxic–hypercapnia,

and have higher ventilation as a result. However, rectal temperature was not significantly decreased during the 5-min exposure to hypoxic–hypercapnia in rats or pikas. Some authors have also observed a high resting metabolic rate and a high rate of O₂ utilization in pikas (Du and Li, 1982; Du et al., 1984; Ge et al., 1998; Li et al., 2001; Sheafor, 2003). These results were partially confirmed by the higher body temperature observed in pikas than in rats at baseline.

4.2. Comparison of blood gas parameters

A previous study showed that hemoglobin and hematocrit were significantly lower in pikas (Ge et al., 1998). This phenomenon is probably a genetic adaptation linked to the better HVR and O₂ affinity that would help to maintain oxygen transport despite low hematocrit. Furthermore, oxygen transport to and oxygen extraction by active cells could be promoted by smaller erythrocytes and larger tissue capillaries bed, mitochondrial density, and concentration of myoglobin (Beall and Reichsman, 1984; Beall et al., 1998; Li et al., 2013). Indeed, for mammals, living in high altitude underground burrows, efficient gas transport is a challenge due to the chronic hypoxic–hypercapnia conditions (Boggs et al., 1984). In mammals genetically adapted to life in high altitude and/or in underground burrows, an elevated blood O₂ affinity was observed to compensate the low O₂ pressure in air (Turek et al., 1973; Eaton, 1974; Eaton et al., 1974). Otherwise, pikas 2,3-DPG was lower compared to the one observed in rats (Ge et al., 1998), which probably contributes to a higher affinity of hemoglobin for O₂ in pikas. Indeed, it was previously shown that the oxygen–hemoglobin dissociation curve of plateau pikas was shifted to the left in favor of arterial oxygen saturation (Gu et al., 1991) and that pika hemoglobin alpha and beta chains present some significant alterations (Yingzhong et al., 2007).

Blood gas analysis revealed no significant PaO₂ difference between rats and pikas despite a tendency for higher values in pikas. This result is not totally consistent with a previous study (Ge et al., 1998) in which a significantly higher PaO₂ was observed in pikas as compared to rats. However these results were obtained in anesthetized animals and at a higher altitude (5000 m). Furthermore, the anesthesia with xylazine/ketamine used in this experiment could slightly depress ventilation (Wixson et al., 1987; Sumitra et al., 2004) and could explain the differences observed. Moreover, chronic exposure of rats to hypoxia in the hypobaric chamber during 7 days led to an increase in ventilation (Schmitt et al., 1994; Powell et al., 1998) and red blood cell production (Knaupp et al., 1992; Schobersberger et al., 2005) allowing an oxygenation close to normoxic levels. Thanks to these mechanisms, O₂ delivery to the tissues is globally conserved, in spite of chronic hypoxia. Pika arterial blood pH was higher in pikas when compared to rats. This is consistent with a tendency to higher minute ventilation in pikas (Table 2). Blood pH of rats is in the low range of normality and is close to acidosis. Previous study from our laboratory reported that rats at 5000 m have a blood pH of 7.45 ± 0.06 (Ge et al., 1998). In rats exposed for 14 days of chronic hypoxia, another study found a pH of 7.43 ± 0.09

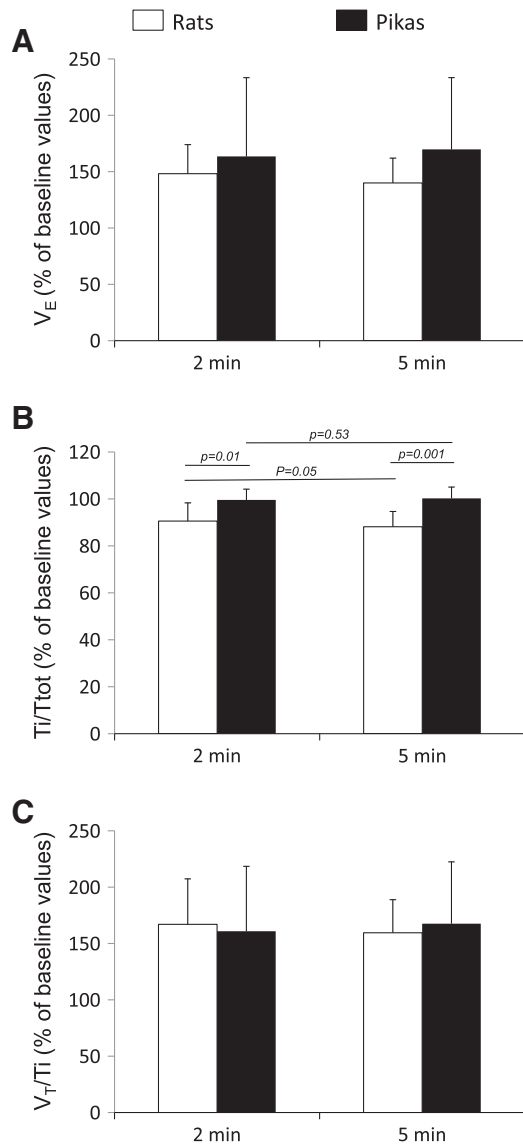


Fig. 2. Percentage of change (%) from baseline in minute ventilation (A), Ti/Ttot ratio (B) and \dot{V}_T/Ti ratio (C) 2 and 5 min after the onset of hypoxic–hypercapnia exposure in rats (white bars) and pika (black bars). Ti/Ttot and \dot{V}_T/Ti ratios were determined in order to have a measure of respiratory timing and an index of inspiratory drive respectively (Milic-Emili and Grunstein, 1976). Values are means ± SD.

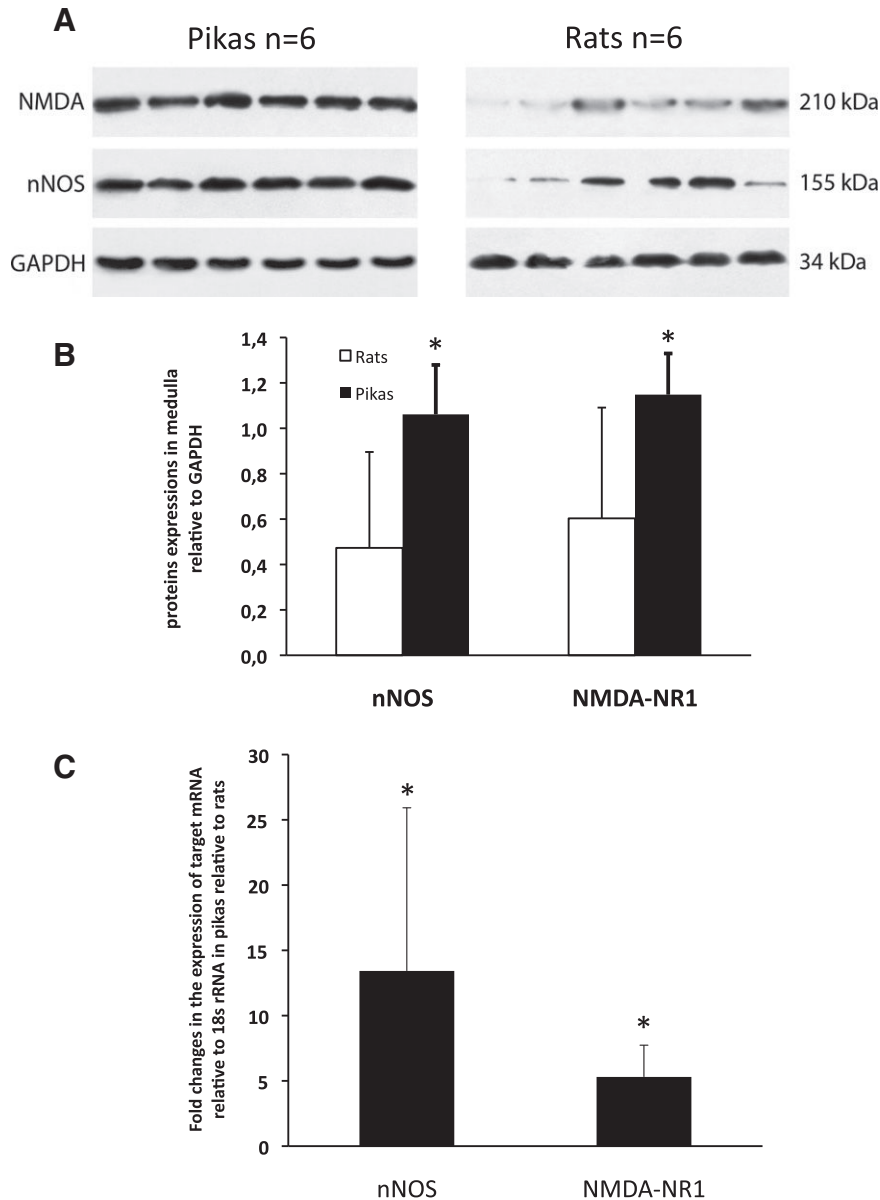


Fig. 3. Western blot analyses (Panel A) and their quantifications (Panel B) for neuronal NO synthase (nNOS) and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-NR1) relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins in animals samples taken at simulated altitude of 4100 m. Results of real time PCR analyses (Panel C) were presented as fold changes in the expression of each target mRNA (nNOS and NMDA-NR1) relative to 18s ribosomal RNA (18 sRNA) and with expression in rats as reference. *, $p < 0.05$ as compared to rats.

(Olson and Dempsey, 1978). Therefore, our experimental rats cannot really be considered as very acidotic. Furthermore, when acidosis develops, compensatory mechanisms such as hyperventilation take place, which were not observed in our rats. Finally, acute stress could lead to hyperventilation (Ohata et al., 1981) responsible for a decrease in PCO_2 and a consequent increase in pH.

4.3. Comparison of ventilatory parameters at 4100 m

Previous studies showed that pikas (*O. curzoniae*) have better ventilatory acclimatization to hypoxia than non-acclimatized animals (Pichon et al., 2009) probably due to the optimization of their ventilatory pattern. Indeed, plateau pikas have developed specific adaptations with changes in ventilatory pattern compared to low altitude or high altitude acclimated animals, even if the ventilatory response to hypoxia was not statistically different between pikas and rats. These adaptations are mainly due to an increase in V_T and T_i in pikas leading to a better

ventilatory efficiency (Pichon et al., 2009). Following chronic hypoxia exposure, rats developed higher ventilatory parameters compared to those observed at sea level or without acclimation at moderate altitude (Pichon et al., 2009). Therefore the level of ventilation observed in this study at baseline in rats suggests a development of ventilatory acclimatization to hypoxia. Moreover, acclimation to hypoxia in rats is known to be significant after 4 days of chronic hypoxia and to be maximal after 10 days (Schmitt et al., 1994). At their living altitude, pikas showed better ventilation compared to moderately acclimatized rats. Moreover, the inspiratory drive, as given by the V_T/T_i ratio, was significantly higher in pikas compared to rats. As previously observed (Pichon et al., 2009), T_i/T_{tot} ratio was lower in pikas than in rats at 4100 m altitude. The lower T_i/T_{tot} ratio and the larger V_T/T_i in pikas illustrate an improvement of the ventilatory pattern that could allow a better alveolar ventilation and lung diffusion during hypoxic exposure in this adapted mammal independently of body size and species (Milic-Emili and Grunstein, 1976).

4.4. Comparative ventilatory response to cope with hypoxic–hypercapnia

During exposure to the hypoxic–hypercapnic gas mixture, rats did not change their minute ventilation. This phenomenon could be due to the ventilatory acclimation to hypoxia observed in rats that could mask the hypercapnic response. Indeed, chronic hypoxia could modify the peripheral and/or central sensitivity threshold to O₂ and/or CO₂. On the other hand, Webb and Milsom (1994) showed that an acute hypoxic–hypercapnia challenge did not significantly modify the ventilatory parameters in golden-mated ground squirrels (*Spermophilus lateralis*).

Conversely, plateau pikas increased their ventilation (around 52% at 2 min and 67% at 5 min) to cope with hypoxic–hypercapnia. This significant and linear increase is different from what is classically observed in other burrowing species living at low altitude. Indeed, contrary to fossorial spiny rats (*C. bishopi*) that live in the tropical forest of Brazil (Barros et al., 2004), we did not observe any biphasic ventilatory response when pikas were exposed to hypoxic–hypercapnia. This could be due to the short time of the measurement under hypoxic–hypercapnia as this biphasic response is generally observed after 5 to 10 min of exposure (Powell et al., 1998). In spiny rats, the effects of hypoxic–hypercapnia are manifested separately with ventilatory responses mimicking hypercapnic patterns while metabolic responses mimic hypoxic patterns (Barros et al., 2004). This result suggests that only hypercapnic drive was involved in the ventilatory response to hypoxic–hypercapnia in pikas. These differences may be attributed to different living conditions of these animals. Indeed, the fossorial spiny rats live in low altitude whereas pikas live in the alpine meadows of the Tibetan Plateau, suggesting a potential difference in ventilatory strategies to cope with hypoxic–hypercapnia. On the other hand, the increase of over 50% of minute ventilation in pikas was different from other burrow dwellers, such as mole rats, hamsters, squirrels or woodchucks that exhibit a small or blunted ventilatory response to hypoxia or hypercapnia (Arieli and Ar, 1979; Walker et al., 1985; Boggs and Birchard, 1989; Barros et al., 2001). The threshold of detection for O₂ and CO₂ in the peripheral and central chemoreceptors could be different between these species and could suggest that pikas would be less sensitive to changes in O₂ compared to other lowland native species. Therefore, hypercapnic stimulation would be the main stimulus in the pikas' ventilatory response to hypoxic–hypercapnia. It could also be possible that plateau pikas have a lower depression of their metabolism during hypoxia and maintain a higher level of ventilation during hypoxic–hypercapnia challenges. Moreover, pikas displayed no change in Ti/Ttot ratio during exposure to hypoxic–hypercapnia conditions, as observed during a single hypoxic challenge (Pichon et al., 2009). It seems that Ti/Ttot is an invariant in pikas even at 4100 m in atmospheric conditions. However, the inspiratory drive is increased in the same proportion in rats and in pikas during hypoxic–hypercapnia conditions as already shown in hypoxia only (Pichon et al., 2009).

4.5. Role of NMDA and nNOS in ventilatory response to hypoxic–hypercapnia

Our results show that the NMDA receptor gene and nNOS gene are highly conserved between pikas and rats (Fig. 1), and suggest a higher expression of NMDA-R1 in the medulla of pikas compared to rats. This is particularly of interest because previous studies have suggested that NMDA-Rs are crucial for hypoxic ventilatory response and could also be involved in ventilatory acclimatization to chronic hypoxia (Mizusawa et al., 1994; El Hasnaoui-Saadani et al., 2007; Voituron et al., 2014). The observed difference between pikas and rats could also be explained by the lifestyle of pikas. Indeed, NMDA-R1 mRNA expression was reported to be increased in piglet brainstem after chronic intermittent hypoxic–hypercapnia, suggesting that NMDA pathways are activated by exposure to intermittent hypoxic–hypercapnia, leading to increased ventilation (Machalani and Waters, 2002). As pikas do not stay continuously in their burrows, we can assume that their exposure

to hypoxic–hypercapnia is not constant, which contributes to increased NMDA pathway as observed in piglet. Furthermore, after intermittent hypoxic–hypercapnia, NMDA-R1 mRNA expression was reportedly increased in the *nucleus tractus solitarius* of piglets (Fanous et al., 2006). This increase of NMDA-R expression may be due, at least partially, to chronic hypoxia exposure. Indeed, it was suggested that arterial chemosensory input during chronic hypoxia induced the release of glutamate (Mizusawa et al., 1994) and activation of post-synaptic NMDA-R (Ohtake et al., 1998) in the *nucleus tractus solitarius*.

Our previous experiments showed that SMTC, a selective nNOS inhibitor, increased ventilation during an acute hypoxic challenge but not at usual living altitude of pikas (Pichon et al., 2009). The inhibition of nNOS also led to an increase in the peripheral chemoreceptor response to hypoxia and hypercapnia in animals treated with L-NAME (Gozal et al., 1996; Valdes et al., 2003). Moreover, mice with specific knockout mutations of nNOS exhibited an increase in hypoxic response (Kline and Prabhakar, 2000). An extrapolation of these studies suggests that an increase in nNOS in the respiratory centers would lead to a decrease in the ventilatory response to hypoxia. However, we observed a higher expression of nNOS in the medulla associated with larger ventilation in response to the hypoxia–hypercapnia challenge in pikas as compared to rats. This result suggests that high nNOS expression in the medulla of pikas could restrain the hyperventilation induced by the hypoxic–hypercapnia and that hyperventilatory response would be higher without the action of the nNOS pathway. Future experiments are needed to address this point. Overexpression of nNOS in pikas could be also an adaptive response to continuous exposure to hypoxia and to intermittent hypoxic–hypercapnia in burrows to limit ventilatory response and ventilatory cost.

4.6. Conclusion

Life in a burrow provides protection against predators and extreme climatic conditions but requires adaptations to survive in extreme conditions. Indeed, burrowing animals develop several specific physiological strategies allowing survival and energy conservation. Pikas living in burrows in high altitude Tibetan plateaus exhibit a linear and continuous ventilatory response to hypoxic–hypercapnia. This result differs from the classical ventilatory response to hypoxic–hypercapnia observed in low altitude burrowing mammals. Moreover, plateau pikas displayed a high inspiratory drive and an invariant respiratory timing regardless of the environmental conditions. These results suggest that pikas have developed specific adaptation process to survive in these extreme conditions. These adaptive strategies could allow a better blood oxygenation despite high CO₂ concentration in burrows at high altitude. We assume that this hypercapnic tolerance could be due to a modification of chemosensitivity threshold and/or a modification of buffering capacity (Boggs et al., 1984) but also to a modification of the central respiratory network with a larger expression of NMDA-R1 and nNOS in the medulla. These results suggest a major role of NO central pathway in the hypoxic–hypercapnia ventilatory response. Further studies are needed in order to better understand these modifications in plateau pikas.

Acknowledgments

The author would like to thank the driver (Tran) for his help during high altitude trip in the Da Jiao Shan area and Quanyu Yang and Qin Ga for operating the hypobaric chamber. This work was supported by the "Relation Internationale" program of the University Paris 13 (SREI 2012), the National Basic Research Program of China (No.2012CB518200), the Program of International S&T Cooperation of China (No.052012GR0195) and National Natural Science Foundation of China (No.30393133). FJ was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The Laboratory of Excellence GR-Ex (ANR-11-LABX-0051) was funded by the program

“Investissement d’avenir” of the French National Research agency (ANR-11-IDEX-0005-02).

References

- Arieli, R., Ar, A., 1979. Ventilation of a fossorial mammal (*Spalax ehrenbergi*) in hypoxic and hypercapnic conditions. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **47**, 1011–1017.
- Barros, R.C., Zimmer, M.E., Branco, L.G., Milsom, W.K., 2001. Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. *J. Appl. Physiol.* **91**, 603–612.
- Barros, R.C., Abe, A.S., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2004. Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **138**, 97–104.
- Bartlett Jr., D., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* **10**, 384–395.
- Bavis, R.W., Mitchell, G.S., 2008. Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1220–1229.
- Beall, C.M., Reichsman, A.B., 1984. Hemoglobin levels in a Himalayan high altitude population. *Am. J. Phys. Anthropol.* **63**, 301–306.
- Beall, C.M., Brittenham, G.M., Strohl, K.P., Blangero, J., Williams-Blangero, S., Goldstein, M.C., Decker, M.J., Vargas, E., Villena, M., Soria, R., Alarcon, A.M., Gonzales, C., 1998. Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara. *Am. J. Phys. Anthropol.* **106**, 385–400.
- Bleul, U., Gotz, E., 2014. Evaluation of the i-STAT portable point-of-care analyzer for determination of blood gases and acid-base status in newborn calves. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **24**, 519–528.
- Boggs, D.F., Birchard, G.F., 1989. Cardiorespiratory responses of the woodchuck and porcupine to CO₂ and hypoxia. *J. Comp. Physiol. B* **159**, 641–648.
- Boggs, D.F., Kilgore Jr., D.L., Birchard, G.F., 1984. Respiratory physiology of burrowing mammals and birds. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **77**, 1–7.
- Dempsey, J.A., Forster, H.V., 1982. Mediation of ventilatory adaptations. *Physiol. Rev.* **62**, 262–346.
- Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O., 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**, 81–87.
- Du, J.Z., Li, Q.F., 1982. Effects of stimulated hypoxic acclimatization on organism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Theriol.* **2**, 35–42.
- Du, J.Z., Li, Q.F., Chen, X.G., 1984. Effect of simulated altitude on liver of *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Zool.* **171**, 201–203.
- Eaton, J.W., 1974. Oxygen affinity and environmental adaptation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **241**, 491–497.
- Eaton, J.W., Skelton, T.D., Berger, E., 1974. Survival at extreme altitude: protective effect of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Science* **183**, 743–744.
- El Hasnaoui-Saadani, R., Alayza, R.C., Launay, T., Pichon, A., Quidu, P., Beaudry, M., Leon-Velarde, F., Richalet, J.P., Duvallet, A., Favret, F., 2007. Brain stem NO modulates ventilatory acclimatization to hypoxia in mice. *J. Appl. Physiol.* **103**, 1506–1512.
- Fanous, A.M., Machaalani, R., Waters, K.A., 2006. N-methyl-D-aspartate receptor 1 changes in the piglet brainstem after nicotine and/or intermittent hypercapnic-hypoxia. *Neuroscience* **142**, 401–409.
- Ferner, K., Mortola, J.P., 2009. Ventilatory response to hypoxia in chicken hatchlings: a developmental window of sensitivity to embryonic hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **165**, 49–53.
- Ge, R.L., Kubo, K., Kobayashi, T., Sekiguchi, M., Honda, T., 1998. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *Am. J. Physiol.* **274**, H1792–H1799.
- Gozal, D., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Littwin, S.M., 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* **81**, 2068–2077.
- Gu, H.P., Yang, Z., Teng, G.Q., Liu, J.R., Long, W., Ruan, Z.H., 1991. Oxygen-Hb dissociation curve in plateau pika. *Chin. J. Appl. Physiol.* **7**, 365–367.
- Heath, D., Williams, D.R., 1981. *Man at High Altitude*. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, pp. 269–281.
- Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington, D.C. URL: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12910.
- Julien, C., Bairam, A., Joseph, V., 2008. Chronic intermittent hypoxia reduces ventilatory long-term facilitation and enhances apnea frequency in newborn rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1356–R1366.
- Kline, D.D., Prabhakar, N.R., 2000. Peripheral chemosensitivity in mutant mice deficient in nitric oxide synthase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **475**, 571–579.
- Knaupp, W., Khilnani, S., Sherwood, J., Scharf, S., Steinberg, H., 1992. Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* **73**, 837–840.
- Kuhnen, G., 1986. O₂ and CO₂ concentrations in burrows of euthermic and hibernating golden hamsters. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **84**, 517–522.
- Lechner, A.J., 1976. Respiratory adaptations in burrowing pocket gophers from sea level and high altitude. *J. Appl. Physiol.* **41**, 168–173.
- Li, Q., Sun, R., Huang, C., Wang, Z., Liu, X., Hou, J., Liu, J., Cai, L., Li, N., Zhang, S., Wang, Y., 2001. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 949–961.
- Li, H., Guo, S., Fau-Ren, Y., Ren, Y., Fau-Wang, D., Wang, D., Fau-Yu, H., Yu, H., Fau-Li, W., Li, W., Fau-Zhao, X., Zhao, X., Fau-Chang, Z., Chang, Z., 2013. VEGF189 expression is highly related to adaptation of the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) inhabiting high altitudes.
- Machaalani, R., Waters, K.A., 2002. Distribution and quantification of NMDA R1 mRNA and protein in the piglet brainstem and effects of intermittent hypercapnic hypoxia (IHH). *Brain Res.* **951**, 293–300.
- Malte, C.L., Jakobsen, S.L., Wang, T., 2014. A critical evaluation of automated blood gas measurements in comparative respiratory physiology. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **178**, 7–17.
- Manabe, S., Broccoli, A.J., 1990. Mountains and arid climates of middle latitudes. *Science* **247**, 192–195.
- Mason, B., 2003. Himalayas age nine times overnight. *Nature*, <http://dx.doi.org/10.1038/news030929-6>.
- Milic-Emili, J., Grunstein, M.M., 1976. Drive and timing components of ventilation. *Chest* **70**, 131–133.
- Mizusawa, A., Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W., Kurosawa, H., Okabe, S., Takishima, T., Shirato, K., 1994. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarius of the rat during hypoxia. *J. Physiol.* **478** (Pt 1), 55–66.
- Ohata, M., Fredericks, W.R., Sundaram, U., Rapoport, S.I., 1981. Effects of immobilization stress on regional cerebral blood flow in the conscious rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**, 187–194.
- Ohtake, P.J., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Graff, G.R., Gozal, D., 1998. NMDA receptors mediate peripheral chemoreceptor afferent input in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* **84**, 853–861.
- Peyronnet, J., Roux, J.C., Mamet, J., Perrin, D., Lachuer, J., Pequignot, J.M., Dalmaz, Y., 2007. Developmental plasticity of the carotid chemoafferent pathway in rats that are hypoxic during the prenatal period. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 2865–2872.
- Pichon, A., Zhenzhong, B., Favret, F., Jin, G., Shufeng, H., Marchant, D., Richalet, J.P., Ge, R.L., 2009. Long-term ventilatory adaptation and ventilatory response to hypoxia in plateau pika (*Ochotona curzoniae*): role of nNOS and dopamine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **297**, R978–R987.
- Pichon, A., Zhenzhong, B., Marchant, D., Jin, G., Voituron, N., Haixia, Y., Favret, F., Richalet, J.P., Ge, R.L., 2013. Cardiac adaptation to high altitude in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Physiol. Rep.* **1**, e00032.
- Powell, F.L., Milsom, W.K., Mitchell, G.S., 1998. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* **112**, 123–134.
- Qu, J., Li, W., Yang, M., Ji, W., Zhang, Y., 2013. Life history of the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in alpine meadows of the Tibetan Plateau. *Mamm. Biol. - Z. Säugetierkd.* **78**, 68–72.
- Schmitt, P., Soulier, V., Pequignot, J.M., Pujol, J.F., Denavit-Saubie, M., 1994. Ventilatory acclimatization to chronic hypoxia: relationship to noradrenaline metabolism in the rat solitary complex. *J. Physiol.* **477** (Pt 2), 331–337.
- Schobersberger, W., Greie, S., Humpeler, E., Mittermayr, M., Fries, D., Schobersberger, B., Artner-Dworzak, E., Hasibeder, W., Klingler, A., Gunga, H.C., 2005. Austrian Moderate Altitude Study (AMAS 2000): erythropoietic activity and Hb-O₂ affinity during a 3-week hiking holiday at moderate altitude in persons with metabolic syndrome. *High Alt. Med. Biol.* **6**, 167–177.
- Sheafor, B.A., 2003. Metabolic enzyme activities across an altitudinal gradient: an examination of pikas (genus *Ochotona*). *J. Exp. Biol.* **206**, 1241–1249.
- Sumitra, M., Manikandan, P., Rao, K.V., Nayeem, M., Manohar, B.M., Puvanakrishnan, R., 2004. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats—a comparative analysis. *Life Sci.* **75**, 1887–1896.
- Turek, Z., Kreuzer, F., Hoofd, L.J., 1973. Advantage or disadvantage of a decrease of blood oxygen affinity for tissue oxygen supply at hypoxia. A theoretical study comparing man and rat. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **342**, 185–197.
- Valdes, V., Mosqueira, M., Rey, S., Del Rio, R., Iturriaga, R., 2003. Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L57–L68.
- Viemari, J.C., Roux, J.C., Tryba, A.K., Saywell, V., Burnet, H., Pena, F., Zanella, S., Bevengut, M., Barthelemy-Requin, M., Herzing, L.B., Moncla, A., Mancini, J., Ramirez, J.M., Villard, L., Hilaire, G., 2005. Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 11521–11530.
- Voituron, N., Zanella, S., Menuet, C., Dutschmann, M., Hilaire, G., 2009. Early breathing defects after moderate hypoxia or hypercapnia in a mouse model of Rett syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **168**, 109–118.
- Voituron, N., Jeton, F., Cholley, Y., Hasnaoui-Saadani, R.E., Marchant, D., Quidu, P., Favret, F., Richalet, J.P., Pichon, A., 2014. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol. Rep.* **2**, e00223.
- Walker, B.R., Adams, E.M., Voelkel, N.F., 1985. Ventilatory responses of hamsters and rats to hypoxia and hypercapnia. *J. Appl. Physiol.* **59**, 1955–1960.
- Wang, C., Zhao, X., Liu, Z., Lippert, P.C., Graham, S.A., Coe, R.S., Yi, H., Zhu, L., Liu, S., Li, Y., 2008. Constraints on the early uplift history of the Tibetan Plateau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4987–4992.
- Wang, E., Kirby, E., Furlong, K.P., van Soest, M., Xu, G., Shi, X., Kamp, P.J.J., Hodges, K.V., 2012. Two-phase growth of high topography in eastern Tibet during the Cenozoic. *Nat. Geosci.* **5**, 640–645.
- Webb, C.L., Milsom, W.K., 1994. Ventilatory responses to acute and chronic hypoxic hypercapnia in the ground squirrel. *Respir. Physiol.* **98**, 137–152.
- Williams, D.D., Rausch, R.L., 1973. Seasonal carbon dioxide and oxygen concentrations in the dens of hibernating mammals (Sciuridae). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **44**, 1227–1235.
- Wixson, S.K., White, W.J., Hughes Jr., H.C., Lang, C.M., Marshall, W.K., 1987. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab. Anim. Sci.* **37**, 736–742.
- Yang, B., Qin, C., Wang, J., He, M., Melvin, T.M., Osborn, T.J., Briffa, K.R., 2014. A 3,500-year tree-ring record of annual precipitation on the northeastern Tibetan Plateau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2903–2908.
- Yingzhong, Y., Yue, C., Guoen, J., Zhenzhong, B., Lan, M., Haixia, Y., Rili, G., 2007. Molecular cloning and characterization of hemoglobin alpha and beta chains from plateau pika (*Ochotona curzoniae*) living at high altitude. *Gene* **403**, 118–124.
- Zhu, B., Kidd, W., Rowley, D., Currie, B., Shafique, N., 2005. Age of Initiation of the India-Asia collision in the East-Central Himalaya. *J. Geol.* **113**, 265–285.

II. Rôle de l'Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

A. Implication de l'Epo dans la RVHc chez les mâles

Article 4 :

Florine JETON, Anne-Sophie PERRIN-TERRIN, Aurélien PICHON, Dominique MARCHANT, Alain FRUGIERE, Laurence BODINEAU, Jorge SOLIZ, Jean-Paul RICHALET, Nicolas VOITURON. Erythropoietin deficiency remodels the central respiratory drive: impact on the central chemosensitivity

Article soumis à Journal of Physiology (London)

Une déficience chronique en Epo induit une modification de l'expression basale de gènes sensibles à l'hypoxie au niveau du SNC. Cela se traduit par l'expression de gènes codants l'Hypoxia Inducible Factor (HIF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le récepteur à l'EPO et le NOS (endothélial, neuronale et inductible). Notre équipe a déjà montré que ces changements moléculaires entraînaient une altération des phénotypes ventilatoires en hypoxie. Les principales zones chémosensibles aux variations de CO₂ et/ou d'O₂ sont localisées au niveau du bulbe rachidien, une région dans laquelle les Epo-R sont largement présents. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une présence de ces récepteurs au niveau du RTN/pFRG ce qui pourrait être responsable d'une modification de la chémosensibilité centrale au CO₂ induite par la déficience chronique en Epo.

La réponse ventilatoire à l'hypercapnie (HcVR) a été évaluée par pléthysmographie sur corps entier associée à des mesures de calorimétrie indirect, chez des souris mâles, WT et Epo-TAg^h. La mesure des variables ventilatoires et métaboliques a été réalisée avant et après injection d'Epo (Rhu-Epo) au niveau central (IC) ou périphérique (IV). En parallèle, une approche anatomique *via* des immunomarquages du proto-oncogène *c-fos* a été réalisée afin de visualiser l'activation neuronale en hypercapnie dans différentes zones du bulbe rachidien.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- **Augmentation du \dot{V}_E en hypercapnie** chez les WT par **augmentation du V_T** uniquement
- **Augmentation du \dot{V}_E** plus importante chez les Epo-TAg^h que chez les WT *via* une **augmentation concomitante du V_T et de la f_R** en hypercapnie
- **Aucun effet des injections d'Epo** (IV et IC) sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie
- **Augmentation du nombre de cellules exprimant *c-fos*** moins importante au niveau du RTN/pFRG chez les Epo-TAg^h
- **Expression plus élevée de *c-fos* dans les raphés (pallidus et magnus)** chez les Epo-TAg^h
- **Pas de modification de l'expression de PHOX2B** au niveau du RTN/pFRG chez les Epo-TAg^h
- **Les neurones exprimant *c-fos*** chez les Epo-TAg^h sont majoritairement **sérotoninergiques dans les raphés (pallidus et magnus)**

L'ensemble des résultats de cette série expérimentale faite chez les mâles suggère un **rôle de l'Epo dans la mise en place du patron ventilatoire en réponse à l'hypercapnie**, même si l'Epo ne semble pas indispensable pour obtenir une RVHc. De plus, il semble que la déficience en Epo pourrait induire une modification de l'importance du rôle joué par certaines structures du SNC dans la chémosensibilité à l'hypercapnie qui serait à l'origine de modifications au niveau du patron ventilatoire.

Nous avons réalisé l'ensemble de cette étude sur des souris WT et Epo-TAg^h mâles, mais nous avons également suivi le même protocole sur des animaux WT et WT et Epo-TAg^h femelles pour identifier les interactions entre l'Epo et les hormones sexuelles femelles dans la chémosensibilité et le contrôle central de la ventilation (Cf. II-B).

1 **Title:** Chronic erythropoietin deficiency remodels the medullary respiratory network
2 implied in chemosensitivity to carbon dioxide

3

4

5 **Authors names and affiliation:**

6 Florine JETON^{1,2}, Anne-Sophie PERRIN-TERRIN^{1,3}, Aurélien PICHON^{1,2,4},
7 Dominique MARCHANT¹, Alain FRUGIERE³, Laurence BODINEAU³, Jorge SOLIZ⁵,
8 Jean-Paul RICHALET^{1,2}, Nicolas VOITURON^{1,2,#}

9

10 ¹ Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire “Hypoxie et
11 poumons”, EA 2363, 93017 Bobigny, France.

12 ² Laboratory of Excellence (Labex) GR-Ex, PRES Sorbonne Paris Cité.

13 ³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158
14 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75013, Paris, France

15 ⁴ Present address: Université de Poitiers, Laboratoire MOVE, EA6314, FSS, 86000
16 Poitiers, France

17 ⁵ Département de pédiatrie, Centre de Recherche de l’Hôpital St-François d’Assise,
18 Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de médecine, Québec
19 (Québec) G1L 3L5

20

21 **Running title:** Chronic Epo deficiency and central chemosensitivity to CO₂

22 **Keywords:** erythropoietin, central chemoreceptors, hypercapnia

23

24 **# Corresponding author:** Dr Nicolas VOITURON, Université Paris 13, Sorbonne
25 Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire “Hypoxie et poumons”, EA 2363, 93017 Bobigny,
26 France (nicolas.voituron@univ-paris13.fr).

27

28 **Key points summary**

- 29 • Chronic Epo deficiency led to a higher ventilatory response to hypercapnia
30 with a modification of the respiratory frequency and tidal volume contribution.
- 31 • Acute central and/or peripheral Epo injections did not modify the hypercapnic
32 ventilatory response.
- 33 • Chronic Epo deficiency in mice led to a reorganization of central areas
34 involved in hypercapnic chemosensitivity and modified anatomical specificity
35 of central chemoreception.
- 36 • In chronic Epo deficient mice, contribution of retrotrapezoid nucleus/parafacial
37 respiratory group was less important than in WT. Serotonergic *raphe pallidus*
38 nucleus and non-serotonergic *raphe magnus* nucleus neurons may
39 compensated for the decrease in retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory
40 group participation.

41

42 **Abstract**

43 Chronic erythropoietin (Epo) deficiency induces alteration in the normoxic
44 expression of hypoxia-related genes in the brain, thereby increasing expression of
45 genetic encoding for Hypoxia Inducible Factor, Vascular Endothelial Growth Factor,
46 Erythropoietin Receptor, endothelial, neural and inducible NOS. Altered normoxic
47 and hypoxic ventilatory phenotypes parallel these molecular changes. We
48 hypothesized that chronic Epo deficiency alters central chemosensitivity to CO₂. The
49 Hypercapnic Ventilatory Response (HcVR) was evaluated by whole body
50 plethysmography in wild type (WT) and Epo deficient (Epo-TAg^h) male mice.
51 Contrary to WT, Epo-TAg^h mice showed alterned ventilatory pattern in response to
52 hypercapnia, with increased respiratory frequency and tidal volume. Intravenous (i.v)
53 or intra cisternal (i.c.) acute injection of Rhu-Epo did not further affect HcVR in WT
54 and Epo-TAg^h mice. Histological approach revealed that *c-FOS* expression in the
55 retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group was lower in Epo-TAg^h mice than
56 in WT, independent of *PHOX2B*-expressing cells. Additionally, Epo-TAg^h mice
57 displayed an increased in *c-FOS*-like immunohistochemistry in *Raphe pallidus* and
58 *magnus* nuclei, with an important part of *c-FOS* positive cells also immunoreactive for
59 serotonin in the *Raphe pallidus* nucleus. Thus, present results showed that chronic

60 Epo deficiency in mice led to a reorganization of the ventilatory pattern and brainstem
61 areas involved in hypercapnic chemosensitivity.

62 **Abbreviations**

63 7N, facial nucleus; D, delta; Epo, erythropoietin; Epo-R, erythropoietin receptor; FLI,
64 FOS-like immunochemistry; f_R , respiratory frequency; Hc, hypercapnia; HcVR,
65 hypercapnic ventilatory response; HVR, hypoxic ventilatory response; Hx, hypoxia;
66 i.c., intra-cisternal; NK1-R, neurokinin-1 receptor; NOS, nitric oxide systems; cNTS,
67 commissural tractus solitarius nucleus; mNTS, medial tractus solitarius nucleus; vNTS,
68 ventrolateral nucleus tractus solitarius; PHOX2B, paired-like homeobox 2b; RMg,
69 *raphe magnus* nucleus; ROb, *raphe obscurus* nucleus; RPa, *raphe pallidus* nucleus;
70 RQ, respiratory quotient; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory
71 group; S-Epo-R, soluble erythropoietin receptor; $\dot{V}CO_2$, carbon dioxide production;
72 \dot{V}_E , minute ventilation; cVLM, caudal ventrolateral medulla; rVLM, rostral ventrolateral
73 medulla; VMS, ventral medullary surface; $\dot{V}O_2$, oxygen uptake; V_T , tidal volume.
74

75 Introduction

76

77 Insufficient erythropoietin (Epo) production in adults is mostly due to the
78 damage of the Epo-producing cells or suppression of Epo production by inflammatory
79 cytokines, as observed in patients suffering from rheumatoid arthritis or cancer
80 (Bunn, 2013). Patients with these pathologies generally develop anaemia due to the
81 suppression of erythropoiesis (Bunn, 2013). Anaemia associated with Epo deficiency
82 can also occur early in diabetic nephropathy (Bosman *et al.*, 2001). In addition to
83 these blood defects, Epo deficiency leads to complications in regard to other
84 physiological or neurological functions. In our laboratory, this interesting hypothesis
85 was elegantly proved by using a unique animal model that shows chronic Epo
86 deficiency and concomitant anaemia (Epo-TAg^h mice) (Pichon *et al.*, 2016).
87 Specifically, we observed that in the brain, Epo deficiency has a major impact on
88 ventilatory response to hypoxia (HVR) and ventilatory acclimatization to hypoxia
89 (Macarlupu *et al.*, 2006b, a; Voituron *et al.*, 2014). Furthermore, we demonstrated
90 that Epo deficiency produces deep alteration in the normoxic expression of hypoxia-
91 related genes in the brain. As such, the basal level of hypoxia inducible factors,
92 vascular endothelial growth factor, glucose transporter 1, erythropoietin receptor
93 (Epo-R), and endothelial, neural and inducible NOS were drastically augmented (El
94 Hasnaoui-Saadani *et al.*, 2009). Thus, transgenic anaemic mice develop adaptive
95 strategies in normoxia in order to improve brain oxygenation (El Hasnaoui-Saadani *et*
96 *al.*, 2009).

97 More recently, Epo has been shown to respond to hypoxic stimulation, not
98 only by increasing erythropoiesis and blood oxygen transport capacity, but also by
99 increasing HVR, therefore optimizing oxygen saturation (Soliz *et al.*, 2007). This
100 effect of Epo seems to be due to the presence of Epo-R in the main peripheral and
101 central respiratory areas that regulate ventilation (Soliz *et al.*, 2005). Indeed, Epo-R is
102 largely expressed in brainstem, including the Pre-Botzinger complex, known as one
103 of the main respiratory generators (Smith *et al.*, 1991). Epo-R is also present in
104 central and peripheral areas involved in respiratory regulation (Soliz *et al.*, 2005).

105 In a recent study, we reported that acute deficiency of cerebral Epo does not
106 modulate ventilatory response to hypercapnia (HcVR) (Ballot *et al.*, 2015b). However,
107 nothing is known about the potential effect of chronic Epo deficiency on the

108 chemosensitivity to CO₂. Major chemosensitive sites (central chemoreceptors) are
109 mostly distributed within the brainstem (Feldman *et al.*, 2003; Nattie & Li, 2006a)
110 even if peripheral chemoreceptors play a small, yet significant, role in the sensing of
111 arterial CO₂ pressure and pH changes (Dahan *et al.*, 2008). Two sites are proposed
112 to play a major role in HcVR: the medullary raphe serotonergic neurons (Hodges *et*
113 *al.*, 2008; Teran *et al.*, 2014) and the ventral medullary surface, specifically the
114 retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) (Mulkey *et al.*, 2004;
115 Guyenet *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015; Ruffault *et al.*, 2015). Involvement of these
116 two sites depends on the state of arousal (Mitchell, 2004).

117 In this study we hypothesized that chronic Epo deficiency leads to a neuronal
118 reorganization in the brainstem respiratory areas and modulates HcVR. Male Epo-
119 deficient (Epo-TAg^h) mice and their control (wild type littermate mice) were tested in
120 normocapnic and hypercapnic environments. In order to evaluate the short-term
121 effect of Epo on HcVR, peripheral or central injection of human recombinant Epo
122 were undertaken. Immunohistochemical analyses were performed to identify and
123 characterize the changes in neural pathways induced by chronic Epo deficiency
124 during a hypercapnic challenge.

125

126 **Materials and methods**

127 ***Ethical approval***

128 Experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal
129 Experiment Charles Darwin (Ce5/2011/05), done in accordance with the European
130 Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care,
131 and conducted in accordance with the French legislation for animal care
132 (authorization number: A-93-086 for NV and A-93-072 for AP).

133

134 ***Animals and procedures***

135 Only male mice were used in this study. All experiments were performed in in-
136 house bread wild type (WT, n=55) and Epo-TAg^h (n=52) male adults littermates (\approx 10
137 weeks) from Bl6/CBA strain. Mean body weight and temperature were 30.4 ± 3.3 g /
138 35.3 ± 1.6 °C for WT mice and 29.7 ± 4.0 g / 35.0 ± 1.0 °C for Epo-TAg^h mice
139 respectively. Epo-TAg^h mice present a targeted disruption in the 5' untranslated
140 region of the *Epo* gene that reduces the whole body Epo expression (Binley *et al.*,
141 2002) leading to a plasma and brain Epo concentration approximately 50 pg/ml and
142 0.10 pg/mg, respectively, also around 150 pg/ml and 0.40 pg/mg in WT respectively
143 (El Hasnaoui-Saadani *et al.*, 2009). Haemoglobin concentration and haematocrit
144 were approximately 7 g/dl and 16-20% in Epo-TAg^h mice (approximately 17 g/dl and
145 38-40% in WT) (El Hasnaoui-Saadani *et al.*, 2013). All animals were housed in a
146 12h/12h light/dark cycles at 18-20°C temperature and had *ad libitum* access to water
147 and food.

148 Ventilatory (WT n= 25; Epo-TAg^h n= 25) and metabolic (WT n= 7; Epo-TAg^h
149 n= 5) variables were measured in normocapnic environment and during a
150 hypercapnic challenge. Other animals were used for histological approaches (WT n=
151 23; Epo-TAg^h n= 22).

152

153

154

155 **Ventilatory variables analysis**

156 In non-anesthetized and unrestrained mice, breathing variables were recorded
157 by whole-body plethysmography (Bartlett & Tenney, 1970; Voituron *et al.*, 2014). The
158 animal chamber (200ml) was connected to a differential pressure transducer (model
159 DP 45-18, Validyne Engineering Northridge, CA, USA), which measured pressure
160 fluctuations within the chamber, relative to a reference chamber of the same volume.
161 The differential pressure transduced signals were recorded by Spike 2 data analysis
162 system (CED, Cambridge UK). To avoid stress effects on ventilatory variables, mice
163 were habituated in the recording chamber two or three days before the experiments.
164 To evaluate the acute ventilatory response to hypercapnia, air was enriched with CO₂
165 gas for 5 min (CO₂ 4%, O₂ 21%, balanced N₂). Only periods of breathing without
166 body movements were analysed. We evaluated respiratory frequency (f_R , in cycles
167 per min, $\text{c}\cdot\text{min}^{-1}$), tidal volume (V_T , μl) normalized as the ratio of V_T divided by body
168 weight (V_T , $\mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$) and minute ventilation (\dot{V}_E , $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Delta (D) values of
169 ventilatory variables were also calculated between air and hypercapnic conditions.
170 Therefore, HcVR corresponded to $D\cdot\dot{V}_E$, *i.e.* difference between \dot{V}_E at CO₂ 4% and
171 \dot{V}_E at CO₂ 0.03%.

172

173 **Epo injections**

174 In order to determine the short-term effect of Epo on HcVR in our chronic Epo-
175 deficient mice, intra-venous (i.v.) and intra-cisternal (i.c.) injections of recombinant
176 human Epo (Epo; Eprex®, JANSSEN) were undertaken. The i.v. injections (2000
177 UI.Kg⁻¹) were done through the tail vein after heat dilatation. The i.c. injections (1000
178 UI.Kg⁻¹) were done in the cisterna magna using a stereotaxic frame after animal
179 anaesthesia with a ketamine/xylazine preparation (40mg/kg and 6mg/kg). Local
180 analgesia (Xylocaïne 2%, AstraZeneca) was used to avoid pain after surgery.
181 Hypercapnic stimulation was performed 30min (i.v. injection) or 6h (i.c. injection) after
182 Epo injection due to the half-life of Epo (Janssen information product). The
183 measurements were performed 6h after surgery and central injection of Epo (Chen *et*
184 *al.*, 2013) to limit the remaining effect of anaesthesia in i.c. injected mice.

185

186

187 **Metabolic measurements**

188 An open-circuit system allowed measurement of O₂ consumption ($\dot{V}O_2$,
189 ml/min/kg; atmospheric temperature and pressure in dry air) as well as CO₂
190 production ($\dot{V}CO_2$, ml/min/kg) in normocapnia and hypercapnia (0.03% and 4% CO₂).
191 Mice were placed in a chamber where a steady 0.5 l/min flow of air was maintained.
192 The fractions of O₂ and CO₂ at the inflow and outflow of the chamber were measured
193 by O₂ and CO₂ analysers (FC-10 and CA-10 analysers, Sable system, Las Vegas,
194 USA). Air was dried before entering in the analysers. $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ were calculated
195 as previously described (Marcouiller *et al.*, 2014) according to the following formulas:

$$\dot{V}O_2 = flow \times \frac{[(F_iO_2 - F_eO_2) - F_eO_2 \times (F_eCO_2 - F_iCO_2)]}{(1 - F_eO_2)}$$

196 and

$$\dot{V}CO_2 = flow \times \frac{[(F_eCO_2 - F_iCO_2) - F_eCO_2 \times (F_iO_2 - F_eO_2)]}{(1 - F_eCO_2)}$$

197 where F_i and F_e are the fraction of O₂ and CO₂ in the inflowing and outflowing lines
198 respectively. \dot{V}_E , $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ allow us to calculate ventilatory equivalents for O₂ (
199 $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ ratio) and CO₂ ($\dot{V}_E / \dot{V}CO_2$ ratio) as well as respiratory quotient (RQ; $\dot{V}CO_2 /$
200 $\dot{V}O_2$ ratio).

201

202 **C-FOS Immunohistochemistry**

203 To localize medullary areas presenting modifications of activity in response to
204 hypercapnia, we analysed *c-FOS* expression in WT and Epo-TAg^h mice (Perrin-
205 Terrin *et al.*, 2015). The *c-FOS* protein immunodetection is a classic tool used to
206 identify central pathways involved in specific physiological response (Larnicol *et al.*,
207 1994; Bodineau & Larnicol, 2001; Okada *et al.*, 2002; Perrin-Terrin *et al.*, 2015).
208 Briefly, deeply anesthetized mice (pentobarbital, 100mg/kg, i.p.) were transcidentally
209 perfused with saline solution (NaCl 0.9%) for 10min and fixed with 4%
210 paraformaldehyde for 5 min. Brain was removed and immersed in 4%
211 paraformaldehyde for 24h, cryoprotected in 30% sucrose phosphate for 24-48h for

212 FOS-like immunocytochemistry (FLI). Free-floating sections of the brainstem (40µm)
213 were placed in 0.1M phosphate-buffer saline solutions supplemented with 0.3%
214 Triton X-100 and 2% normal goat serum. Sections were then incubated for 48h at
215 4°C with a rabbit polyclonal antibody against the FOS protein (sc-52; Santa Cruz
216 Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), diluted 1/2000 in 0.1M phosphate-buffer
217 saline solution supplemented with 0.3% Triton X-100 and 0.25% BSA. Sections were
218 then incubated at room temperature for 1h with a biotinylated goat anti-rabbit
219 immunoglobulin diluted 1/500, and for 1h with an avidin-biotin complex (Novostain
220 Super ABC Kit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). Peroxidase activity was
221 detected by using a specific kit (VECTOR NovaRED, Substrate Kit for Peroxidase,
222 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were mounted in sequential
223 caudo-rostral order on slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared
224 with xylene and coverslipped with mounting medium.

225 The FLI cells were visually counted at high magnification (x200) using
226 standard landmarks (Paxinos & Franklin, 2001). We analysed the number of c-FOS
227 positive cells in the nucleus of the solitary tract (NTS), which includes three
228 subdivisions: commissural (cNTS), medial (mNTS) and ventrolateral (vINTS), the
229 medullary *raphes* (*Raphe Obscurus* nucleus, ROb; *Raphe Pallidus* nucleus, RPa and
230 *Raphe Magnus* nucleus, RMg), in addition to the ventrolateral reticular nucleus of the
231 medulla (VLM), the facial nucleus (n7) and the ventral medullary surface (VMS).
232 Using standard landmarks (Paxinos & Franklin, 2001; Voituron *et al.*, 2011), the
233 VMS was sub-divided in two areas corresponding to the retrotrapezoid
234 nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG, under the facial nucleus) and the
235 parapyramidal area (PP; lateral edge of the pyramidal tract) (Voituron *et al.*, 2011).
236 The VLM was separated in caudal and rostral part (cVLM and rVLM respectively).
237 The cVLM was localized from the pyramidal decussation to the caudal edge of the
238 lateral paragigantocellular nucleus and the rVLM was localized from the caudal edge
239 of the lateral paragigantocellular nucleus to the caudal edge of the facial nucleus
240 (Voituron *et al.*, 2011). The NTSc and the NTSm are the projection areas of
241 peripheral chemoreceptors afferences (Finley & Katz, 1992) The VLM is a ventral
242 respiratory column that contains the Pre-Botzinger complex (Smith *et al.*, 1991; Smith
243 *et al.*, 2013).

244 Sections were examined under a light microscope (Zeiss axioskop, Germany)
245 and regions of interest were photographed with a Q-Imaging Retiga-200R CCD
246 camera. For each analysed area, the mean number of FLI positive cells per section
247 was calculated. We analysed these FLI-positive cells on one entire side of the
248 brainstem for bilateral structures (NTS, VLM, RTN/pFRG, PP, RMg and n7) and on
249 the entire area for the midline structures (RPa, ROb). Differences between mean
250 numbers of FLI-positive cells per structure obtained under control or hypercapnic
251 conditions were analysed.

252

253 ***PHOX2B immunohistochemistry.***

254 To compare the distribution of PHOX2B-positive neurons in the RTN/pFRG
255 between WT and Epo-TAg^h mice, immunohistochemical approach was performed on
256 40µm-thick coronal free-floating brainstem sections (see above). Coronal brainstem
257 sections were incubated with a polyclonal goat anti-PHOX2B antibody (sc-13226;
258 Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; 1:750) in bovine serum albumin (BSA) 1% for
259 48 hours at 4°C. Afterward, sections were firstly incubated with a biotinylated horse
260 anti-goat immunoglobulin (BA-9500; Vector Laboratories, Canada; 1:500), and then
261 with an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Novostain Super ABC kit,
262 Novocastra Laboratories, Newcastle, UK; 1:250), in BSA 1% for a duration of 2 and 1
263 hour respectively, at room temperature. Peroxidase activity was detected with 0.02%
264 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% H₂O₂ in 0.005M Tris-HCL buffer.
265 Sections were mounted in sequential caudo-rostral order on slides, air-dried,
266 dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped with
267 mounting medium. Sections were examined under a light microscope (Leica DM
268 2000, Germany). Immunolabelled cells were photographed with a digital camera
269 (Leica DFC450 C, Germany).

270

271 ***5HT and c-FOS double labelling***

272 In order to determine the serotonergic phenotype of hypercapnic activated-
273 cells in medullary midline raphe, c-FOS and 5HT were both investigated. Sections
274 were first incubated with a polyclonal rabbit anti-c-FOS primary antibody (sc-253;

275 Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; 1:8000; 48 hours at 4°C), then with biotinylated
276 goat anti-rabbit immunoglobulin (BA-1000; Vector Laboratories, Canada; 1:500) in
277 NGST 1% for 2 hours at room temperature. After 1h with the avidin-biotin complex,
278 peroxidase activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine
279 tetrahydrochloride, 0.04% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in
280 Tris-HCl buffer (pH 7.6). Subsequently, sections were incubated first with a
281 polyclonal rabbit anti-5-HT primary antibody (sc-73024; Santa Cruz Biotechnology
282 Inc., USA; 1:500, 48 hours at 4°C), second with biotinylated goat anti-rabbit
283 immunoglobulin (BA-1000; Vector Laboratories, Canada; 1:500) in BSA 1% for 2
284 hours at ambient temperature and then with the avidin-biotin complex for 1h.
285 Peroxidase activity was detected by using a specific kit (VECTOR NovaRED,
286 Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The
287 distribution of c-FOS and/or 5HT positive cells was examined and photographed with
288 a digital camera (Leica DFC450 C, Germany).

289

290 ***Statistical analysis***

291 Values are presented as mean \pm standard deviation (SD). Kolmogorov–
292 Smirnov test assessed the normality of distribution. The effects of hypercapnia
293 ($F_{I}CO_2$ 4%) on ventilatory and metabolic variables in male WT and Epo-TAg^h mice
294 were evaluated before and after peripheral or central Epo injection. Differences were
295 tested by separate multivariate analyses of variance (MANOVA) with Greenhouse
296 and Geisser adjustments. A MANOVA on raw data with strain (WT/Epo-TAg^h), drug
297 (Epo/vehicle) and normocapnia/hypercapnia was performed for each experiment with
298 i.c. or i.v. Epo injection. Then separate ANOVAs were done for Epo *versus* vehicle
299 injection (i.c. or i.v.), and normocapnia *versus* hypercapnia. The Epo condition was
300 used as independent factor for the i.c. injection as one animal was used in only one
301 condition (Epo or vehicle), whereas the Epo condition was used as a dependent
302 factor for the i.v. injection experiments as each animal experienced Epo and vehicle
303 condition (repeated measurement). The same analyses were performed on delta (D)
304 values between normocapnia and hypercapnia to assess the effects of separate
305 factors on HcVR. For Immunohistochemistry, differences between results per
306 structure obtained under control or hypercapnic conditions in WT and Epo-TAg^h mice

307 were analysed by MANOVA. Newman Keuls post-hoc tests were used to assess
308 specific differences between groups. All analyses were performed with the Statistica
309 software (Stat Soft, Tulsa, USA). Differences were considered significant when
310 $P < 0.05$.

311

312

313 Results

314

315 ***Minute ventilation in normocapnia was not modified in Epo-TAg^h mice***

316 Despite a higher V_T in chronic Epo deficient mice, minute ventilation was not
317 different between WT and Epo-TAg^h male mice in normocapnic condition (Table 1).
318 Furthermore, chronic Epo deficiency slightly decreased O_2 consumption (Fig. 1A) but
319 had no effect on other metabolic variables (Fig. 1).

320

321 ***Ventilatory pattern in response to hypercapnia was modified in Epo-TAg^h mice.***

322 In all animals (WT and Epo-TAg^h), \dot{V}_E increased significantly in hypercapnia
323 when compared to normocapnia (Table 1). In WT mice, this increase was related to
324 an increase in V_T (Table 1) whereas in Epo-TAg^h mice we observed an increase in
325 both V_T and f_R (Table 1). Furthermore, V_T and \dot{V}_E were higher in Epo-TAg^h than WT
326 mice in hypercapnia (Table 1).

327

328 ***Metabolic response to hypercapnia was changed in Epo-TAg^h mice***

329 $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$, $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ and $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ ratios increased significantly after hypercapnic
330 stimulation in both WT and Epo-TAg^h mice (Fig. 1D-F). Larger $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$
331 ratios were observed in Epo-TAg^h in the hypercapnic condition when compared to
332 WT animals (Fig. 1E-F). We observed a decrease in $\dot{V}O_2$ under hypercapnia in WT
333 mice, whereas Epo-TAg^h mice displayed an increase in $\dot{V}CO_2$ in hypercapnia (Fig.
334 1A-B).

335

336 ***Intravenous and intracisternal injections of Rhu-Epo had no effect on the*** 337 ***ventilatory response to hypercapnia***

338 In Epo-TAg^h mice i.v. or i.c. injection of Rhu-Epo have no effects on ventilatory
339 variables (Table 2), whereas in WT mice, V_T was increased in normocapnia after Epo
340 i.c. injection (Table 2). HcVR (as a reminder, HcVR correspond to $D-\dot{V}_E$, i.e. \dot{V}_E at
341 CO_2 4% - \dot{V}_E at CO_2 0.03%) was unchanged after Epo i.v. and i.c. injections in WT
342 and Epo-TAg^h mice (Fig. 2Ac-Bc). However, \dot{V}_E and V_T decreased in Epo-TAg^h mice
343 during hypercapnia after i.c. Epo injections (Table 2).

344 ***Medullary areas involved in the HcVR were different between WT and Epo-Tag^h***
345 ***mice***

346 In normocapnic conditions, we observed basal *c-FOS* expression in most
347 studied structures (Table 3, Fig.3). There was no difference in *c-FOS* expression in
348 baseline condition between WT and Epo-TAg^h mice (Table 3, Fig. 3).

349 The hypercapnic exposure led to an increase in *c-FOS* expression in WT mice
350 in cNTS, mNTS, rVLM and RTN/pFRG (Table 3, Fig 3*Ab-Cb*). In Epo-TAg^h mice, *c-*
351 *FOS* distribution was different. No modification of *c-FOS* expression was found in
352 NTS and VLM (Table 3, Fig. 3*Cd*). We observed a significant increase in *c-FOS*
353 expression in RTN/pFRG but this increase was significantly reduced compared to
354 WT mice (Table 3, Fig. 3*Bd*). PHOX2B immunodetection in the RTN/pFRG
355 suggested that this under-activation did not depend on a small number of PHOX2B-
356 cells in this area (Fig. 4). Finally, Epo-TAg^h mice displayed an increase in the number
357 of *c-FOS* positive cells in RPa and RMg (Table 3, Fig. 3*Ad*). Whereas no co-labelled
358 cells were observed in the RMg of Epo-TAg^h as in WT (Fig. 5*Aa-Ad*), approximately
359 60% of *c-FOS* positive cells of the RPa were also immunoreactive for 5-HT in the two
360 genotypes (Fig. 5*Ca-Cd*). Consequently, the increase in *c-FOS* positive cells in the
361 RPa of Epo-TAg^h under hypercapnia (Table 3), led to an increase in the number of *c-*
362 *FOS* and 5-HT co-labelled cells of approximately 75% in comparison with WT (Fig.
363 5*Cd*). This observation mainly concerned the rostral part of the RPa (Fig. 5*Cd*).

364

365

366

367 **Discussion**

368

369 To our knowledge this is the first study assessing the effect of chronic Epo
370 deficiency on hypercapnic ventilatory response. Our results showed that chronic Epo
371 deficiency in Epo-TAg^h mice led to a restructuration of the respiratory medullary
372 network activated under hypercapnia, suggesting an effect of Epo deficiency on this
373 network. As the Epo-TAg^h mice developed HcVR, these results suggest that they
374 developed adaptive strategies to cope to hypercapnia. Indeed, the consequence of
375 chronic Epo deficiency is a modification of chemosensitive pathways involved in the
376 response to hypercapnia with a reduction of RTN/pFRG participation in favour of RPa
377 and RMg.

378

379 ***Methodological considerations***

380 Experiments using plethysmographic measurements were conducted in
381 unanaesthetised and unrestrained mice and thus avoided the effects that
382 anaesthesia may have on breathing. As already shown in our laboratory, ventilatory
383 variables in normocapnia were similar between WT and Epo-TAg^h mice (Voituron *et al.*,
384 2014). Furthermore, in order to evaluate the possible metabolic changes induced
385 by hypercapnic exposure, $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$ and ventilatory equivalents for O₂ and CO₂ were
386 evaluated. These measurements allowed us to show that changes observed in
387 hypercapnia were mainly due to changes in ventilation and not in metabolism. Epo
388 administrations were performed by i.v. and i.c. injections to assess peripheral and
389 central effects of Epo on ventilatory control, as this drug does not easily and
390 completely cross blood brain barrier (Xenocostas *et al.*, 2005; Lieutaud *et al.*, 2008;
391 Zhang *et al.*, 2010). After i.v. injection, Epo could cross blood brain barrier but with a
392 delay to reach maximal cerebrospinal fluid concentration from 4 to 10 hours and with
393 a low systemic/brain concentration ratio (Xenocostas *et al.*, 2005; Lieutaud *et al.*,
394 2008). Therefore, when we tested HcVR only 30min after i.v. injection of Epo, the
395 central effect should be minimal and Epo might impact the carotid body stimulation.
396 Ventilatory recordings were done 6 hours after i.c. Epo injection to optimize Epo
397 effect due to its half-life in the CSF after a single injection (25.6h to 35.5h)

398 (Xenocostas *et al.*, 2005), additionally to limit the effect of anaesthesia, mandatory for
399 i.c. injection, on ventilation.

400

401 ***Effect of chronic Epo deficiency on ventilatory response to hypercapnia***

402 Our results showed that the ventilatory response to hypercapnia in WT mice is
403 mainly due to an increase in V_T . This result is in line with a previous study which
404 suggested that CO_2 -homeostasis was more regulated by V_T than by f_R (Ohashi *et al.*,
405 2013). In contrast, HcVR in Epo-TAg^h mice was due to an increase in both V_T and f_R .
406 Thus, metabolic measurements showed higher $\dot{V}\text{CO}_2$ in Epo-TAg^h mice during
407 hypercapnia, which was probably due to a higher HcVR. These observations suggest
408 an possible effect of Epo deficiency on ventilatory control during hypercapnia.
409 Nevertheless, it could be possible that Epo-TAg^h mice might have developed
410 compensatory mechanisms to cope with hypercapnia. Many explanations could be
411 evoked. Deem *et al.* (Deem *et al.*, 1997) showed that severe haemodilution in rabbits
412 (leading to the same level of haematocrit experienced by our mice), led to an
413 increase in cardiac output, brain blood flow (Woodson & Auerbach, 1982), as well as
414 improvements in O_2 extraction without any change in ventilation. These adjustments
415 in blood transport capacities and oxygen utilization prevent the development of
416 arterial hypercapnia and tissue CO_2 retention that would stimulate peripheral or
417 central chemoreceptors, and consecutively prevent from an increase in ventilation.
418 As previously discussed (Bartlett & Tenney, 1970; Deem *et al.*, 1997), the increase in
419 ventilation in an anaemic animal would be counterproductive since any slight
420 increase in PaO_2 in the normoxic range would minimally affect O_2 content, thereby
421 resulting in respiratory alkalosis that would also limit O_2 unloading to the tissues.
422 Moreover, the increase in ventilatory muscle work would increase its cost in an
423 animal in which O_2 transport is highly limited. Another hypothesis could be that the
424 changes observed in HcVR of Epo-TAg^h mice could be due to plasticity in the
425 neuronal network involved in ventilatory response to hypercapnia

426

427 ***Short-term effect of systemic and central injection of Epo on ventilatory*** 428 ***response to hypercapnia***

429 As a complementary approach to determine the short-term effect of Epo on
430 HcVR in our mice, i.v. and i.c. injections were undertaken. To assess the short-term
431 effect of Epo on peripheral chemoreceptors, we injected Epo in peripheral blood.
432 Injecting Epo directly into the cerebrospinal fluid allowed for the assessment of
433 central short-term effect of Epo on ventilatory control. Results showed an increase in
434 V_T during normocapnia in WT male after i.c. injection. Furthermore, \dot{V}_E and V_T
435 decreased in Epo-TAg^h mice during hypercapnia after i.c. Epo injections. These
436 results are partially in line with our previous findings and suggest that: 1/ Epo could
437 have a respiratory stimulant effect in adult WT mice (Ballot *et al.*, 2015a) and 2/ acute
438 Epo injection does not modify the ventilatory response to CO₂ in WT animals (Ballot
439 *et al.*, 2015b), 3/ impact of Epo in carotid bodies under hypercapnic condition should
440 be minimal.

441

442 ***Epo deficiency alters the medullary chemosensitive pathways***

443 The baseline normocapnic expression of *c-FOS* in central ventilatory
444 structures was similar between WT and Epo-TAg^h mice. However, when exposed to
445 hypercapnia, a differential effect of mice strain was observed on the expression of *c-*
446 *FOS* in medullary respiratory areas. In WT mice, hypercapnia elicited an increase in
447 *c-FOS* expression in the RTN/pFRG, and NTS as already described (Teppema *et al.*,
448 1997; Okada *et al.*, 2002). Elevation of PaCO₂ increased carotid body sinus nerve
449 firings (Fitzgerald & Dehghani, 1982). Furthermore, hypercapnia led to an increase in
450 *c-FOS* expression at cNTS Level (Tankersley *et al.*, 2002). Thus, increase in *c-FOS*
451 expression could be linked to the central chemoreception activity of the NTS (Nattie,
452 1999) or to the activation of carotid bodies, whose afferences project in the NTS
453 (Torrealba & Claps, 1988; Finley & Katz, 1992). Since we did not observe any
454 increase in Epo-TAg^h mice, we can hypothesise that chronic Epo deficiency could
455 affect the NTS chemosensitivity or the function of carotid bodies. This last hypothesis
456 was supported by a previous report that demonstrates an interaction between Epo
457 and carotid bodies during the hypoxic ventilatory response (Soliz *et al.*, 2005).
458 Another hypothesis is that Epo deficiency could potentially affect the establishment of
459 NTS neurons, making them incapable of integrating the peripheral information from
460 carotid bodies. Indeed, Epo/Epo-R signalling is required for normal brain

461 development and normal neural progenitor cell proliferation (Yu *et al.*, 2002; Chen *et*
462 *al.*, 2007). Epo stimulates neural progenitor cell proliferation and avoids neuronal
463 apoptosis in embryonic brain by maintaining the expression of Bcl-2 and Bcl-xL (Silva
464 *et al.*, 1996; Sola *et al.*, 2005). It is thus possible that Epo deficiency could affect the
465 organization or the efficiency of respiratory-related structures during embryonic
466 development. Other experiments are needed to confirm this hypothesis. Besides, the
467 increase in c-FOS positive cells in the RTN/pFRG under hypercapnia was less
468 important in Epo-TAg^h than in WT. We observed that Epo-TAg^h mice have the same
469 number of PHOX2B neurons, as compared to WT mice and these neurons are
470 known to play the role of main central chemoreceptors (Ruffault *et al.*, 2015).
471 Therefore, the observed difference in c-FOS positive cells under hypercapnia should
472 not been associated with a loss of PHOX2B cells in this area, making it difficult to
473 explain the fewer c-FOS positive neurons after hypercapnic stimulation while
474 PHOX2B neurons were present. This suggests that the lower expression of c-FOS in
475 the RTN/pFRG was not due to a decrease in the number of PHOX2B-positive
476 neurons, but rather to a change in their function (response properties). An
477 explanation could be found in the ability of glial cells to regulate the activity of
478 neighbouring neurons via paracrine mechanisms (Gourine *et al.*, 2010). As
479 astrocytes are a well-known source of Epo (Marti *et al.*, 1996), it is therefore possible
480 to speculate that astrocytes are hypoactive due to Epo deficiency, leading to a lower
481 stimulation of this specific area during a hypercapnic challenge. As already
482 mentioned above, another explanation could also be found in the Epo effect during
483 brain development (Yu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007). Chronic Epo deficiency could
484 alter the normal embryonic development of RTN/pFRG centers but this hypothesis is
485 secondary as the number of PHOX2B-positive neurons is not significantly reduced in
486 Epo-TAg^h mice in this area. Another hypothesis is that catecholaminergic groups are
487 recognized as CO₂ chemosensitive areas (Haxhiu *et al.*, 1996). Furthermore, Epo
488 stimulate dopamine release in brain slices (Yamamoto *et al.*, 2000). Thus Epo
489 deficiency should decrease the catecholaminergic stimulating effect and affect CO₂
490 chemosensitivity.

491 The persistence of ventilatory response to hypercapnia in Epo-TAg^h mice was
492 probably due to the activation or sur-activation of other chemosensitive areas such
493 as medullary raphe. Indeed, the hypercapnic challenge induced an increase in c-FOS

494 expression in the RPa and RMg, other sites in which serotonergic neurons are
495 known to play a dominant role in central chemosensitivity (Teran *et al.*, 2014). An
496 important part of c-FOS neurons under hypercapnia in the RPa were serotonergic
497 (Figure 5), which is consistent with this hypothesis. This observation mainly
498 concerned the rostral part of the RPa in which the CO₂ stimulated serotonergic
499 neurons have been already described (Iceman *et al.*, 2013), which is consistent with
500 our results. In addition, we also found c-FOS positive cells in medullary raphe regions
501 that were not serotonergic (Figure 5). It was recently demonstrated that a group of
502 non-serotonergic cells is stimulated by CO₂ in medullary raphe (Iceman & Harris,
503 2014). These non-5HT cells are robustly stimulated by CO₂ and express neurokinin 1
504 receptors (NK1-R) (Iceman & Harris, 2014). A lesion of *raphe* NK1-R expressing cells
505 reduces the ventilatory response to hypercapnia (Hodges *et al.*, 2004; Nattie *et al.*,
506 2004; Nattie & Li, 2006b). Thus, it is possible that medullary *raphe* NK1-R expressing
507 cells are involved in the ventilatory response to hypercapnia in Epo-TAg^h mice.
508 Overall our results suggest a change in the recruitment of chemosensitive areas in
509 HcVR. Central chemoreceptors are widely distributed in the central nervous system
510 in various areas such as VLM, caudal medullary raphe, NTS, locus coeruleus and
511 caudal hypothalamus (Dillon & Waldrop, 1993; Horn & Waldrop, 1994; Nattie, 1999).
512 Furthermore, it was suggested that these sites are differently involved according to
513 the state of arousal (Mitchell, 2004). Mainly, CO₂ stimulation of RTN/pFRG increases
514 breathing in wakefulness while CO₂ stimulation of medullary raphe increases
515 breathing in sleep (Nattie, 2001; Nattie & Li, 2006a). We hypothesize that chronic
516 Epo deficiency modifies anatomical specificity of central chemoreception. However,
517 we cannot rule out that supra-medullary areas, such as caudal hypothalamus, were
518 involved in the observed modifications in medullary areas (Dillon & Waldrop, 1993;
519 Horn & Waldrop, 1994).

520

521 **Conclusion**

522 Chronic Epo deficiency induces plasticity in the medullary pathways involved
523 in HcVR. The present results suggest that chronic Epo deficient male mice develop
524 compensatory strategies in order to cope with hypercapnic stimulation possibly
525 through plasticity and anatomical specificity of medullary chemoreception. Our work

526 contributes to better understand the ventilatory phenotype in pathologies with chronic
527 Epo deficiency, and gives a new interesting insight into the central pathways involved
528 in chemosensitivity.

529

530 **References**

- 531
- 532 **Ballot O, Joseph V & Soliz J. (2015a). Endogenous brain erythropoietin is a potent sex-**
533 **specific respiratory stimulant in adult and newborn mice. *Journal of applied***
534 ***physiology* 118, 1386-1395.**
- 535
- 536 **Ballot O, Laouafa S, Elliot-Portal E, Tam R, Voituron N, Joseph V & Soliz J. (2015b).**
537 **The central chemosensitivity is not altered by cerebral erythropoietin.**
538 ***Neuroscience letters* 609, 63-68.**
- 539
- 540 **Bartlett D, Jr. & Tenney SM. (1970). Control of breathing in experimental anemia.**
541 ***Respiration physiology* 10, 384-395.**
- 542
- 543 **Binley K, Askham Z, Iqball S, Spearman H, Martin L, de Alwis M, Thrasher AJ, Ali RR,**
544 **Maxwell PH, Kingsman S & Naylor S. (2002). Long-term reversal of chronic**
545 **anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* 100,**
546 **2406-2413.**
- 547
- 548 **Bodineau L & Larnicol N. (2001). Brainstem and hypothalamic areas activated by**
549 **tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide**
550 **inhalation in the rat. *Neuroscience* 108, 643-653.**
- 551
- 552 **Bosman DR, Winkler AS, Marsden JT, Macdougall IC & Watkins PJ. (2001). Anemia**
553 **with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. *Diabetes***
554 ***care* 24, 495-499.**
- 555
- 556 **Bunn HF. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3,**
557 **a011619.**
- 558
- 559 **Chen Y, Imai H, Ito A & Saito N. (2013). Novel modified method for injection into the**
560 **cerebrospinal fluid via the cerebellomedullary cistern in mice. *Acta***
561 ***neurobiologiae experimentalis* 73, 304-311.**
- 562
- 563 **Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT & Noguchi CT. (2007). Endogenous erythropoietin**
564 **signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *The Journal***
565 ***of biological chemistry* 282, 25875-25883.**
- 566
- 567 **Dahan A, Sarton E & Teppema L. (2008). Plasticity in the brain: influence of bilateral**
568 **carotid body resection (bCBR) on central CO₂ sensitivity. *Advances in***
569 ***experimental medicine and biology* 605, 312-316.**
- 570
- 571 **Deem S, Alberts MK, Bishop MJ, Bidani A & Swenson ER. (1997). CO₂ transport in**
572 **normovolemic anemia: complete compensation and stability of blood CO₂**
573 **tensions. *Journal of applied physiology* 83, 240-246.**

574
575 **Dillon GH & Waldrop TG. (1993). Responses of feline caudal hypothalamic**
576 **cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Experimental brain***
577 ***research* 96, 260-272.**

578
579 **El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, Escoubet B, Pezet M, Hilfiker-Kleiner D,**
580 **Hoch M, Pham I, Quidu P, Voituron N, Journe C, Richalet JP & Favret F. (2013).**
581 **Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respiratory***
582 ***physiology & neurobiology* 186, 146-154.**

583
584 **El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, Olivier P, Launay T, Quidu P, Beaudry**
585 **M, Duvallet A, Richalet JP & Favret F. (2009). Cerebral adaptations to chronic**
586 **anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia.**
587 ***American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative***
588 ***physiology* 296, R801-811.**

589
590 **Feldman JL, Mitchell GS & Nattie EE. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity,**
591 **chemosensitivity. *Annual review of neuroscience* 26, 239-266.**

592
593 **Finley JC & Katz DM. (1992). The central organization of carotid body afferent**
594 **projections to the brainstem of the rat. *Brain research* 572, 108-116.**

595
596 **Fitzgerald RS & Dehghani GA. (1982). Neural responses of the cat carotid and aortic**
597 **bodies to hypercapnia and hypoxia. *Journal of applied physiology: respiratory,***
598 ***environmental and exercise physiology* 52, 596-601.**

599
600 **Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG,**
601 **Spyer KM, Deisseroth K & Kasparov S. (2010). Astrocytes control breathing**
602 **through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571-575.**

603
604 **Guyenet PG, Abbott SB & Stornetta RL. (2013). The respiratory chemoreception**
605 **conundrum: light at the end of the tunnel? *Brain research* 1511, 126-137.**

606
607 **Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B & Cherniack NS. (1996). CO₂-induced c-fos expression**
608 **in the CNS catecholaminergic neurons. *Respiration physiology* 105, 35-45.**

609
610 **Hodges MR, Opansky C, Qian B, Davis S, Bonis J, Bastasic J, Leekley T, Pan LG &**
611 **Forster HV. (2004). Transient attenuation of CO₂ sensitivity after neurotoxic**
612 **lesions in the medullary raphe area of awake goats. *Journal of applied***
613 ***physiology* 97, 2236-2247.**

614
615 **Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson**
616 **RL, Chen ZF & Richerson GB. (2008). Defects in breathing and**
617 **thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin**
618 **neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for***
619 ***Neuroscience* 28, 2495-2505.**

620
621 **Horn EM & Waldrop TG. (1994). Modulation of the respiratory responses to hypoxia**
622 **and hypercapnia by synaptic input onto caudal hypothalamic neurons. *Brain***
623 ***research* 664, 25-33.**

624
625 **Iceman KE & Harris MB. (2014). A group of non-serotonergic cells is CO₂-stimulated in**
626 **the medullary raphe. *Neuroscience* 259, 203-213.**

627
628 **Iceman KE, Richerson GB & Harris MB. (2013). Medullary serotonin neurons are CO₂**
629 **sensitive in situ. *Journal of neurophysiology* 110, 2536-2544.**

630
631 **Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, Weaver JL, Sen J, Abbott SB,**
632 **Lazarenko RM, Ludwig MG, Perez-Reyes E, Mohebbi N, Bettoni C, Gassmann M,**
633 **Suply T, Seuwen K, Guyenet PG, Wagner CA & Bayliss DA. (2015).**
634 **PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated**
635 **receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science* 348, 1255-1260.**

636
637 **Larnicol N, Wallois F, Berquin P, Gros F & Rose D. (1994). c-fos-like immunoreactivity**
638 **in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *Journal of***
639 ***physiology, Paris* 88, 81-88.**

640
641 **Lieutaud T, Andrews PJ, Rhodes JK & Williamson R. (2008). Characterization of the**
642 **pharmacokinetics of human recombinant erythropoietin in blood and brain**
643 **when administered immediately after lateral fluid percussion brain injury and**
644 **its pharmacodynamic effects on IL-1beta and MIP-2 in rats. *Journal of***
645 ***neurotrauma* 25, 1179-1185.**

646
647 **Macarlupu JL, Buvry A, Morel OE, Leon-Velarde F, Richalet JP & Favret F. (2006a).**
648 **Characterisation of the ventilatory response to hypoxia in a model of**
649 **transgenic anemic mice. *Respiratory physiology & neurobiology* 150, 19-26.**

650
651 **Macarlupu JL, Buvry A, Morel OE, Leon-Velarde F, Richalet JP & Favret F. (2006b).**
652 **Time course of ventilatory acclimatisation to hypoxia in a model of anemic**
653 **transgenic mice. *Respiratory physiology & neurobiology* 153, 14-22.**

654
655 **Marcouiller F, Boukari R, Laouafa S, Lavoie R & Joseph V. (2014). The nuclear**
656 **progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases**
657 **the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice. *PloS one* 9,**
658 **e100421.**

659
660 **Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y,**
661 **Bauer C & Gassmann M. (1996). Erythropoietin gene expression in human,**
662 **monkey and murine brain. *The European journal of neuroscience* 8, 666-676.**

663
664 **Mitchell GS. (2004). Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the**
665 **mammalian brain. *Nature neuroscience* 7, 1288-1290.**

666
667 **Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA & Guyenet**
668 **PG. (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in**
669 **rats. *Nature neuroscience* 7, 1360-1369.**

670
671 **Nattie E. (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in***
672 ***neurobiology* 59, 299-331.**

673
674 **Nattie E & Li A. (2006a). Central chemoreception 2005: a brief review. *Autonomic***
675 ***neuroscience : basic & clinical* 126-127, 332-338.**

676
677 **Nattie E & Li A. (2006b). Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral**
678 **medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the**
679 **conscious rat. *Journal of applied physiology* 101, 1596-1606.**

680
681 **Nattie EE. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respiration***
682 ***physiology* 129, 257-268.**

683
684 **Nattie EE, Li A, Richerson GB & Lappi DA. (2004). Medullary serotonergic neurones**
685 **and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in**
686 **chemoreception in vivo. *The Journal of physiology* 556, 235-253.**

687
688 **Ohashi S, Izumizaki M, Atsumi T & Homma I. (2013). CO₂ homeostasis is maintained in**
689 **conscious humans by regulation of tidal volume, but not of respiratory rhythm.**
690 ***Respiratory physiology & neurobiology* 186, 155-163.**

691
692 **Okada Y, Chen Z, Jiang W, Kuwana S & Eldridge FL. (2002). Anatomical arrangement**
693 **of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *Journal***
694 ***of applied physiology* 93, 427-439.**

695
696 **Paxinos G & Franklin KB. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates CA:***
697 **Academic Press, San Diego.**

698
699 **Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, Frugiere A, Richalet JP, Bodineau L & Voituren N.**
700 **(2015). The c-FOS protein immunohistological detection: a useful tool as a**
701 **marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo**
702 **and ex vivo. *Journal of visualized experiments* in press.**

703
704 **Pichon A, Jeton F, El Hasnaoui-Saadani R, Hagström L, Launay T, Beaudry M,**
705 **Marchant D, Quidu P, Macarlupu JL, Favret F, Richalet JP & Voituren N. (2016).**
706 **Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient**
707 **mice. *Hypoxia* in press.**

708
709 **Ruffault PL, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, Fujiyama T, Hoshino**
710 **M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet JF, Fortin G & Goridis C. (2015). The**

711 retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for
712 the respiratory response to CO₂. *eLife* 4.

713
714 Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G & Fernandez-Luna JL. (1996).
715 Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing
716 apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88, 1576-1582.

717
718 Smith JC, Abdala AP, Borgmann A, Rybak IA & Paton JF. (2013). Brainstem respiratory
719 networks: building blocks and microcircuits. *Trends in neurosciences* 36, 152-
720 162.

721
722 Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL. (1991). Pre-Botzinger
723 complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in
724 mammals. *Science* 254, 726-729.

725
726 Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T & Wen TC. (2005). Erythropoietin after focal
727 cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of
728 transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7
729 rats. *Pediatric research* 57, 481-487.

730
731 Soliz J, Joseph V, Soulage C, Becskei C, Vogel J, Pequignot JM, Ogunshola O &
732 Gassmann M. (2005). Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by
733 interacting with brainstem and carotid bodies. *The Journal of physiology* 568,
734 559-571.

735
736 Soliz J, Soulage C, Hermann DM & Gassmann M. (2007). Acute and chronic exposure
737 to hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice
738 overexpressing erythropoietin. *American journal of physiology Regulatory,
739 integrative and comparative physiology* 293, R1702-1710.

740
741 Tankersley CG, Haxhiu MA & Gauda EB. (2002). Differential CO₂-induced c-fos gene
742 expression in the nucleus tractus solitarii of inbred mouse strains. *Journal of
743 applied physiology* 92, 1277-1284.

744
745 Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A & Olievier C.
746 (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and
747 to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *The Journal of comparative neurology*
748 388, 169-190.

749
750 Teran FA, Massey CA & Richerson GB. (2014). Serotonin neurons and central
751 respiratory chemoreception: where are we now? *Progress in brain research*
752 209, 207-233.

753
754 Torrealba F & Claps A. (1988). The carotid sinus connections: a WGA-HRP study in the
755 cat. *Brain research* 455, 134-143.

756

757 **Voituron N, Frugiere A, Mc Kay LC, Romero-Granados R, Dominguez-Del-Toro E,**
758 **Saadani-Makki F, Champagnat J & Bodineau L. (2011). The kreisler mutation**
759 **leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the**
760 **retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience* 194, 95-111.**

761
762 **Voituron N, Jeton F, Cholley Y, Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Quidu P, Favret F,**
763 **Richalet JP & Pichon A. (2014). Catalyzing role of erythropoietin on the nitric**
764 **oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia.**
765 ***Physiological reports* 2, e00223.**

766
767 **Woodson RD & Auerbach S. (1982). Effect of increased oxygen affinity and anemia on**
768 **cardiac output and its distribution. *Journal of applied physiology: respiratory,***
769 ***environmental and exercise physiology* 53, 1299-1306.**

770
771 **Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, Crump M,**
772 **Lipton JH, Kiss TL, Lau CY & Messner HA. (2005). The pharmacokinetics of**
773 **erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of**
774 **recombinant human erythropoietin. *European journal of clinical pharmacology***
775 **61, 189-195.**

776
777 **Yamamoto M, Koshimura K, Kawaguchi M, Sohmiya M, Murakami Y & Kato Y. (2000).**
778 **Stimulating effect of erythropoietin on the release of dopamine and**
779 **acetylcholine from the rat brain slice. *Neuroscience letters* 292, 131-133.**

780
781 **Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS,**
782 **Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F & Noguchi CT. (2002).**
783 **Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development.**
784 ***Development* 129, 505-516.**

785
786 **Zhang F, Xing J, Liou AK, Wang S, Gan Y, Luo Y, Ji X, Stetler RA, Chen J & Cao G.**
787 **(2010). Enhanced Delivery of Erythropoietin Across the Blood-Brain Barrier for**
788 **Neuroprotection against Ischemic Neuronal Injury. *Translational stroke***
789 ***research* 1, 113-121.**

790
791
792

793 **Additional information**

794

795 **Competing interests**

796 None

797

798 **Author contributions**

799 A.P. and N.V. designed the experiments. F.J., A.S.P.T., D.M., L.B. and N.V.
800 performed and analysed the histological experiments. F.J., A.P., J.S. and N.V.
801 performed and analysed the physiological experiments. A.P. and N.V. wrote the
802 manuscript. F.J., A.S.P.T., D.M., A.F., L.B., J.S. and J.P.R. discussed the data and
803 revise the manuscript for important intellectual content.

804 All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable
805 for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship,
806 and all those who qualify for authorship are listed.

807

808 **Funding**

809 This work was supported by the “Relations Internationales”, the “Bonus Qualité
810 Recherche” and the “Institut Fédératif de Recherche Biomédicale” programs of the
811 University Paris 13. This work was also supported by a Legs Poix grant. FJ was
812 supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The Laboratory of
813 Excellence GR-Ex (ANR-11-LABX-0051) was funded by the program “Investissement
814 d’avenir” of the French National Research agency (ANR-11-IDEX-0005-02).

815

816 **Acknowledgements**

817 We thanks Nala Shologu for correcting the English, Vincent Joseph for his advice in
818 metabolic variables analysis and Patricia Quidu for technical support. The authors
819 acknowledge also the support of Samira Varela and Sonia Varela for Animal Care.

820

821 **Tables**

822 **Table 1** – Absolute values of ventilatory variables measured in normocapnia (Nc)
 823 and hypercapnia (Hc) in male wild type (WT) and Epo-TAg^h mice

824

	<i>WT</i>		<i>Epo-TAg^h</i>	
	Nc	Hc	Nc	Hc
V_T (μ l/g)	7.89 \pm 2.35	10.65 \pm 3.11*	9.72 \pm 2.17 [§]	13.06 \pm 2.76* [§]
f_R (cycles/min)	242 \pm 47	246 \pm 49	223 \pm 39	281 \pm 41* [§]
\dot{V}_E (ml/min/g)	1.95 \pm 0.85	2.65 \pm 1.02*	2.17 \pm 0.65	3.64 \pm 0.82* [§]

825 Mean \pm SD. V_T : tidal volume; f_R : respiratory frequency; \dot{V}_E : Minute ventilation. * $p < 0.05$ Nc vs
 826 Hc (same strain); [§] WT vs Epo-TAg^h

827 **Table 2** – Ventilatory variables measured in normocapnia (Nc) and hypercapnia (Hc) male wild type (WT) and Epo-TAg^h mice after
 828 intravenous or intra-cisternal injection of vehicle (NaCl) or Epo

		WT						Epo-TAg ^h					
		Intravenous			Intracisternal			Intravenous			Intracisternal		
		NaCl	Epo	NaCl	Epo	NaCl	Epo	NaCl	Epo	NaCl	Epo	NaCl	Epo
V_T (μ l/g)	Nc	9.90 ± 1.77	11.47 ± 2.45	6.78 ± 0.98	8.59 ± 1.36 [#]	10.31 ± 1.98	10.02 ± 1.30	10.84 ± 1.31 ^{\$}	9.79 ± 0.82 ^{\$}				
	Hc	13.22 ± 1.96*	12.85 ± 2.20*	10.23 ± 1.05*	11.42 ± 2.18*	13.08 ± 2.47*	13.07 ± 1.30*	15.03 ± 2.30* ^{\$}	13.16 ± 2.03* ^{\$\$}				
f_R (cycles/min)	Nc	274 ± 34	266 ± 45	214 ± 51	219 ± 39	243 ± 43	242 ± 45	202 ± 26	194 ± 18				
	Hc	269 ± 47	281 ± 28	205 ± 36	215 ± 30	294 ± 38*	291 ± 36*	242 ± 33	232 ± 40				
\dot{V}_E (ml/min/g)	Nc	2.70 ± 0.68	3.12 ± 1.12	1.42 ± 0.20	1.87 ± 0.41	2.50 ± 0.63	2.44 ± 0.61 ^{\$}	2.19 ± 0.42 ^{\$}	1.89 ± 0.16				
	Hc	3.55 ± 0.72*	3.63 ± 0.83	2.09 ± 0.42*	2.46 ± 0.56	3.89 ± 1.04*	3.92 ± 0.50*	3.61 ± 0.50* ^{\$}	3.07 ± 0.76* ^{\$\$}				

829

830 Mean ± SD. V_T : tidal volume; f_R : respiratory frequency; \dot{V}_E : Minute ventilation. * p<0.05 Nc vs Hc (same strain); \$ p<0/05 WT vs Epo-TAg^h;
 831 # p<0.05 NaCl vs Epo (same strain).

832

833 **Table 3** – Changes in c-FOS positive neurons after normocapnia (Nc) and
 834 hypercapnia (Hc) in male wild type (WT) and Epo-TAg^h mice in medulla oblongata
 835 areas

	WT		Epo-TAg ^h	
	Nc	Hc	Nc	Hc
cNTSc	0.8 ± 1.0	1.7 ± 1.4*	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2 ^{\$}
mNTSm	0.7 ± 0.8	2.0 ± 1.0*	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3 ^{\$}
vINTSvl	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
cVLM	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.4
rVLM	0.4 ± 0.3	1.4 ± 0.9*	0.2 ± 0.3	0.7 ± 0.4 ^{\$}
RTN/pFRG	0.6 ± 0.3	2.2 ± 0.9*	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.4* ^{\$}
PP	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.7
RPa	0.8 ± 0.5	2.4 ± 1.1	1.2 ± 1.3	3.6 ± 2.9*
RMg	0.2 ± 0.2	2.2 ± 1.8	0.2 ± 0.3	3.1 ± 3.5*
ROb	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
N7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

837 Mean ± SD. VLM: Ventrolateral medulla; RTN/pFRG: Retrotrapezoid nucleus/parafacial
 838 group; RPa: *Raphe pallidus* nucleus; RMg: *Raphe magnus* nucleus; ROb: *Raphe obscurus*
 839 nucleus; PP: Parapyramidal; cNTS: Commissural Nucleus Tractus Solitary; mNTS: Medial
 840 Nucleus Tractus Solitary; vINTS: Ventrolateral Nucleus Tractus Solitary; N7: Facial nucleus. *
 841 p<0.05 Nc vs Hc (same strain); \$ p<0.05 WT vs EpoTAg^h.

842

843

844

845

846

847 **Legends**

848

849 **Figure 1 – Epo deficiency affects basal metabolism.**

850 *A-F*, histograms (mean \pm SD) showing metabolic variables measured in normocapnia
851 (Nc, white bars) and in hypercapnia (Hc, black bars) in wild type (WT) and Epo-TAg^h
852 mice. *A*, O₂ consumption ($\dot{V}O_2$). *B*, CO₂ production ($\dot{V}CO_2$). *C*, minute ventilation (\dot{V}_E).
853 *D*, Respiratory quotient (RQ, $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ ratio). *E*, ventilatory equivalents for O₂
854 ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ratio). *F*, ventilatory equivalents for CO₂ ($\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ ratio). * $P < 0.05$ vs Nc; \$
855 $P < 0.05$ vs WT.

856

857 **Figure 2 – Epo injection does not change HcVR.**

858 *A-B*, histograms (mean \pm SD) showing ventilatory response to hypercapnia for all
859 ventilatory variables in wild type (WT) and Epo-TAg^h mice after i.v. (*Aa-Ac*) and i.c.
860 (*Ba-Bc*) injections of vehicle (NaCl, white bars) or Rhu-Epo (black bars). *Aa-Ba*,
861 difference between tidal volume at CO₂ 4% and tidal volume at CO₂ 0.03% (D- V_T).
862 *Ab-Bb*, difference between respiratory frequency at CO₂ 4% and respiratory
863 frequency at CO₂ 0.03% (D- f_R). *Ac-Bc*, hypercapnic ventilatory response (HcVR)
864 corresponding to the difference between \dot{V}_E at CO₂ 4% and \dot{V}_E at CO₂ 0.03% (D- \dot{V}_E).
865 \$ $P < 0.05$ vs WT.

866

867 **Figure 3 – Epo deficiency modifies the anatomical network involved in**
868 **ventilatory response to hypercapnia.**

869 *A, B, C*. Drawings illustrating analysed structures corresponding to *raphe pallidus*
870 and *magnus* nuclei (*A*), retrotrapezoid nucleus / parafacial respiratory group
871 (RTN/pFRG) (*B*), and nucleus tractus solitarius (*C*) and showing the distribution of cells
872 immunoreactive for c-FOS. The black box defines the photographed area. Scale bar
873 = 100 μ m.

874 *Aa, Ab, Ac, Ad.* Photomicrographs (x20) of section immunolabelled for c-FOS in the
875 *raphe magnus* and *pallidus raphe* nuclei of WT (*Aa, Ab*) and Epo-Tag^h (*Ac, Ad*) mice
876 in normocapnic (*Aa, Ac*) or hypercapnic (*Ab,Ad*) conditions.

877 *Ba, Bb, Bc, Bd.* Photomicrographs (x20) of section immunolabelled for c-FOS in the
878 retrotrapezoid nucleus / parafacial respiratory group (RTN/pFRG) of WT (*Ba, Bb*) and
879 Epo-Tag^h (*Bc, Bd*) mice in normocapnic (*Ba, Bc*) or hypercapnic (*Bb,Bd*) conditions.

880 *Ca, Cb, Cc, Cd.* Photomicrographs (x20) of immunolabelled for c-FOS in the tractus
881 solitary nucleus of WT (*Ca, Cb*) and Epo-Tag^h (*Cc, Cd*) mice in normocapnic (*Ca, Cc*)
882 or hypercapnic (*Cb,Bd*) conditions.

883 The black arrow shows a c-FOS-positive neurons. Scale bare = 100µm

884 Abbreviations: 7N: facial nucleus; cc: central canal; cNTS: commissural nucleus
885 tractus solitary; mNTS: medial nucleus tractus solitary; py: pyramidal tract; RMg:
886 *raphe magnus* nucleus; RPa: *raphe pallidus* nucleus; rs: rubrospinal tract; sp5: spinal
887 trigeminal tract; vINTS, ventrolateral nucleus tractus solitary

888

889 **Figure 4 – Epo deficiency does not modify PHOX2B expression in RTN/pFRG of**
890 **wild type (WT) and Epo-TAg^h mice.**

891 *Aa, Ab.* Drawings of the medulla oblongata section of WT (*Aa*) and Epo-TAg^h (*Ab*)
892 mice illustrating the location of PHOX2B immunoreactive cells in the retrotrapezoid
893 nucleus / parafacial respiratory group (RTN/pFRG). Black points represent nuclei of
894 PHOX2B-positive cells. Scale Bar: 100µm. The black box defines the photographed
895 area.

896 *Ba, Bb.* Photomicrographs of the RTN/pFRG area of WT (*Ba*) and Epo-TAg^h (*Bb*)
897 mice in normocapnic conditions. The black arrow indicates a PHOX2B-positive cells.
898 Scale bar: 10µm

899 Abbreviations: 7N: facial nucleus; py: pyramidal tract; rs: rubrospinal tract; sp5: spinal
900 trigeminal tract; RPa: *raphe pallidus* nucleus

901

902

903 **Figure 5 – Majority of c-FOS positive cells in RPa are serotonergic.**

904 *A, B, C.* Drawings of the medulla oblongata section of adult mice illustrating the
905 analysed structures corresponding to *raphe magnus* (*A*), *obscurus* (*B*) and *pallidus*
906 (*C*) nuclei for the distribution of cells immunoreactive for c-FOS and 5-HT. The black
907 box defines the photographed area. Scale bar = 100µm.

908 *Aa, Ab, Ac, Ad.* Photomicrographs (x20) of section double-immunolabelled for c-FOS
909 and 5-HT in the *raphe magnus* nucleus of WT (*Aa, Ab*) and Epo-Tag^h (*Ac, Ad*) mice
910 in normocapnic (*Aa, Ac*) or hypercapnic (*Ab, Ad*) conditions.

911 *Ba, Bb, Bc, Bd.* Photomicrographs (x20) of section double-immunolabelled for c-FOS
912 and 5-HT in the *raphe obscurus* nucleus of WT (*Ba, Bb*) and Epo-Tag^h (*Bc, Bd*) mice
913 in normocapnic (*Ba, Bc*) or hypercapnic (*Bb, Bd*) conditions.

914 *Ca, Cb, Cc, Cd.* Photomicrographs (x20) of section double-immunolabelled for c-FOS
915 and 5-HT in the *raphe pallidus* nucleus of WT (*Ca, Cb*) and Epo-Tag^h (*Cc, Cd*) mice
916 in normocapnic (*Ca, Cc*) or hypercapnic (*Cb, Cd*) conditions. The photomicrographs
917 *Cb, Cc and Cd* contains a black box showing c-FOS-positive neurons also
918 immunoreactive for 5-HT magnification x100, Scale bar = 10µm.

919 The black arrow shows a c-FOS-positive neurons. Scale bare = 100µm

920 Abbreviations: py: pyramidal tract; RMg: *raphe magnus* nucleus; ROb: *raphe*
921 *obscurus* nucleus; RPa: *raphe pallidus* nucleus.

Figure 1

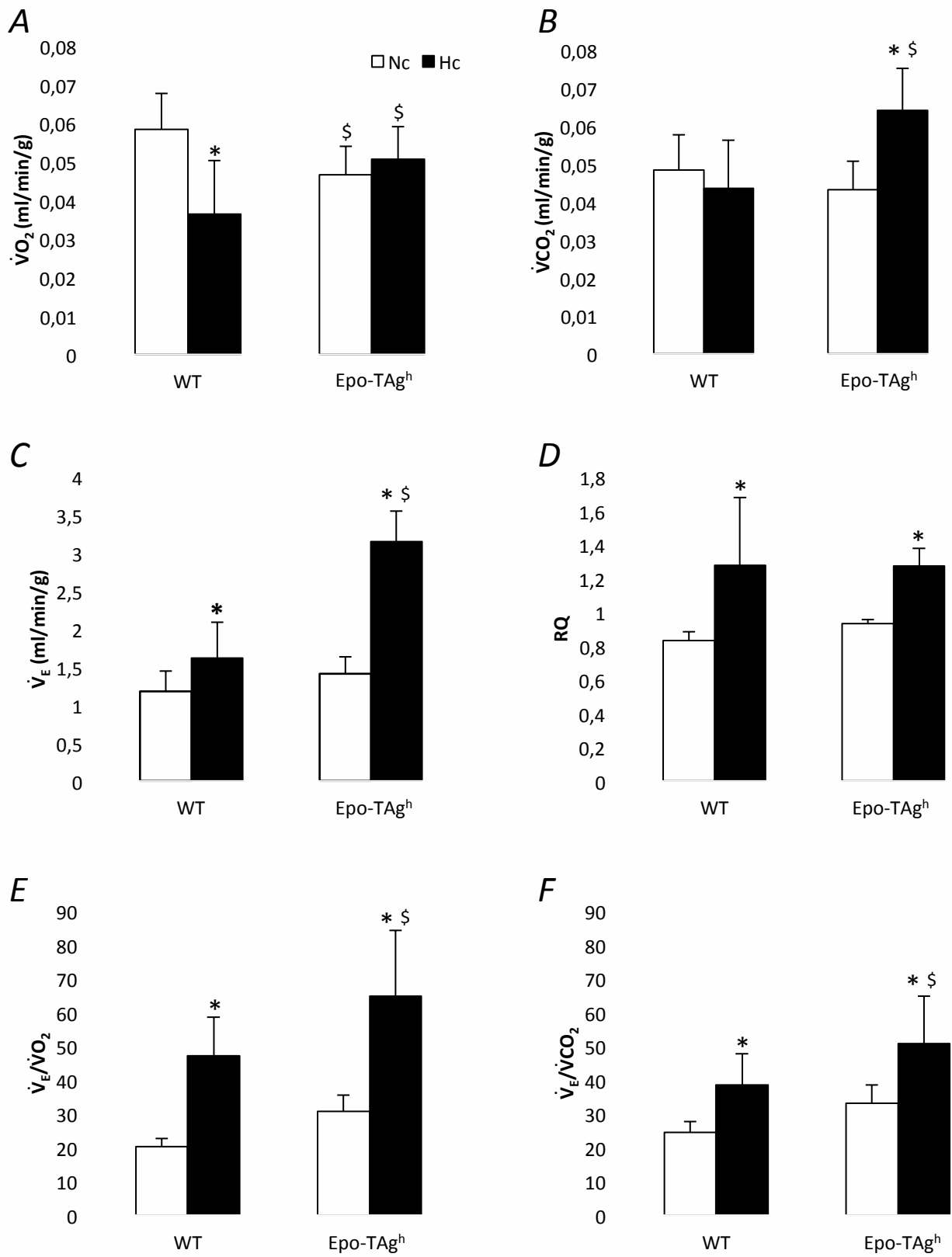


Figure 2

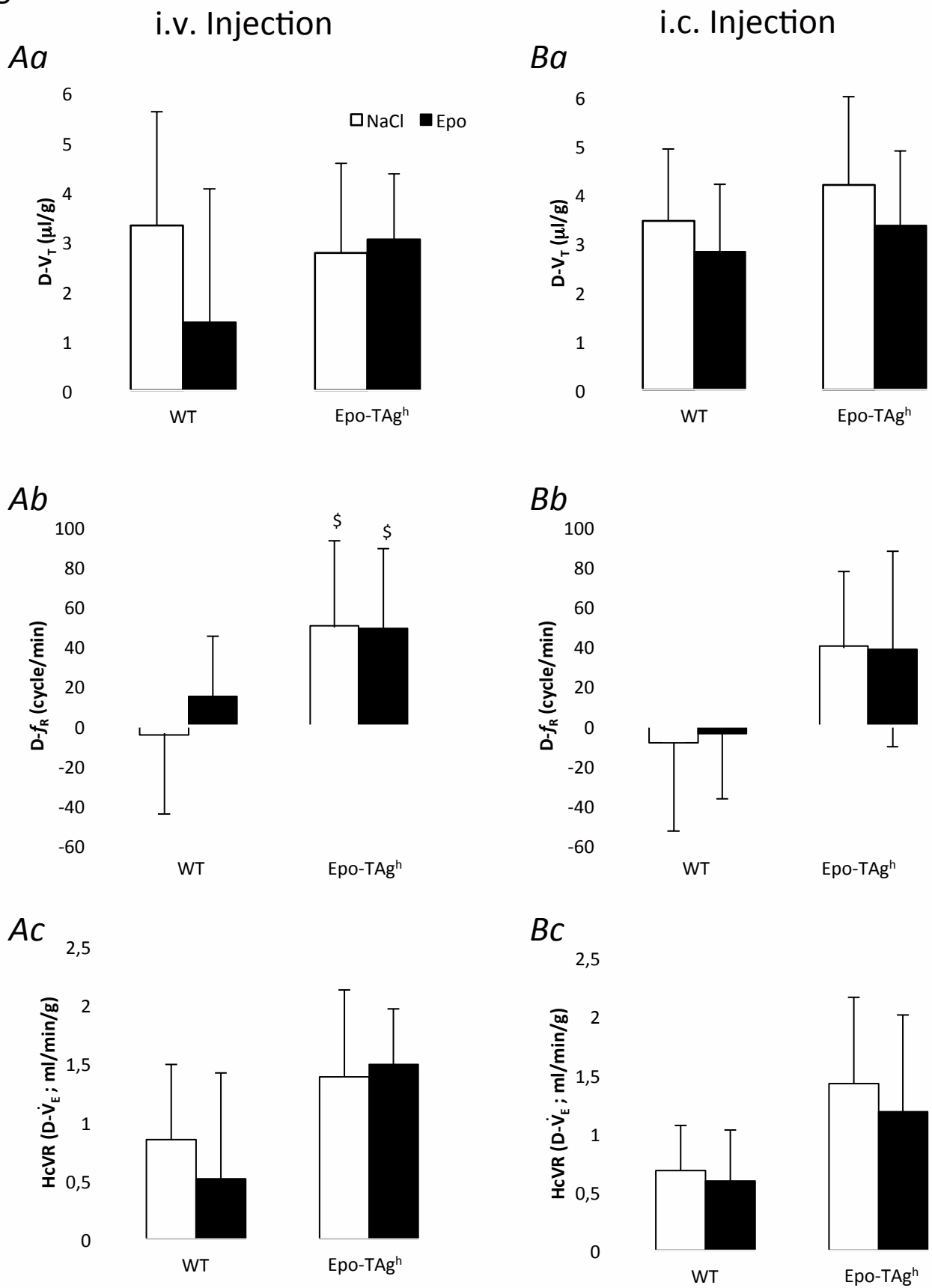


Figure 3

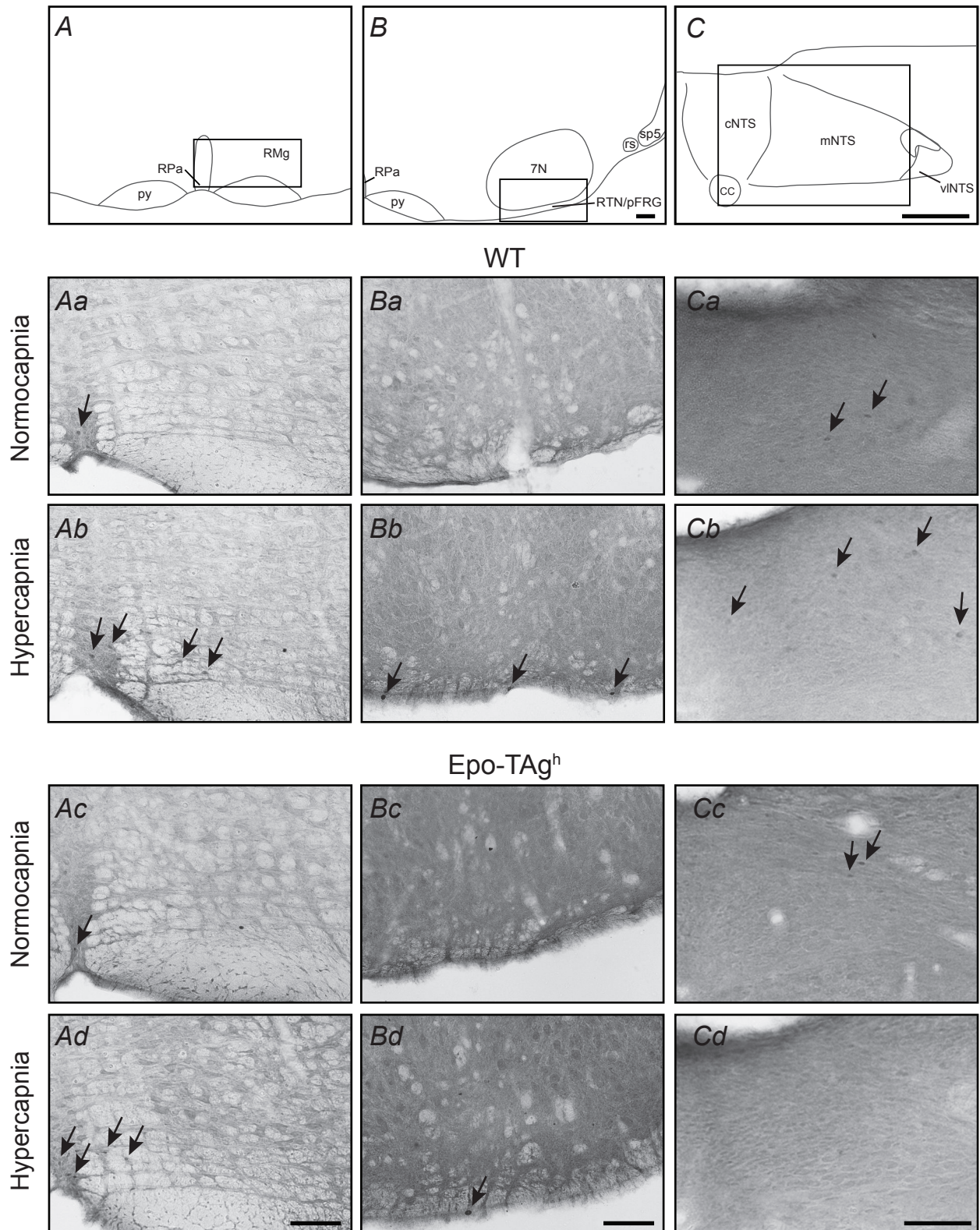
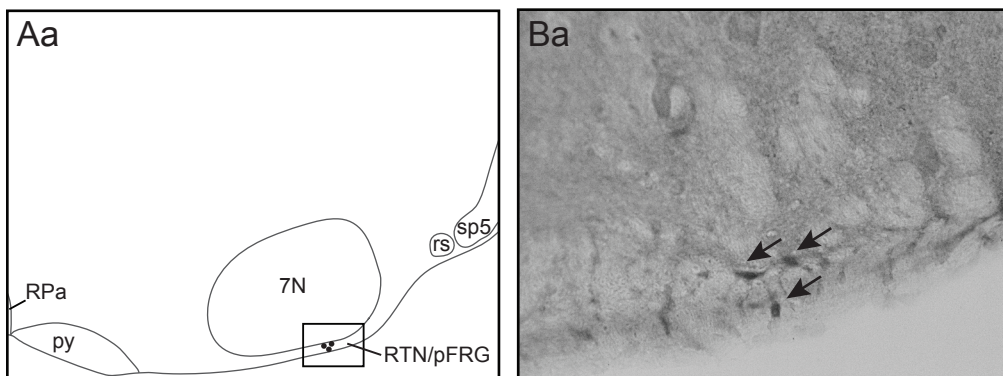


Figure 4

WT



Epo-TAg^h

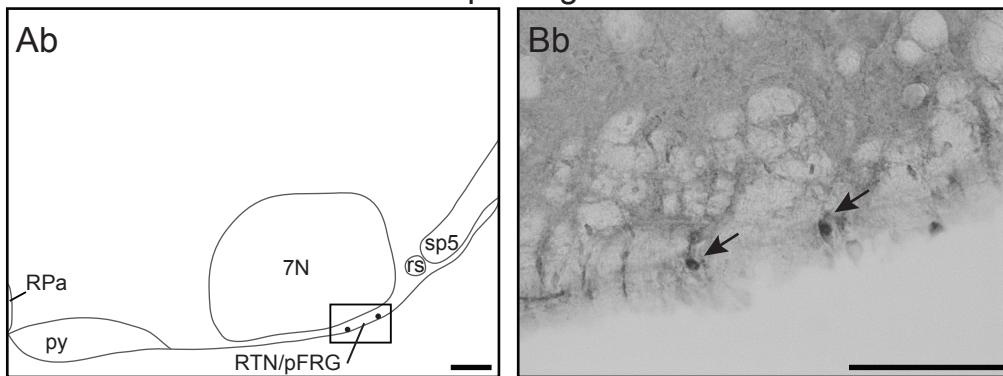
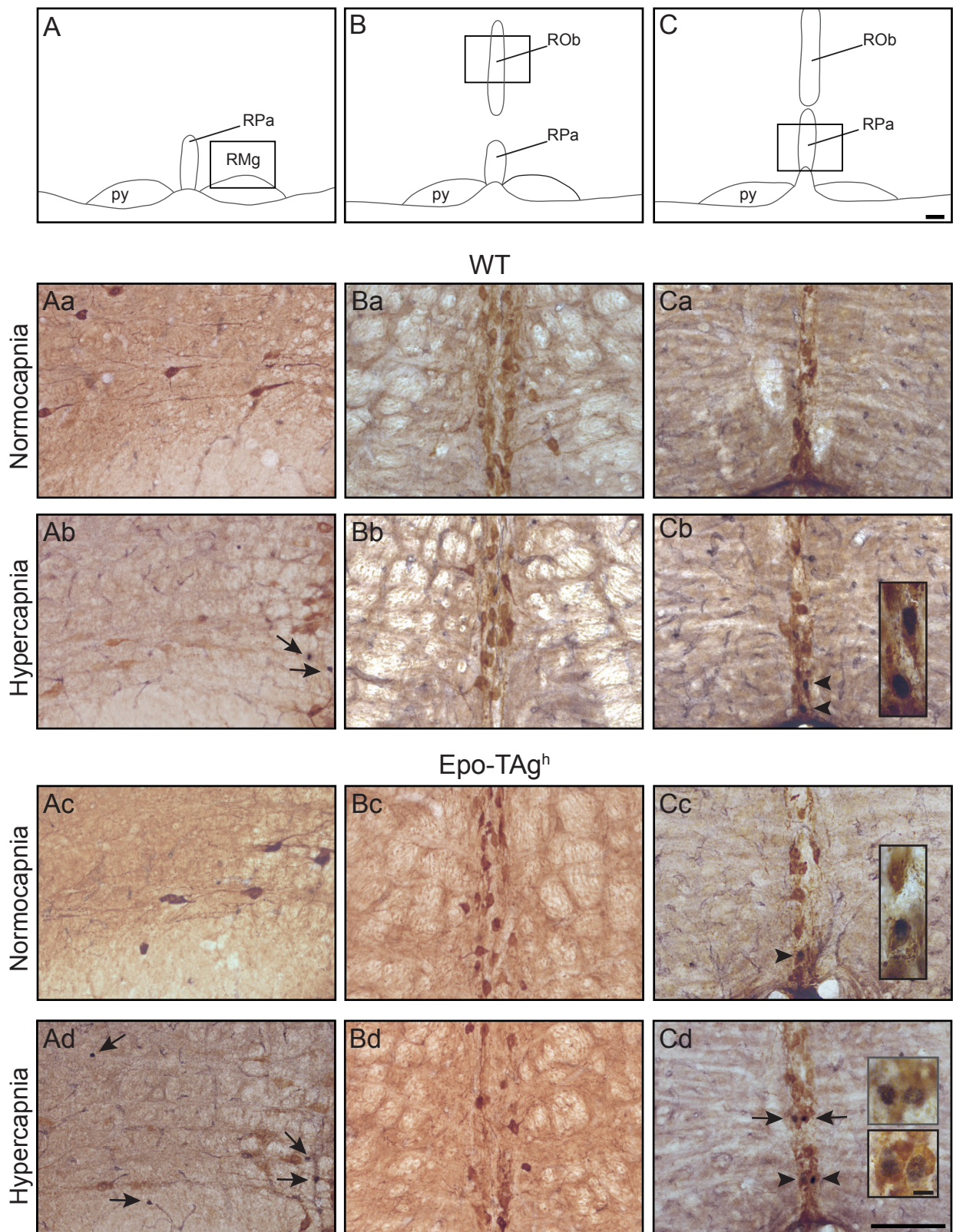


Figure 5



B. Implication de l'Epo dans la RVHc chez les femelles

1. Déficience en Epo et ventilation basale chez les femelles

L'étude des variables ventilatoires en normocapnie a montré une hyperventilation des souris Epo-TAg^h femelles comparées aux souris WT (Tableau 4), contrairement à l'étude faite chez les mâles qui n'a montré aucune différences entre les deux lignées. Cette hyperventilation était liée à un V_T plus grand chez les souris Epo-TAg^h. En revanche, la déficience en Epo n'a eu aucun impact sur la f_R .

Tableau 4 : Variables ventilatoires en Nc et Hc chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles.

	WT-F (n=24)		Epo-TAg ^h -F (n=21)	
	Nc	Hc	Nc	Hc
V_T (μ l/g)	11.05 \pm 3.41	14.07 \pm 4.18*	13.50 \pm 3.30 [§]	17.35 \pm 4.14* [§]
f_R (cycles/min)	236 \pm 38	234 \pm 38	244 \pm 36	298 \pm 31* [§]
\dot{V}_E (ml/min/g)	2.66 \pm 1.11	3.36 \pm 1.22*	3.35 \pm 1.11 [§]	5.14 \pm 1.21* [§]

V_T , volume courant ; f_R , fréquence respiratoire, \dot{V}_E , Ventilation minute. * $p < 0.05$ vs Nc, [§] $p < 0.05$ vs WT.

La mesure des variables métaboliques par calorimétrie en normocapnie chez les femelles WT (n=3) et Epo-TAg^h (n=5) a montré une différence au niveau métabolique entre nos deux lignées. En effet, comparées aux souris WT, les Epo-TAg^h ont présenté un QR plus élevé, du à tendance à une \dot{V}_{CO_2} plus élevée ($p=0.08$) (Figure 27B, D). En revanche, aucune modification de la \dot{V}_{O_2} n'a été observée (Figure 27C). De part le \dot{V}_E plus important chez les souris déficientes en Epo, nous avons observé un rapport \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} plus grand chez les Epo-TAg^h, ainsi qu'une tendance à un rapport \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} plus grand également (Figure 27E, F), ce qui est du au \dot{V}_E plus élevé chez ces souris.

2. Déficience en Epo et RVHc chez les femelles

L'étude de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (4% CO₂) a montré que les deux lignées de souris présentaient une RVHc se traduisant par une augmentation du \dot{V}_E (Tableau 4, Figure 27A). Néanmoins, comme cela a déjà été observé chez les mâles, l'augmentation de la ventilation chez les femelles WT était due à une augmentation du V_T , alors que chez les femelles Epo-TAg^h elle était due à une augmentation du V_T et de la f_R (Tableau 4). De plus, les valeurs de V_T , f_R et \dot{V}_E en hypercapnie restaient plus élevées chez les souris Epo-TAg^h. Enfin, lorsque nous avons regardé le $D\text{-}\dot{V}_E$ (pour rappel, $D\text{-}\dot{V}_E = \dot{V}_E \text{ Hypercapnie} - \dot{V}_E \text{ Normocapnie}$), nous avons remarqué qu'il était plus élevé chez les souris Epo-TAg^h (Figure 26). Les souris femelles déficientes en Epo présentaient donc une RVHc plus grande que les WT.

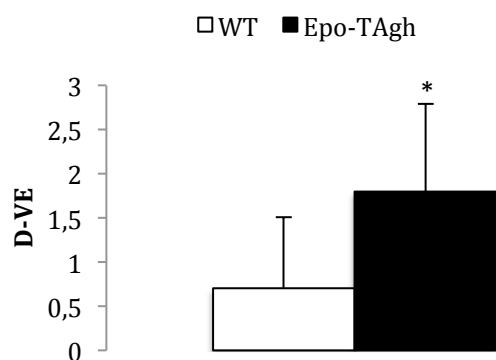


Figure 26 : Comparaison de la RVHc entre WT et Epo-TAg^h femelles.

Au niveau des variables métaboliques, nous avons observé une diminution de la $\dot{V}O_2$ en hypercapnie chez les femelles WT, ce qui n'était pas observé chez les Epo-TAg^h (Figure 27C). A l'inverse, les souris Epo-TAg^h augmentaient leur $\dot{V}CO_2$ en réponse à l'hypercapnie, ce qui n'était pas le cas chez les WT (Figure 27D). Chez les deux lignées, l'hypercapnie a induit une augmentation du rapport $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ et du QR. Aucun effet de l'hypercapnie n'a été observé sur le rapport $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ (Figure 27E-F).

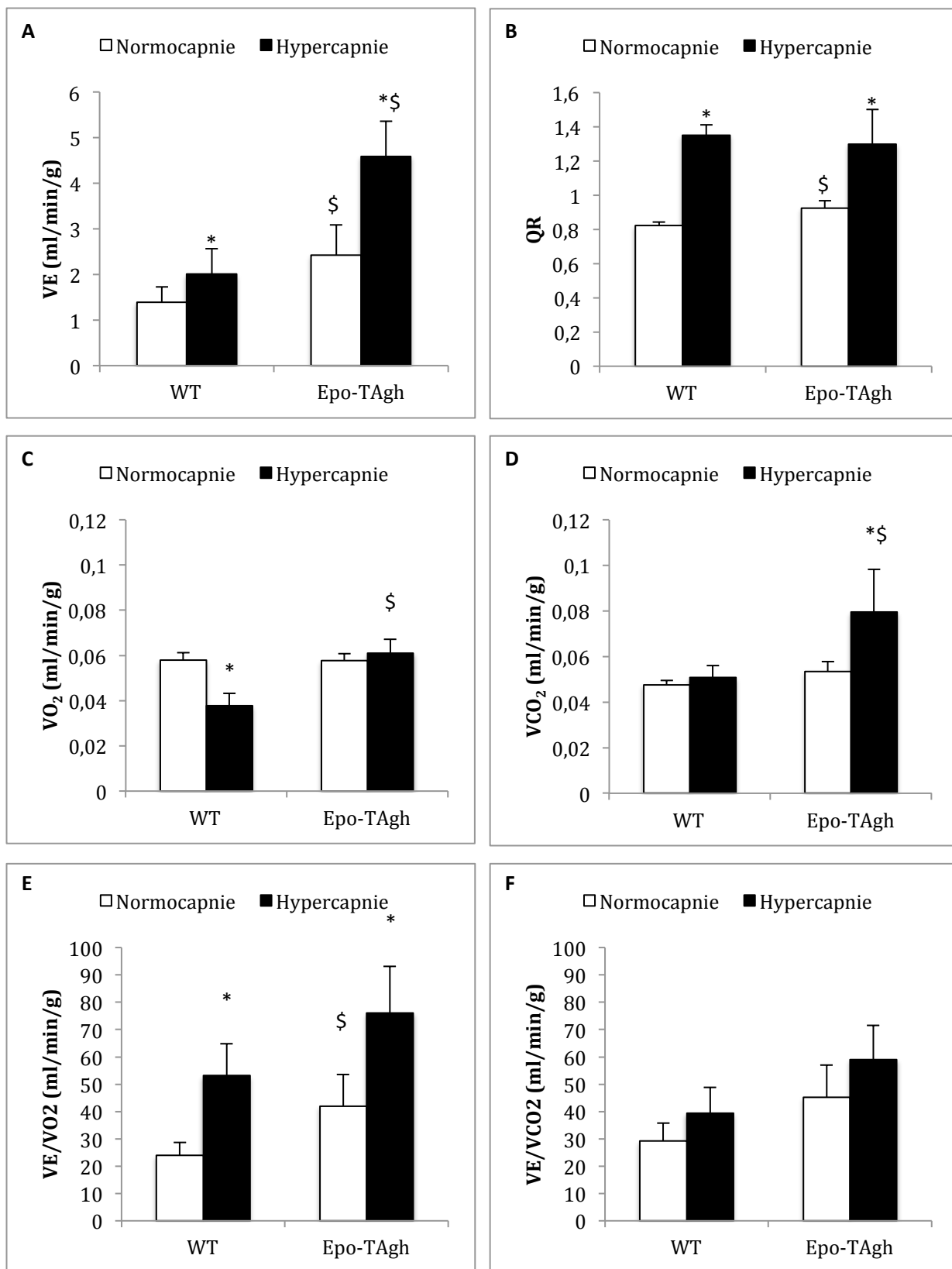


Figure 27 : Variables métaboliques et ventilatoires en Nc et Hc chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles. A, Ventilation minute (\dot{V}_E) ; B, Quotient respiratoire ($QR = \dot{V}_{CO_2}/\dot{V}_{O_2}$) ; C, Consommation d'oxygène (\dot{V}_{O_2}) ; D, Production de CO₂ (\dot{V}_{CO_2}) ; E, Rapport \dot{V}_E/\dot{V}_{CO_2} ; F, Rapport \dot{V}_E/\dot{V}_{O_2} . * p<0.05 vs Nc, [§] p<0.05 vs WT.

C. Déficience en Epo et activation neuronale en hypercapnie chez les femelles

L'analyse de l'expression du marqueur neuronal *c-fos* a montré que les valeurs en normocapnie étaient identiques entre les femelles WT et les femelles Epo-TAg^h (Tableau 5). Pour ce qui est de la réponse à l'hypercapnie, nous avons observé une augmentation du nombre de neurones marqués chez les WT au niveau du NTS (commissural, medial et ventrolatéral), de la VLMr, du RTN/pFRG, du groupe parapyramidal (PP), du RPa et du RMg (Tableau 5). Chez les souris déficientes en Epo, une augmentation du nombre de neurones marqués a été observée au niveau de la VLMc, de la VLMr, du RTN/pFRG, du RPa et du RMg (Tableau 5). Néanmoins, l'augmentation significative observée au niveau du RTN/pFRG chez les souris Epo-TAg^h était moins importante que celle observée chez les animaux WT, comme cela avait déjà été observé chez les mâles (Article 4).

Tableau 5 : Comptage du nombre de neurones positifs à l'immunomarquage *c-fos* dans différentes zones du bulbe rachidien.

	WT-F		Epo-TAg ^h -F	
	Nc (n=11)	Hc (n=13)	Nc (n=11)	Hc (n=10)
NTSc	0,19 ± 0.16	2.74 ± 2,15*	0.17 ± 0.31	0.39 ± 0.30
NTSm	0.40 ± 0.31	3.90 ± 2.51*	0.34 ± 0.20	0.93 ± 0.88
NTSvl	0.13 ± 0.11	1.29 ± 1.25*	0.18 ± 0.15	0.31 ± 0.28
VLMc	0.37 ± 0.60	0.81 ± 0.87	0.10 ± 0.14	0.83 ± 0.96*
VLMr	0.13 ± 0.22	1.78 ± 1.01*	0.11 ± 0.18	1.00 ± 1.13*
RTN/pFRG	0.27 ± 0.16	1.36 ± 0.72*	0.28 ± 0.21	0.57 ± 0.36*
PP	0.41 ± 0.29	1.11 ± 0.35*	0.38 ± 0.24	0.47 ± 0.23
RPa	1.15 ± 0.74	4.80 ± 3.29*	1.71 ± 1.25	3.85 ± 1.69*
RMg	0.12 ± 0.12	5.24 ± 3.51*	0.26 ± 0.30	3.46 ± 3.59*
ROb	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.10	0.01 ± 0.03	0.03 ± 0.06
N7	0.18 ± 0.16	0.39 ± 0.32	0.03 ± 0.07	0.06 ± 0.20

Les valeurs sont exprimées en moyenne de neurones par coupe ± SD. * p<0.05 vs Nc (même souche).

D. Effets de l'injection de l'Epo sur la RVHc

1. Effets de l'injection d'Epo sur la ventilation basale chez les femelles

La mesure des variables ventilatoires a montré que l'injection d'Epo en IV avait un léger effet sur la ventilation basale chez les animaux WT, en abaissant leur fréquence respiratoire. Aucun effet n'a été observé chez les femelles Epo-TAg^h (Tableau 6A).

L'injection d'Epo en IC n'a entraîné aucune modification du patron ventilatoire en normocapnie (Tableau 6B).

Tableau 6 : Variables ventilatoires chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles, après injection d'Epo en IV (A) ou en IC (B).

A		WT (n=13)		Epo-TAg ^h (n=8)	
		NaCl	Epo	NaCl	Epo
V _T	Nc	12.92 ± 3.29	13.38 ± 16.17	16.15 ± 2.60 [§]	16.11 ± 2.42 [§]
	Hc	16.67 ± 3.49*	16.17 ± 2.63*	19.15 ± 4.61* [§]	16.36 ± 3.74 [#]
f _R	Nc	255 ± 35	215 ± 34 [#]	272 ± 27	271 ± 33 [§]
	Hc	239 ± 36	239 ± 41*	302 ± 32* [§]	298 ± 39* [§]
V̇ _E	Nc	3.31 ± 1.09	2.94 ± 1.05	4.46 ± 0.84 [§]	4.40 ± 0.86 [§]
	Hc	4.06 ± 1.02*	3.92 ± 1.18*	5.80 ± 1.54* [§]	4.91 ± 1.48* ^{§#}

B		WT		Epo-TAg ^h	
		NaCl (n=8)	Epo (n=9)	NaCl (n=7)	Epo (n=7)
V _T	Nc	9.78 ± 1.24	9.98 ± 1.13	13.26 ± 1.65 [§]	13.64 ± 1.09 [§]
	Hc	12.01 ± 2.18*	12.21 ± 2.26*	17.55 ± 3.42* [§]	16.90 ± 2.92* [§]
f _R	Nc	211 ± 23	225 ± 31	212 ± 21	223 ± 21
	Hc	224 ± 39	221 ± 41	277 ± 20* [§]	247 ± 26 [#]
V̇ _E	Nc	2.07 ± 0.36	2.26 ± 0.44	2.82 ± 0.48 [§]	3.03 ± 0.21 [§]
	Hc	2.75 ± 0.97*	2.74 ± 0.91*	4.83 ± 0.79* [§]	4.16 ± 0.72* ^{§#}

V_T, volume courant ; f_R, fréquence respiratoire ; V̇_E, Ventilation minute. * p<0.05 vs Nc, [§] p<0.05 vs WT, # p<0.05 vs NaCl

2. Effets de l'injection d'Epo sur la RVHc chez les femelles

Après injection d'Epo en IV, nous avons observé une diminution du V_T et du \dot{V}_E en hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h uniquement (Tableau 6A). Lorsqu'on nous avons regardé les deltas pour ces deux paramètres, nous avons mis en évidence une diminution du $D-V_T$ et du $D-\dot{V}_E$ chez les souris déficiente en Epo après injection d'Epo en IV (Figure 28A, C). Chez les souris WT, nous avons observé une augmentation du $D-f_R$ sans modification de la RVHc (Figure 28B).

Après injection d'Epo en IC, nous avons remarqué que la valeur de la f_R et du \dot{V}_E en hypercapnie était diminuée chez les souris Epo-TAg^h uniquement (Tableau 6B). Lorsque nous avons regardé les deltas pour ces deux paramètres, nous avons mis en évidence une diminution du $D-f_R$ et du $D-\dot{V}_E$ chez les souris Epo-TAg^h après injection d'Epo en IC (Figure 28E, F). Aucun effet de l'injection centrale d'Epo n'a été retrouvé chez les souris WT.

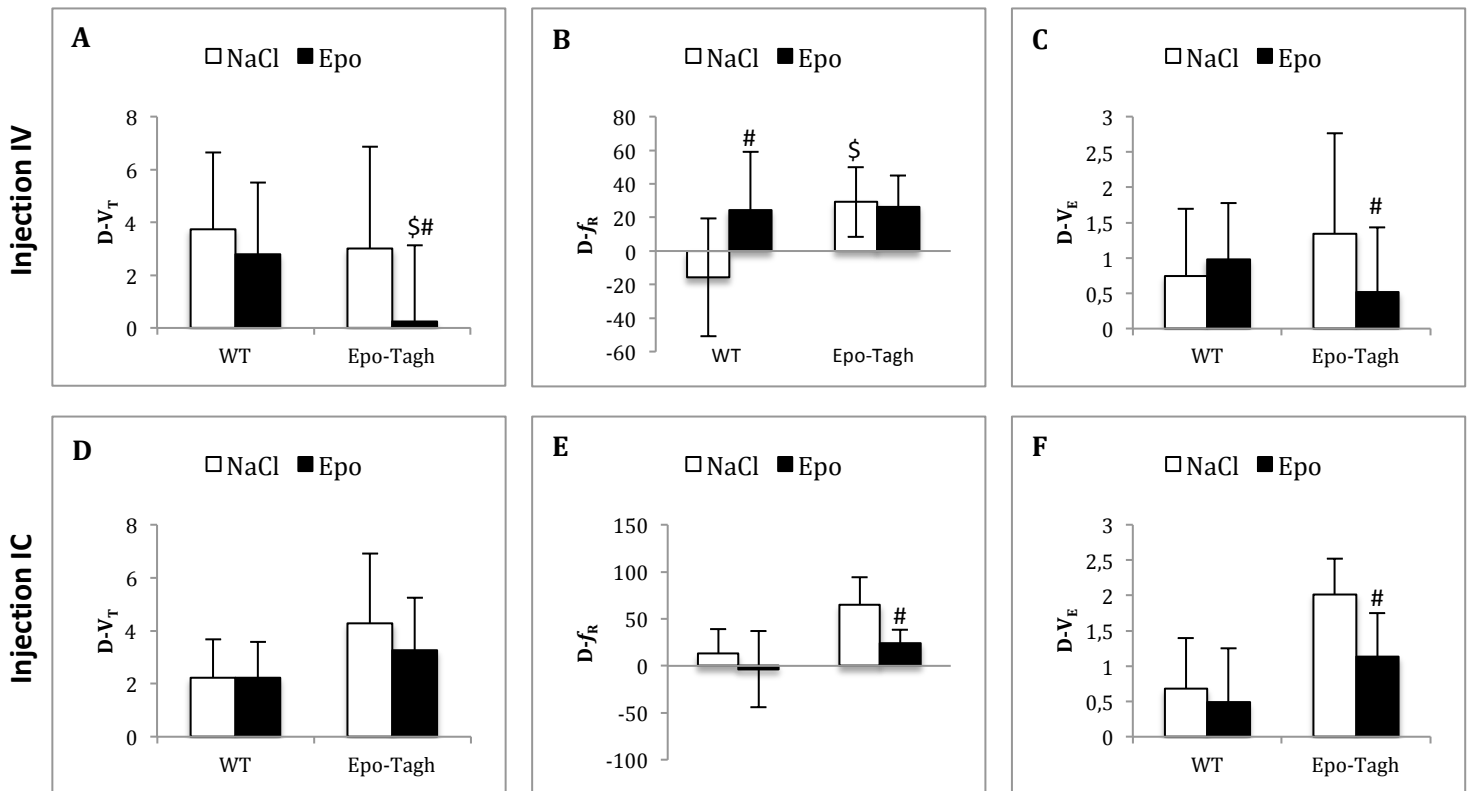


Figure 28 : Deltas des variables ventilatoires en réponse à l'hypercapnie, avant et après injection d'Epo ou de NaCl en IV (A, B, C) ou en IC (D, E, F) chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles. \$ $p < 0.05$ vs WT (même condition), # $p < 0.05$ vs NaCl (même souche).

Les expériences décrites précédemment ont montré que **l'Epo ne semble pas nécessaire à la mise en place de la RVHc**, ce qui est en accord avec une récente étude (Ballot, 2015). Cependant, nous avons observé que la déficience en Epo **modifie l'implication de certaines structures neuronales** dans la mise en place de la RVHc, ce qui entraîne une **modification du patron ventilatoire chez les souris Epo-TAg^h** en réponse à l'hypercapnie. De plus, les observations faites entre les mâles et les femelles suggèrent une implication des **hormones sexuelles femelles** dans la RVHc et une interaction de ces dernières avec l'Epo. Nous avons donc entrepris des expériences afin de déterminer le rôle de l'Epo et des hormones sexuelles femelles dans la RVHc.

E. Déficience en Epo et influence des hormones sexuelles sur la RVHc

L'existence d'un dimorphisme sexuel dans la RVH (Gassmann, 2009) et les effets de l'Epo observés uniquement chez les souris Epo-TAg^h femelles, nous avons cherché à savoir si les hormones sexuelles femelles, associé à la déficience en Epo, pouvait avoir un rôle dans la mise en place de la RVHc.

1. Phases du cycle oestral et ventilation basale

Les variables ventilatoires et métaboliques ont été mesurées dans deux phases du cycle oestral (folliculaire et lutéale) chez des individus femelles WT et Epo-TAg^h. L'analyse des variables ventilatoires et métaboliques n'a montré aucun impact de la phase du cycle oestral sur ces variables, et cela pour nos deux lignées de souris (Tableau 7).

La comparaison des variables entre nos deux lignées a montré que les valeurs des équivalents respiratoires $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ et $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ était plus élevée chez les Epo-TAg^h par rapport aux WT, dans les deux phases du cycle, sans modification du QR (Tableau 7).

Tableau 7 : Variables ventilatoires et métaboliques mesurées en normocapnie chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles, pour les deux phases du cycle oestral.

	WT (n=12)		Epo-TAg ^h (n=11)	
	Folliculaire	Lutéale	Folliculaire	Lutéale
V_T	9.00 ± 2.08	8.97 ± 2.18	11.82 ± 2.61 [§]	12.00 ± 2.82 [§]
f_R	227 ± 40	225 ± 40	221 ± 49	230 ± 51
\dot{V}_E	2.01 ± 0.45	2.00 ± 0.51	2.537 ± 0.63 [§]	2.68 ± 0.53 [§]
$\dot{V}O_2$	0.069 ± 0.005	0.066 ± 0.011	0.066 ± 0.013	0.073 ± 0.011
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	21.53 ± 2.95	20.55 ± 3.08	40.51 ± 9.78 [§]	37.49 ± 8.87 [§]
$\dot{V}CO_2$	0.060 ± 0.004	0.057 ± 0.011	0.057 ± 0.010	0.062 ± 0.011
$\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$	24.70 ± 2.89	24.07 ± 4.29	46.59 ± 12.40 [§]	43.58 ± 9.10 [§]
QR	0.87 ± 0.05	0.86 ± 0.06	0.86 ± 0.06	0.86 ± 0.08

§ p<0.05 vs WT (même phase du cycle).

2. Impact du cycle oestral sur la RVHc

Lorsque nous avons étudié la réponse à l'hypercapnie chez nos souris femelles WT et Epo-TAg^h en fonction des phases du cycle oestral, nous avons mis en évidence que la phase du cycle n'avait aucune influence sur les paramètres ventilatoires et métaboliques en hypercapnie (Tableau 8). De plus, les femelles Epo-TAg^h ont montré une RVHc plus élevée que les WT quelle que soit la phase du cycle (Figure 29).

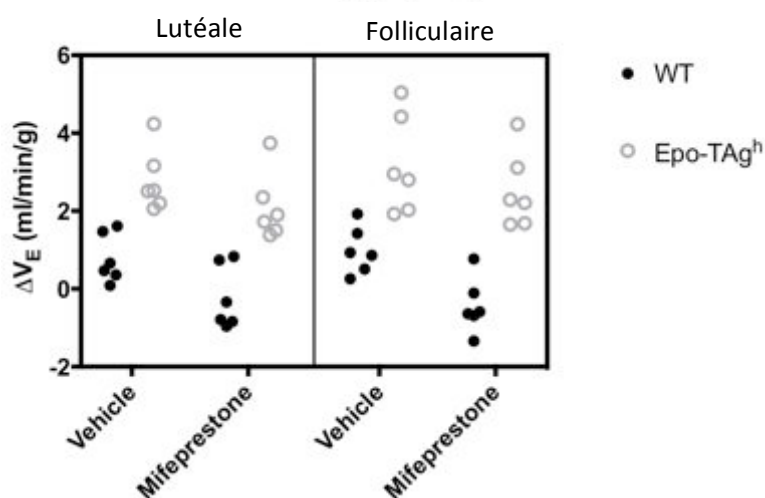


Figure 29 : RVHc dans les deux phases du cycle oestral chez des individus WT et Epo-TAg^h femelles.

Tableau 8 : Variables ventilatoires et métaboliques mesurées en normocapnie et en hypercapnie chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles, pour les deux phases du cycle oestral.

Variable	Group	Condition				Groupe	Cycle	Environnement	Interaction
		Lutéale		Folliculaire					
		Normocapnie	Hypercapnie	Normocapnie	Hypercapnie				
V _e (ml/min/g)	WT	1.84 ± 0.54	2.44 ± 0.86	1.86 ± 0.45	2.53 ± 0.85	p<0.0001 F=92.88	p=0.8957 F=0.01726	p<0.0001 F=87.93	p=0.9853 F=0.00034
	Epo-TAg ^h	2.60 ± 0.58	5.19 ± 1.39*****	2.46 ± 0.67	5.13 ± 1.45*****				
f _R (cycles/min)	WT	206 ± 31	245 ± 32	205 ± 23	247 ± 37	p<0.0001 F=24.77	p=0.4145 F=0.6713	p<0.0001 F=76.54	p=0.9242 F=0.00909
	Epo-TAg ^h	227 ± 58	311 ± 26*****	211 ± 53	301 ± 34*****				
V _T (μl/g)	WT	9.05 ± 2.61	10.02 ± 3.22	9.20 ± 2.42	10.27 ± 3.17	p<0.0001 F=55.88	p=0.8176 F=0.05345	p<0.0001 F=21.38	p=0.6202 F=0.004363
	Epo-TAg ^h	12.01 ± 3.38	16.86 ± 4.67**	11.98 ± 3.03	17.09 ± 4.33**				
V _{O2} (ml/min/g)	WT	0.069 ± 0.012	0.062 ± 0.011	0.070 ± 0.005	0.054 ± 0.011	p=0.4231 F=0.6585	p=0.0326 F=4.991	p=0.062 F=3.739	p=0.1086 F=2.724
	Epo-TAg ^h	0.073 ± 0.007	0.068 ± 0.007	0.059 ± 0.010	0.064 ± 0.007				
V _e /V _{O2}	WT	19.68 ± 2.49	29.28 ± 2.27	21.49 ± 3.30	34.42 ± 6.29	p<0.0001 F=100.9	p=0.0217 F=5.827	p<0.0001 F=58.2	p=0.6893 F=0.1627
	Epo-TAg ^h	33.53 ± 8.43	56.05 ± 12.04****	40.82 ± 8.42	63.12 ± 6.40****				
V _{CO2} (ml/min/g)	WT	0.059 ± 0.011	0.074 ± 0.017	0.061 ± 0.004	0.070 ± 0.011	p=0.3506 F=0.8975	p=0.5293 F=0.4045	p<0.0001 F=29.87	p=0.0620 F=3.742
	Epo-TAg ^h	0.059 ± 0.009	0.074 ± 0.009	0.054 ± 0.009	0.090 ± 0.011****				
V _e /V _{CO2}	WT	22.80 ± 3.31	24.88 ± 3.03	24.53 ± 3.20	26.37 ± 6.52	p<0.0001 F=88.82	p=0.9455 F=0.004048	p=0.1358 F=2.341	p=0.3005 F=1.108
	Epo-TAg ^h	41.75 ± 10.19	51.40 ± 8.96	44.63 ± 10.69	44.68 ± 4.98				
QR	WT	0.87 ± 0.06	1.19 ± 0.19*	0.87 ± 0.05	1.35 ± 0.36***	p=0.7875 F=0.07387	p=0.0043 F=9.437	p<0.0001 F=62.69	p=0.7617 F=0.09357
	Epo-TAg ^h	0.80 ± 0.05	1.09 ± 0.11	0.92 ± 0.07	1.42 ± 0.07****				

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001, pour normocapnie vs hypercapnie (même condition)

1. Influence de la progestérone sur la RVHc

Le traitement par un antagoniste des récepteurs à la progestérone (mifepristone) a entraîné une tendance à l'augmentation du V_T en normocapnie uniquement chez les femelles WT, sans aucun effet sur les variables métaboliques pour les deux lignées (Tableau 9). Cette augmentation du V_T a eu pour effet d'augmenter la valeur du \dot{V}_E , et ainsi réduire la différence avec la valeur du \dot{V}_E des Epo-TAg^h (Tableau 9).

Tableau 9 : Variables ventilatoires en normocapnie chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles, pour les deux phases du cycle oestral.

		Mifepristone			
		Lutéale	Folliculaire	Lutéale	Folliculaire
WT	f_R (c/min)	225 ± 40	227 ± 40	227 ± 17	223 ± 18
	V_T (µl/g)	8.97 ± 2.18	9.00 ± 2.08	10.70 ± 0.90	10.87 ± 1.20
	\dot{V}_E (ml/min/g)	2.00 ± 0.51	2.01 ± 0.45	2.43 ± 0.24	2.43 ± 0.33
Epo-TAg^h	f_R (c/min)	230 ± 51	221 ± 49	244 ± 31	244 ± 31
	V_T (µl/g)	12.00 ± 2.82 [§]	11.82 ± 2.61 [§]	11.64 ± 0.87	11.61 ± 0.95
	\dot{V}_E (ml/min/g)	2.68 ± 0.53 [§]	2.57 ± 0.63 [§]	2.84 ± 0.42	2.84 ± 0.47

§ p<0.05 vs WT

Le traitement par la mifepristone a également eu un effet sur la RVHc. En effet, les WT ont présenté une diminution du V_T en réponse à l'hypercapnie après traitement par la mifepristone, ce qui a entraîné un $D-\dot{V}_E$ négatif (Figure 30C). Cet effet n'a pas été retrouvé chez les animaux Epo-TAg^h (Figure 30-C). Pour ce qui est des variables métaboliques, WT et Epo-TAg^h ont présenté une diminution du $D-\dot{V}O_2$ et $D-\dot{V}CO_2$ après traitement, dans les deux phases du cycle (Figure 30E-G). Ces modifications n'ont pas entraîné de modification des équivalents respiratoires $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ et $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$ chez les WT, du fait de leur \dot{V}_E qui avait tendance à diminuer. En revanche, chez les Epo-TAg^h, les deltas pour ces équivalents étaient plus élevés après traitement par la mifepristone (Figure 30F-H). Aucune différence n'a été observée au niveau du QR chez nos deux lignées, malgré une tendance à la diminution après traitement à la mifepristone chez les Epo-TAg^h.

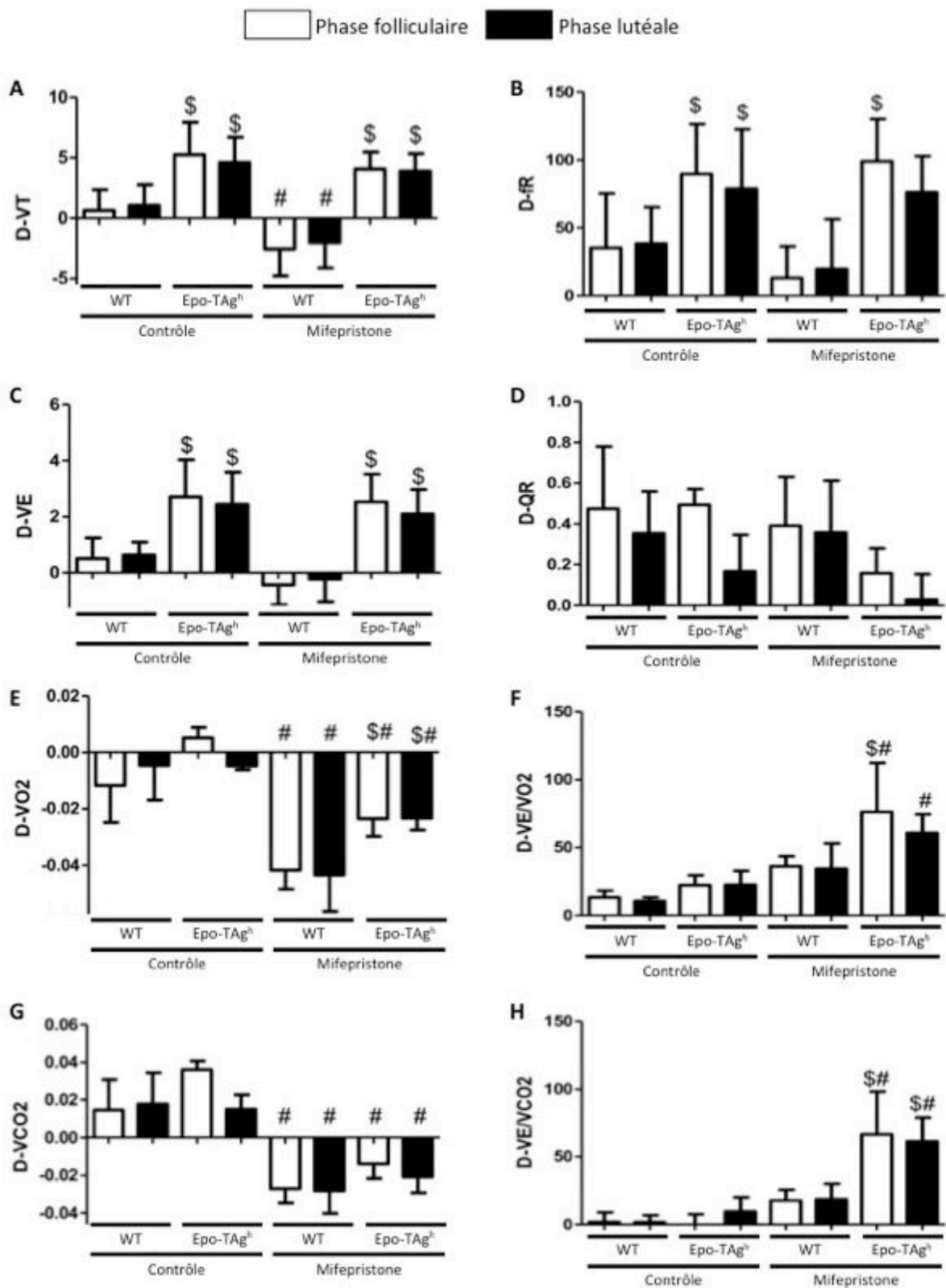


Figure 30 : Deltas des variables ventilatoires et métaboliques chez les WT et les Epo-TAg^h avant et après traitement par la mifepristone. A, D-VT (μg); B, D-fR (Cycles/min); C, D-VE (ml/min/g); D, QR (VCO₂/VO₂); E, D-VO₂ (ml/min/g); F, D-VE/VO₂ (ml/min/g); G, D-VCO₂ (ml/min/g); H, D-VE/VCO₂ (ml/min/g).

\$ p<0.05 vs WT (même condition, même phase), # p<0.05 vs Contrôle (même souche, même phase)

Cette série expérimentale a permis de mettre en évidence un **rôle facilitateur de la progestérone sur la RVHc** chez les souris WT via une action sur le V_T . Ce résultat suggère un rôle potentiel de la progestérone dans la modulation du patron ventilatoire chez les souris WT. De plus, l'absence d'effet de la mifepristone chez les Epo-TAg^h suggère un **lien entre Epo et progestérone** puisque la ventilation des souris Epo-TAg^h n'a pas été affectée par la progestérone contrairement aux souris WT ayant une concentration normale d'Epo. Cependant, d'autres voies impliquées dans le contrôle de la ventilation et modifiées par la déficience en Epo pourraient interagir avec la progestérone. L'ensemble des expériences précédentes a permis de suggérer un **rôle modulateur de l'Epo dans la RVHc, sans que cette hormone ne soit indispensable à l'obtention d'une RVHc normale**. De plus, les expériences d'injection d'Epo ont montré que l'Epo pourrait avoir un **effet au niveau des chémorécepteurs périphériques et centraux** et pourrait **interagir avec les hormones sexuelles femelles**. Nous avons donc entrepris une série expérimentale visant à préciser les sites d'action de l'Epo dans la RVHc.

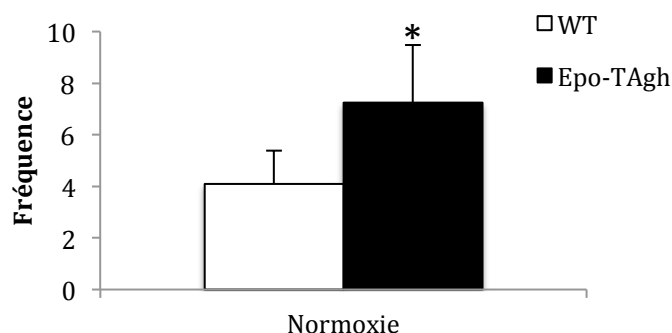
F. Effet central de l'Epo sur la RVHc

L'impact d'une déficience en Epo sur le SNC dans la RVHc a été étudié en utilisant une technique de préparation *en bloc*, qui permet d'enregistrer l'activité du tronc cérébral isolé en étant totalement affranchis des afférences périphériques.

1. Fréquence basale

L'étude des effets de l'Epo a été réalisée sur des préparations *ex vivo* de nouveau né, WT et Epo-TAg^h. L'analyse de la fréquence des bouffées en normoxie a permis de mettre en évidence une différence entre les préparations issues de souris WT et Epo-TAg^h. En effet, ces dernières présentaient une fréquence plus élevée que les WT (Figure 31).

Figure 31 : Fréquence enregistrée au niveau de la racine C4 sur des préparations de bulbes rachidiens *ex vivo* sur des souris WT et Epo-TAg^h, en normoxie.
*p<0.05 vs WT



2. Acidose métabolique

Lorsque les préparations ont été soumises à une acidose métabolique, il a été observé une augmentation de la fréquence des bouffées similaire entre les WT et les Epo-TAg^h (Figure 33A), sans modification de leur amplitude (Figure 32B).

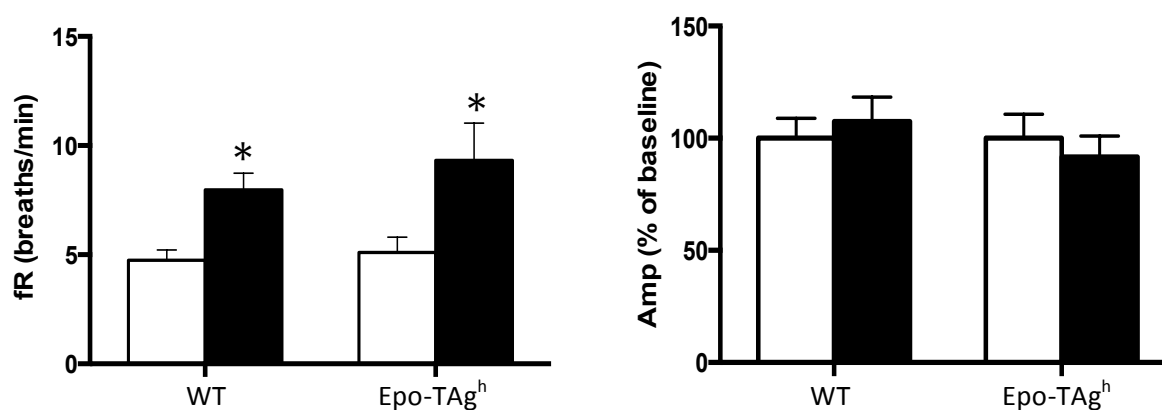


Figure 32 : Fréquence et amplitude enregistrée au niveau de la racine C4 sur une préparation de bulbe rachidien *ex vivo* sur des souris WT et Epo-TAg^h, en normoxie et en acidose. *p<0.05

G. Effet périphérique de l'Epo sur la RVHc

Afin d'étudier le rôle périphérique de l'Epo dans la RVHc, c'est à dire son action sur les corps carotidiens, nous avons entrepris deux séries expérimentale : la première permettant l'enregistrement de l'activité des corps carotidiens *in vivo*, la deuxième utilisant la technique de chémodénervation (section du nerf sinusal carotidien).

1. Effet de l'Epo sur l'activité des corps carotidiens *in vivo* en réponse à l'hypercapnie

Avant de commencer les stimulations hypercapniques, la qualité de l'enregistrement et de l'installation est vérifiée par un test hypoxique et hyperoxique, afin de vérifier la réponse du nerf sinusal.

L'étude de la réponse à l'hypercapnie des corps carotidiens chez les rats a montré une faible augmentation de la fréquence de décharge en réponse à l'hypercapnie similaire entre les mâles et

chez les femelles (Figure 33A, B ; Trait plein). L'injection d'Epo en IV a entraîné une tendance à l'augmentation la durée de la réponse à l'hypercapnie chez les individus mâles (Figure 33C) et une tendance à l'augmentation de la fréquence chez les femelles (Figure 33B ; Trait pointillé).

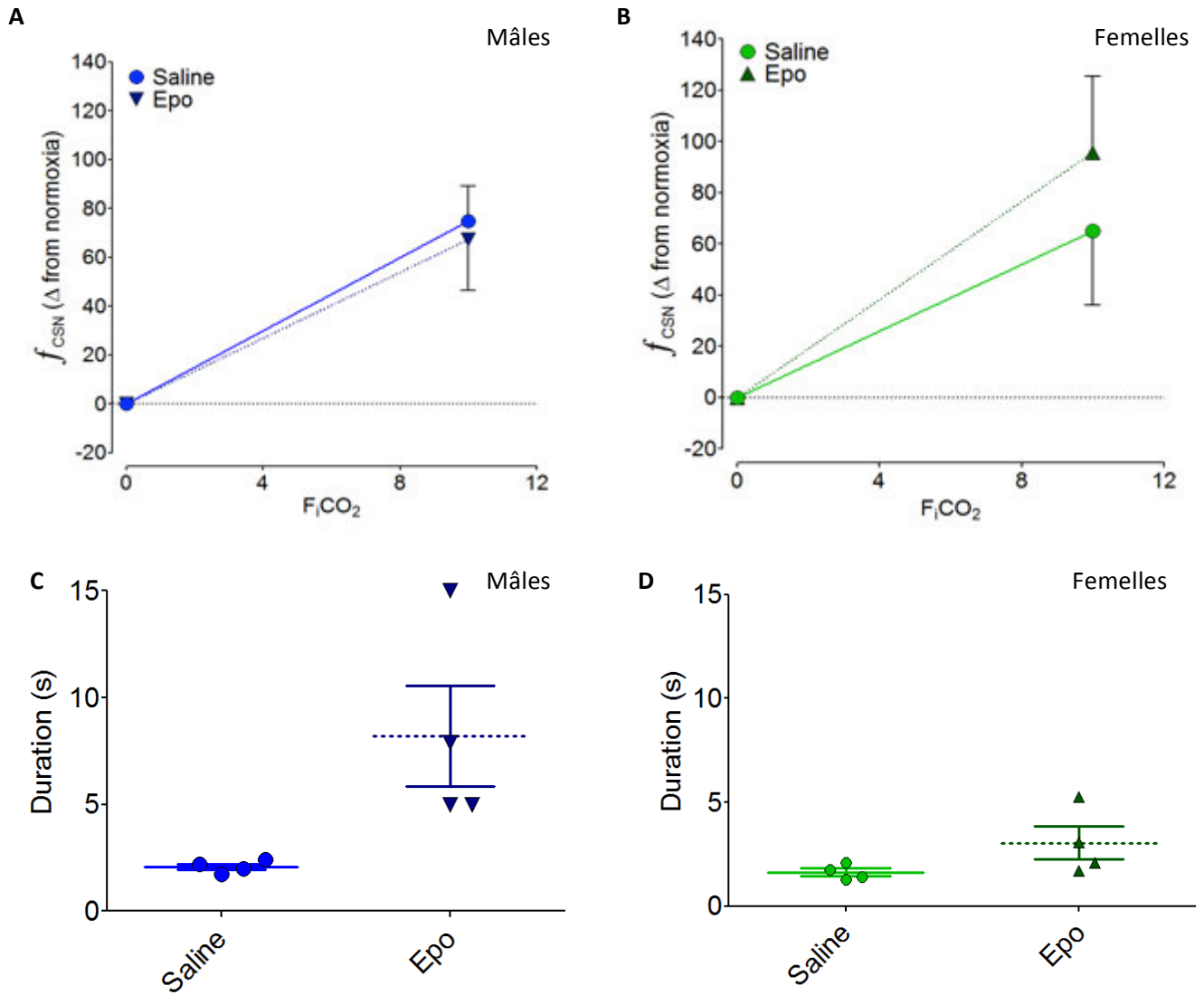


Figure 33 : Fréquence de décharge de corps carotidiens et durée de la réponse à l'hypercapnie chez les rats mâles (A,C) et femelles (B, D) avant et après injection IV d'Epo ou de NaCl (Saline).

2. Déficience en Epo et impact de la chémodénerivation sur la RVHc

a) Ventilation basale

Au niveau de la ventilation basale, la chemodénerivation de nos souris n'a entraîné aucune modification des variables ventilatoires, chez les individus mâles et femelles WT (Tableau 9).

Tableau 10 : variables ventilatoires chez les animaux WT et Epo-TAg^h mâles avant et après chémodénerivation, en normocapnie

	WT		Epo-TAg ^h	
	Pré-Chd	Post-Chd	Pré-Chd	Post-Chd
V_T (µl/g)	6.03 ± 0.59	6.22 ± 0.46	7.21 ± 0.66	7.42 ± 1.38
f_R (cycle/min)	194 ± 19	192 ± 58	199 ± 26	199 ± 37
\dot{V}_E (ml/min/g)	1.20 ± 0.21	1.22 ± 0.07	1.45 ± 0.20	1.52 ± 0.51

b) RVHc

Après chémodénerivation, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation du \dot{V}_E (Figure 34C). Cela était dû à une perte de l'augmentation du V_T chez les WT et les Epo-TAg^h et une perte de l'augmentation de la f_R chez les Epo-TAg^h. De plus, chez les WT, nous avons observé une tendance ($p=0.06$) à la diminution de la f_R en réponse à l'hypercapnie (Figure 34B).

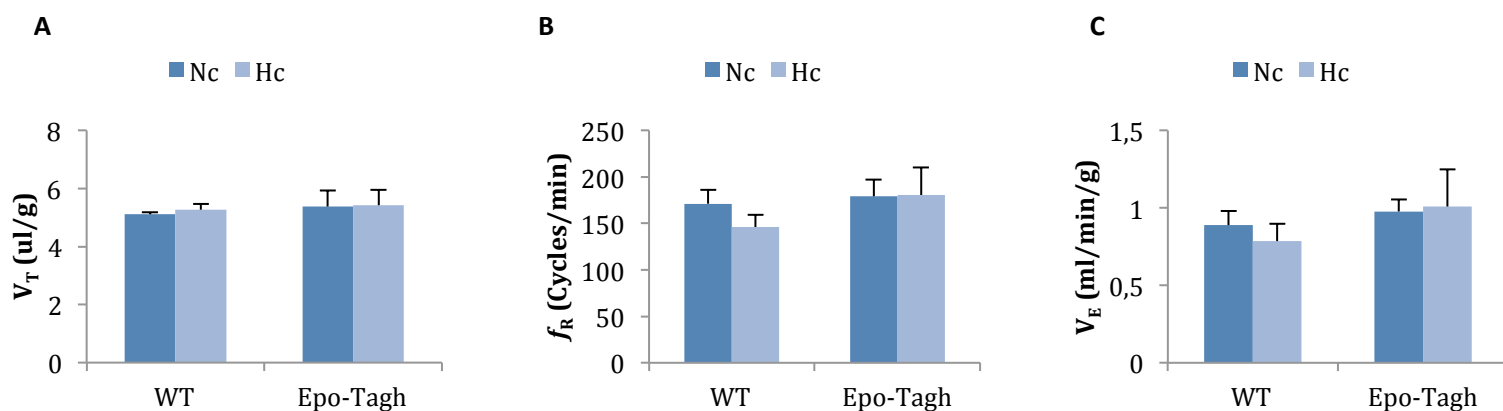


Figure 34 : Paramètres ventilatoires après chémodénerivation chez des individus WT et Epo-TAg^h mâles. Volume courant (A), fréquence respiratoire (B) et débit ventilatoire (C).

Les résultats de ces expériences semblent suggérer une **implication des corps carotidiens dans la RVHc** puisque les souris WT et Epo-TAg^h ont perdu leur capacité de réponse à l'hypercapnie après chémodénervation. De plus, nous n'avons pas observé de différence entre les WT et les Epo-TAg^h au niveau de la réponse à l'acidose sur les préparations ex vivo, ce qui suggère que la chémosensibilité centrale ne serait pas affecté par la déficience en Epo.

DISCUSSION

I. Ventilation basale : implication de l'Epo, des systèmes de neurotransmission et des hormones sexuelles

Si les principales motivations de nos études étaient de mettre en évidence l'influence de différents facteurs, et notamment de l'Epo dans la mise en place des réponses ventilatoires à l'hypoxie et/ou à l'hypercapnie, il n'était pas exclu que ces facteurs puissent induire des modifications sur la ventilation basale ainsi que sur les variables métaboliques et l'activation neuronale en normoxie/normocapnie.

A. Déficience en Epo : impact sur les variables ventilatoires, métaboliques et sur l'activation neuronale

Lors de nos expériences réalisées sur les animaux Epo-TAg^h, présentant une déficience en Epo, nous avons mis en évidence que les individus mâles ne présentaient pas de modifications des variables ventilatoires en comparaison avec les animaux WT. En revanche, chez les Epo-TAg^h femelles, nous avons observé une hyperventilation, due à une valeur du V_T plus importante comparée à celle des WT femelles et qui n'était pas retrouvée avec les individus mâles. Ces premiers résultats étaient en cohérence avec une interaction Epo et hormones sexuelles femelles, que nous détaillerons par la suite. Ces résultats diffèrent quelque peu de ceux obtenus par dans notre laboratoire (Macarlupu, 2006a) et par d'autres études (Matsuoka, 1994; P. Ohtake & Jennings, 1992). En effet, ils avaient observé une hyperventilation également chez les individus mâles. Cela pourrait être au fait que les souris contrôles (WT) utilisées dans les premières expériences n'étaient pas des souris 'littermates' et il a déjà été mis en évidence que les conditions environnementales lors des premiers jours après la naissance peuvent induire des modifications notables, notamment au niveau des variables ventilatoires (D'Amato, 2011).

Concernant l'étude des variables métaboliques, nous avons observé chez les individus Epo-TAg^h mâles une $\dot{V}O_2$ plus faible. Ce résultat avait déjà été observé chez des souris présentant une restriction de l'expression de l'Epo-R (Teng, 2011). Chez ces souris, une baisse de la $\dot{V}O_2$ était

associée à une baisse du QR, ce que nous n'avons pas retrouvé chez notre lignée Epo-TAg^h. Dans cette même étude, un traitement des individus WT par de l'Epo a entraîné une augmentation de la $\dot{V}O_2$. Les effets de l'anémie sur le métabolisme avait déjà été étudié, chez le rat ainsi que chez des patients atteints de diverses pathologies, comme la thalassémie, qui est une forme de d'anémie héréditaire. Chez le rat et le chien, des expériences consistant à diluer le sang de l'animal (hémodilution) ont induit une diminution de la $\dot{V}O_2$ (Cain, 1977; Cilley, 1991; Matsuoka, 1994). De manière intéressante, il a également été mis en évidence dans les expériences de Matsuoka une faible mais significative augmentation du \dot{V}_E suite à l'hémodilution. Pris ensemble, ces résultats suggèrent un rôle de l'Epo dans la régulation des dépenses énergétiques ainsi qu'une potentielle adaptation des souris Epo-TAg^h à la déficience en Epo et/ou à l'anémie.

Lors de l'étude de l'expression de *c-fos* en normocapnie, nous avons mis en évidence que le nombre de cellules activées était le même dans toutes les structures analysées. Cependant, ce résultat ne nous donne que peu d'informations sur les potentielles modifications de fonction/organisation de ces structures induites par la déficience en Epo. Afin de répondre à ces différentes questions, il serait envisageable de caractériser phénotypiquement les cellules exprimant *c-fos*, en utilisant notamment des marqueurs de la sérotonine (5-HT), ou des cellules gliales (GFAP) et/ou neuronales (NeuN), afin de confirmer que la population cellulaire est restée similaire entre nos deux lignées. L'hypothèse d'un effet de la déficience en Epo sur les bioamines sera discutée plus loin (Discussion-5-B).

B. Déficience en Epo et vie en haute altitude

Lorsque l'on compare les paramètres ventilatoires obtenues dans nos deux études, sur le plateau Pika et sur notre lignée déficiente en Epo, nous relevons des similitudes quand à leur adaptation à l'environnement. En effet, si les Epo-TAg^h sont caractérisées par leur faible hémocrite, la mesure des paramètres sanguins chez le plateau Pika a montré qu'ils avaient un taux d'hématocrite et une concentration en hémoglobine inférieure au rat (Article 3). La valeur de l'hématocrite restait néanmoins supérieure à celle de notre lignée Epo-TAg^h. Au niveau des variables ventilatoire, le plateau pika présentait des valeurs de V_T , f_R et \dot{V}_E plus élevées que chez le rat et de manière intéressante, nous avons observé chez les Epo-TAg^h un V_T et un \dot{V}_E plus élevé que chez les WT, du moins pour les femelles. Cela pourrait être du à une similitude dans les mécanismes d'adaptation à une diminution de la quantité d'Epo plasmatique, qui seront à confirmer par des mesures des variables métaboliques chez le plateau Pika.

C. Ventilation et métabolisme basal : implication des hormones sexuelles

Afin de mettre en évidence l'influence des hormones sexuelles sur la ventilation et les variables ventilatoires, nous avons étudié ces variables dans les deux phases du cycle oestral, avant et après traitement par un antagoniste des récepteurs à la progestérone, la mifépristone. Si les phases du cycle et le traitement n'ont eu aucun impact sur les variables métaboliques et cela pour nos deux lignées, le traitement par la mifépristone a entraîné une tendance à l'augmentation du V_T uniquement chez les WT, dans les deux phases du cycle, ce qui a eu pour effet de réduire la différence avec les Epo-TAg^h. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature. En effet, des expériences avaient déjà mis en évidence une augmentation du V_T suite à un traitement par la mifépristone (Fournier, 2012 ; Joseph, 2012), et cela chez le nouveau-né, suggérant un effet de la progestérone dès la naissance dans la régulation de la ventilation. Dans cette même étude, il a aussi été mis en évidence que le traitement n'avait aucun effet sur les variables métaboliques basales. L'observation de nos résultats chez la souris adulte comparés à ces deux précédentes études suggère un effet similaire des hormones sexuelles entre les nouveau-nés et les adultes. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de la mifépristone sur notre lignée Epo-TAg^h, ce qui pourrait suggérer une interaction entre Epo et progestérone et/ou son récepteur.

D. Déficience en Epo et injection d'Epo

Afin de préciser l'action périphérique et/ou centrale de l'Epo, nous avons effectué des injections d'Epo en intraveineuse (effet périphérique) ou en intracisternale (effet central). En normocapnie, des effets ont été observés chez les individus WT femelles (diminution de la f_R en normocapnie après injection IV) et chez les WT mâles (augmentation du V_T en normocapnie après injection IC). En revanche, aucun effet de l'injection (IV ou IC) n'a été retrouvé chez les Epo-TAg^h en normocapnie.

Récemment, il a été mis en évidence que l'Epo pourrait avoir un effet stimulant sur la ventilation chez l'adulte et le nouveau-né (Ballot, 2015) et cela en fonction du sexe. Dans cette étude, des souris ont reçu une injection du récepteur soluble de l'Epo (S-EpoR) en IC. Pour rappel, comme décrit précédemment (Cf. Introduction-III-B-2), le récepteur soluble S-EpoR agit comme un antagoniste car il fixe l'Epo, l'empêchant donc de se fixer sur son récepteur membranaire Epo-R. Cette injection a eu pour effet chez les mâles de diminuer le V_T et chez les femelles d'augmenter le V_T et de diminuer la f_R .

Ce résultat est donc en lien avec nos observations chez les mâles WT, suggérant un effet stimulant de l'Epo sur la ventilation. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de nos injections d'Epo chez les femelles WT. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'étude en question a utilisé une souche différente (C57BL6) de celle dans notre étude (BL6CBAF1) ou par le fait que nous avons injecté de l'Epo et non pas le récepteur soluble, ce qui pourrait toucher d'autres voies de signalisation. Dans la même étude, il a également été mis en évidence une forte diminution de la ventilation après injection de S-EpoR chez le nouveau-né, ce qui suggère une implication de l'Epo dès la naissance dans la régulation de la ventilation. Chez les mâles Epo-TAg^h, l'absence de stimulation de la ventilation par l'injection d'Epo pourrait venir de l'augmentation de l'expression de Epo-R, induite par la déficience en Epo, phénomène qui a déjà été observé chez nos souris Epo-TAg^h (Figure 35). Cela aurait pour effet une saturation plus rapide chez les WT suite à l'injection d'Epo et il pourrait donc être intéressant d'injecter une dose plus élevée d'Epo aux souris Epo-TAg^h, afin de voir si il serait possible d'obtenir un effet stimulant sur la ventilation.

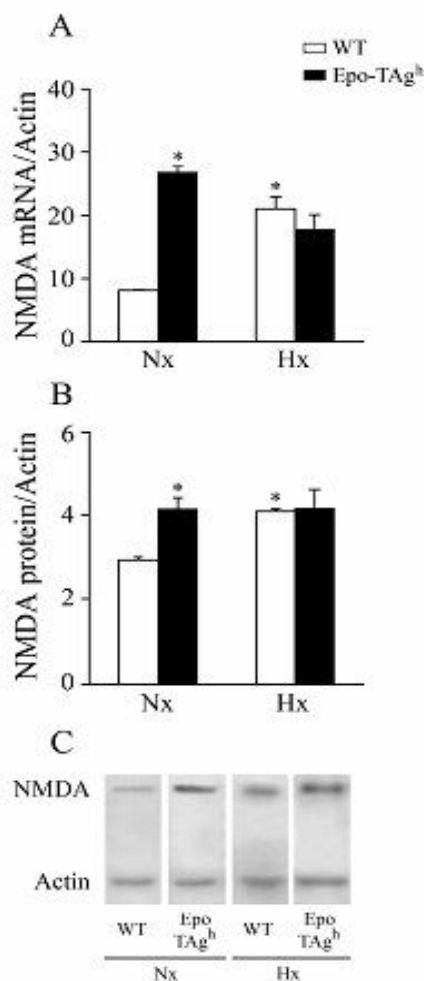


Figure 35 : Expression de Epo-R au niveau du bulbe rachidien chez des souris WT et Epo-TAg^h en normoxie et en hypoxie chronique. ARNm, A ; Protéine, B et C. * p<0.05 vs souris WT en normoxie.

Les différentes études ont montré un lien entre ventilation basale et taux d'Epo plasmatique. Il semble en effet que des variations d'Epo au sein de l'organisme soient capables d'induire des modifications de la ventilation basale, notamment au niveau du V_T , qui semble le plus affecté car il était augmenté et chez les souris Epo-TAg^h. Il semble aussi que l'Epo soit capable d'agir sur les variables métaboliques. Cet effet a déjà été retrouvé chez l'homme, notamment chez des patients présentant une anémie. Chez ses derniers, l'administration d'Epo a entraîné une augmentation de la $\dot{V}O_2$ en exercice (Mancini, 2003). Cette modification du métabolisme aérobie dans le cas de nos souris déficientes à l'Epo pourrait être également un mécanisme adaptatif en réponse à la baisse de la capacité de transport de l' O_2 . De plus, ces premières expériences suggèrent un lien entre déficience en Epo et hormones sexuelles chez les femelles.

II. Adaptations ventilatoires lors de la vie en altitude : exemple du plateau pika

A. Stratégies d'adaptation à l'hypoxie et à l'hypoxie-hypercapnique

1. Considérations méthodologiques

Il est aujourd'hui admis que lors d'une exposition à l'hypoxie, l'organisme met en place des stratégies, notamment ventilatoires et hématologiques, afin de maintenir une oxygénation suffisante des tissus. Ces mécanismes d'adaptation passent notamment par une hyperventilation, qui est bi-phasique pour une stimulation aiguë (Teppema, 2010) ou progressive lors d'une stimulation longue (Powell, 1998). Nous avons donc étudié un animal adapté à la vie en altitude et aux changements de PIO_2 et de $PICO_2$ de part sa vie dans des terriers, afin d'observer les différentes stratégies mises en place pour vivre dans ces conditions extrêmes.

Dans notre étude, nous avons comparé les adaptations à l'hypoxie et à une stimulation hypoxique-hypercapnique entre le rat et le plateau Pika. Les considérations méthodologiques de cette étude sont donc nombreuses, de part l'éloignement entre les deux espèces (lagomorphes et rongeurs) d'une part, et d'autre part du fait que le Pika est un animal sauvage, contrairement au rat. De plus, les rats dans cette études ont été élevés en laboratoire et acclimatés pendant seulement une

semaine, alors que les Pikas ont été prélevés dans leur milieu naturel, et ont donc été soumis à un environnement hypoxique-hypercapnique pendant le développement embryonnaire, ce qui a pu influencer la réponse à l'hypoxie-hypercapnique chez les adultes (Bavis & Mitchell, 2008; Ferner & Mortola, 2009; Julien, 2008; Peyronnet, 2007). Il est donc impossible d'exclure que les résultats obtenus dans notre étude soient du à en partie à une plasticité phénotypique et pas exclusivement à des différences génétiques entre les deux espèces. Enfin, les mesures dans cette étude se sont exclusivement portées sur les variables ventilatoires mais il est envisageable que les différences observées soient aussi partiellement dues à des adaptations métaboliques qui n'ont pas pu être mesurées.

2. Comparaison des adaptations à l'altitude et à l'hypoxie-hypercapnique entre le rat et le Pika

L'étude des différents paramètres sanguins a mis en évidence des adaptations influençant de manière directe le transport de l'oxygène chez le Pika. La concentration en hémoglobine et l'hématocrite étaient plus faibles chez le Pika comparé au rat, confirmant de précédents résultats (Ge, 1998). Le lien entre hémoglobine et meilleur transport de l'O₂ chez le Pika pourraient être liées à d'autres adaptations permettant d'optimiser le transport de l'oxygène par de petits érythrocytes ou *via* des lits capillaires plus larges au niveau des tissus (Beall & Reichsman, 1984, 1998; Li, 2013). Une autre hypothèse serait une augmentation de l'affinité entre O₂ et hémoglobine comme il a déjà été observé chez d'autres espèces vivants dans des terriers, comme la taupe ou la marmotte (Eaton, 1974a, b; Turek, 1973). Différentes observations sont en accord avec cette hypothèse, comme une concentration plus faible en 2,3-DPG (ligand de l'hémoglobine) chez le pika comparé au rat (Ge, 1998) ou le fait que chez le Pika la courbe de dissociation O₂ – hémoglobine soit décalée vers la gauche (Gu, 1991). Enfin, il a été démontré que le Pika présentait des modifications au niveau des chaînes α et β de l'hémoglobine (Yingzhong, 2007), ce qui suggère une implication de l'hémoglobine dans l'adaptation du Pika à la vie en haute altitude. En effet, il a déjà été mis en évidence que des modifications au niveau des chaînes de l'hémoglobine pouvaient induire des changements de conformation et modifier la capacité de l'hémoglobine à fixer l'oxygène (Bunn, 2013; Petruzzelli, 1996).

L'analyse des gaz du sang n'a pas montré une valeur de PaO₂ significativement plus élevée chez les Pika vigiles en hypoxie, comme observé dans une précédente étude (Ge, 1998). Néanmoins, de nombreuses différences méthodologiques entre les deux études pourraient expliquer ces différences,

comme la différence d'altitude simulée (5000m vs 4100) et le fait que les animaux étaient anesthésiés dans l'étude de Ge et al. (1998) contrairement à notre étude, ce qui pourrait avoir induit des modifications au niveau de la ventilation (Sumitra, 2004; Wixson, 1987).

Nous avons également observé chez le Pika un pH plus élevé comparé à celui des rats, ce qui est en adéquation avec la ventilation plus élevée qui a été observée chez le Pika. En effet, l'hyperventilation induite par un stress aigu est responsable d'une diminution de PCO_2 au sein de l'organisme, ce qui va conduire à une augmentation du pH (Ohata, 1981). La mise en évidence d'une meilleure ventilation en hypoxie chez le Pika par rapport à des animaux non acclimatés avait déjà été observée et avait permis de mettre en évidence une adaptation du patron ventilatoire chez le Pika via une augmentation du V_T et du T_i (Pichon, 2009). Comme déjà mis en évidence (Pichon, 2009) les pikas présentaient un ratio T_i/T_{Tot} plus faible et un ratio V_T/T_i plus grand que les rats, suggérant une meilleure ventilation alvéolaire chez le Pika.

Les rats acclimatés à l'hypoxie ont montré une VAH classique avec augmentation progressive de la ventilation. Il est utile de noter que 7 jours d'acclimatation correspond chez le rat à une acclimatation modérée, puisqu'il a été mis en évidence que la VAH était significative à partir de 4 jours et maximale au bout de 10 jours (Schmitt, 1994). Lors de l'étude de la réponse à une stimulation hypoxique-hypercapnique, les rats n'ont pas présentés d'augmentation de la ventilation, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers se sont acclimatés à l'hypoxie chronique, ce qui a pu modifier le seuil de sensibilité des chémorécepteurs centraux et/ou périphériques à l' O_2 et/ou au CO_2 . Néanmoins, il a été montré que chez d'autres rongeurs vivant dans des terriers, une stimulation hypoxique-hypercapnique n'entraînait pas de modifications ventilatoires (Webb & Milsom, 1994). La même stimulation chez le Pika a entraîné une augmentation progressive de la ventilation, ce qui était différents des résultats observés chez d'autres espèces vivant en altitude, et qui présentaient une réponse biphasique comportant une hyperventilation suivi d'une dépression ventilatoire (Barros, 2004). De nombreuses hypothèses pourraient expliquer ces différences comme la durée de la stimulation plus longue dans les autres études (Barros, 2004) ou la variabilité de l'altitude de vie de l'espèce considérée. Le fait que le Pika possède une réponse à l'hypoxie-hypercapnique contrairement à d'autres espèces (Arieli, 1979 ; Walker, 1985 ; Boggs, 1989 ; Barros, 2001) pourrait s'expliquer par une modification des seuils de détection de l' O_2 et du CO_2 par rapport aux autres espèces vivant à des altitudes inférieures. Le plateau Pika serait donc moins sensible aux variations d' O_2 ce qui laisse supposer que le CO_2 serait un stimulus majeur chez cette espèce, expliquant ainsi la réponse linéaire observée en hypoxie-hypercapnique. Une étude chez le rat *C. bishopi* a montré qu'une réponse à l'hypoxie-hypercapnique se manifestait par une réponse ventilatoire similaire à celle obtenue en hypercapnie suivie d'une réponse métabolique similaire à

celle obtenue en hypoxie. Cela suggère bien que la réponse observée chez le Pika serait liée aux mécanismes impliqués dans la RVHc.

B. Réponses ventilatoires et neurotransmetteurs chez le Pika

De nombreuses études avaient déjà mis en évidence le rôle des neurotransmetteurs (NO, glutamate, sérotonine, dopamine...) dans la mise en place des réponses ventilatoires. Dans nos différentes études (Article 2 et Article 3), nous avons mis en évidence une grande conservation de séquence entre le rat et le Pika concernant les gènes codant NMDA-R1 et nNOS, ainsi qu'une plus forte expression de NMDA-R1 chez le Pika. Cette dernière observation présente un grand intérêt car il a été déjà montré un rôle crucial de ce récepteur dans la VAH (El Hasnaoui-Saadani, 2007; Mizusawa, 1994). La présence plus importante de ce récepteur chez le Pika est en concordance avec une étude ayant montré que l'hypoxie-hypercapnique entraînait une augmentation du NMDA-R chez le porcelet (Machaalani & Waters, 2002) ce qui suggère que cette voie de signalisation pourrait être impliquée dans la réponse et l'acclimatation ventilatoire à l'hypoxie-hypercapnie, qui mime la condition de vie dans les terriers.

Le potentiel rôle du NO dans la RVH est un sujet largement étudié. Les nombreuses expériences à ce sujet ont permis de suggérer une implication de cette voie dans la RVH (Prabhakar, 2006) et la VAH (Reid, 2005) *via* une action sur les chémorécepteurs centraux (Schwenke, Pearson, Kangawa, & Shirai, 2006) et les chémorécepteurs périphériques (Bisgard, 2000). Ces effets ont néanmoins été récemment contredits chez le rat (Pamenter, 2015). Chez le pika, l'implication de la voie du NO dans les réponses ventilatoires avait été étudiée précédemment *via* l'utilisation d'un inhibiteur sélectif du nNOS (SMTC), montrant une augmentation de la RVH face à une hypoxie sévère chez les animaux traités (Pichon, 2009). Il a donc été suggéré que le nNOS pourrait permettre de limiter la réponse à l'hypoxie sévère chez le Pika. L'utilisation d'un inhibiteur global de la NO synthase (permettant l'inhibition de nNOS, iNOS et eNOS) dans notre étude n'a pas montré d'effet sur la RVH, malgré une augmentation du V_T et du ratio Ti/T_{Tot} , suggérant une implication plus complexe du NO et de ses précurseurs dans la régulation du patron ventilatoire (El Hasnaoui-Saadani, 2007; Patel, 1998; Article 2).

Il est bien connu que la voie du glutamate, de part sa fixation au niveau des récepteurs NMDA, est impliqué dans le contrôle de la ventilation (Burton, 2000 ; Waters, 2005), notamment au niveau des chémorécepteurs périphériques (Ohtake, 1998). Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs NMDA avait pour effet d'inhiber la RVH mais sans effet sur la ventilation basale, ce qui suggère une implication des NMDA-R dans la mise en place de la RVH chez le Pika, mais pas dans l'acclimatation ou l'adaptation ventilatoire à l'altitude. Le glutamate se fixe aussi sur les récepteurs AMPA et kaïnate, dont on sait qu'ils pourraient aussi être impliqués dans la régulation du patron ventilatoire en hypoxie aigue (Mutolo, 2005) mais pas en hypoxie chronique (McGuire, 2008). Dans notre étude, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AMPA/kaïnate a entraîné une augmentation de la ventilation en hypoxie aigue mais pas au niveau basal. Cela suggère une implication de ces récepteurs dans la régulation de la RVH mais pas dans l'adaptation à l'hypoxie chronique. De plus, la drogue utilisée (DQNX) ne traverse pas la BHE (Tokarev & Jezova, 1997) ce qui suggère l'implication des récepteurs AMPA/kaïnate dans la chémosensibilité périphérique à l'O₂.

Le dernier neurotransmetteur étudié chez le Pika a été la sérotonine. L'implication de la sérotonine dans les réponses ventilatoires a montré qu'une accumulation ou un excès de 5-HT entraînait une diminution de l'activité du nerf phrénique chez le chat (Richter, 1999) et une diminution de la RVH chez la souris (Burnet, 2001). De plus, il a été mis en évidence que l'utilisation de fluoxétine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine) entraînait l'abolition de la RVH chez le nouveau-né *in vitro* (Voituron, 2010). Dans notre étude, l'injection d'un inhibiteur de la recapture de la sérotonine (SERT) a entraîné une diminution de la ventilation en hypoxie, ce qui est cohérent avec une implication de la sérotonine dans la RVH. Ces différentes expériences montrent qu'un excès de 5-HT affecte la réponse respiratoire à l'hypoxie, ce qui pourrait mettre en jeu différents mécanismes aussi bien périphériques que centraux. En effet, il a été mis en évidence que l'injection de 5-HT au niveau de la région des corps carotidiens entraînait des effets sur la ventilation, qui peuvent différer selon les espèces (Douglas & Toh, 1953; Ginzler & Kottegoda, 1954) et qui sont abolis en cas de chémodénervation. De plus, l'action directe de la sérotonine sur le SNC a été mis en évidence en 1979 et a montré une modulation de l'activité neuronale (Fallert, 1979). En plus de son effet central, l'excès de 5-HT pourrait affecter la sensibilité et/ou la réponse des corps carotidiens, puisqu'on sait que la sérotonine est impliqué dans la chémosensibilité à l'O₂ au niveau des corps carotidiens (Prabhakar, 2006). On pourrait aussi imaginer une perte de sensibilité du réseau respiratoire à l'hypoxie ou alors une incapacité du NTS à traiter les informations provenant des corps carotidiens, puisqu'on sait que l'hypoxie induit aussi une libération de sérotonine au niveau du NTS (Kanamaru & Homma, 2009).

L'ensemble de ces résultats a montré de nombreuses adaptations mises en place par notre modèle d'animal, le plateau Pika, afin de pouvoir survivre dans les conditions extrêmes dues à la vie en altitude et dans la profondeur des terriers. Ces derniers ont conservé une réponse à l'hypoxie similaire à celle observée chez les mammifères vivants à basse altitude bien que légèrement amplifiée, ainsi qu'une réponse linéaire et continue à l'hypoxie-hypercapnique, ce qui diffère de la réponse classique observée chez d'autres rongeurs vivants dans des terriers. De plus, quelles que soient les stimulations, le Pika possède une activité respiratoire forte associée à un temps respiratoire invariant ce qui suggère des adaptations spécifiques à ces contraintes environnementales. Ces adaptations pourraient passer par une modification du seuil de chémosensibilité périphérique et/ou centrale (Boggs, 1984). Les mécanismes responsables de ces adaptations restent encore à préciser car malgré une expression plus forte du NMDA-R1 chez le Pika, les récepteurs AMPA/kainate et le NO ne semble pas impliqués dans l'adaptation du Pika à la vie en altitude, c'est à dire au niveau de sa ventilation basale. En revanche, le NO et ses récepteurs semblent impliqués dans la mise en place de la RVH chez le Pika. De plus, la dernière partie de notre étude semble également indiquer une implication de la sérotonine dans la RVH chez le Pika.

III. Réponse ventilatoire à l'hypoxie

A. Considérations méthodologiques : lignée Epo-TAg^h

Dans les premières expériences sur la lignée, il avait été observé une RVH similaire entre les individus WT et Epo-TAg^h (Macarlupu, 2006a). De manière surprenante, dans nos récentes expériences, nous n'avons observé aucune réponse à l'hypoxie (aigue ou chronique) chez cette même lignée de souris (Article 1). Plusieurs théories peuvent être envisagées afin d'expliquer cette différence (Pichon, 2016). La principale hypothèse envisagée serait celle de modifications épigénétiques survenues sur les souris Epo-TAg^h entre 2006 et 2014. En effet, entre les premières expériences de 2006 et celles de 2014, la lignée a donné plus de 30 générations d'animaux. Il n'est donc pas impossible d'envisager qu'il y ait eu des changements permettant à ces souris déficientes en Epo d'améliorer leur transport d'O₂ ce qui auraient entraîné des modifications au niveau de la ventilation pour les dernières générations de souris étudiées (Ivy & Scott, 2014).

Une deuxième problématique autour de notre modèle vient du fait que durant les expériences d'hypoxie chronique réalisées par Macarlupu sur la lignée, les individus Epo-TAg^h ne présentaient pas

d'augmentation significative de l'hématocrite ou de la concentration en hémoglobine après une hypoxie chronique, comme cela est normalement observé chez les individus WT (Macarlupu, 2006b). Cependant, lors d'une étude en 2013 et lors de récentes expériences réalisées dans notre laboratoire, une exposition à l'hypoxie chronique (10 jours) a entraîné une augmentation de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite chez les souris WT et Epo-TAg^h mâles (Tableau 11), ce qui suggère encore une fois la possibilité de modifications épigénétiques au cours des générations chez nos souris Epo-TAg^h afin de compenser la déficience en Epo.

Tableau 11 : paramètres sanguin avant et après 10 jours d'hypoxie chronique, chez des souris WT et Epo-TAg^h mâles

		Normoxie	Hypoxie 10 jours
WT	Hémoglobine (g/dl)	13.81 ± 1.28	18.42 ± 1.17*
	Hématocrite (%)	40.08 ± 4.80	55.49 ± 3.13*
Epo-TAg ^h	Hémoglobine (g/dl)	6.51 ± 0.30	11.05 ± 1.15*
	Hématocrite (%)	17.90 ± 1.03	31.70 ± 4.01*

* $p < 0.05$ vs Normoxie

B. RVH et neurotransmetteurs

1. Effet de l'hypoxie chronique sur la production de NO et l'expression de NMDA-R

L'étude de l'impact d'une déficience en Epo sur les voies du NO et du NMDA a permis de mettre en évidence un lien entre l'Epo et ces différentes voies de signalisation dans la VAH. En effet, en réponse à une exposition à l'hypoxie chronique, nous avons observé une augmentation de l'expression de NMDA-R et de la production de NO qui n'a pas été retrouvé chez les individus Epo-TAg^h. Il a déjà été démontré que l'Epo exerçait un effet modulateur sur l'activité des canaux calciques, *via* la phospholipase C, afin de diminuer la libération des neurotransmetteurs excitateurs et d'augmenter la production de NO (Brines & Cerami, 2005). Selon notre hypothèse, c'est cette diminution des neurotransmetteurs qui serait à l'origine de l'augmentation de l'expression de NMDA-R observée chez les WT et chez le plateau Pika après hypoxie chronique, afin de conserver un maximum d'effet des neurotransmetteurs circulants. Un taux d'Epo suffisant serait donc indispensable pour obtenir une libération suffisante de neurotransmetteurs. De précédentes études

ont déjà permis de mettre en évidence que l'activité neuronale et la libération de neurotransmetteurs était directement influencée par l'Epo (Kawakami, 2000; Koshimura, 1999). Dans ces deux études, il a notamment été montré que l'incubation de cellules possédant l'Epo-R avec de l'Epo entraînait l'augmentation de la production de dopamine, de l'activité TH et de la production de NO (Koshimura, 1999). Cela montre bien un rôle modulateur de l'Epo sur la libération de nombreux neurotransmetteurs, ce qui est en concordance avec nos résultats. Néanmoins, lors de nos expériences, nous avons tout de même observé une augmentation de la production de NO chez les souris Epo-TAg^h après hypoxie chronique suggérant l'implication d'autres voies de signalisation.

2. Implication du NO et du NMDA-R dans la VAH et la RVH

Nous avons utilisé différentes drogues dans notre étude que nous avons injectées par voie intrapéritonéale. Même si ces drogues vont agir au niveau périphérique, nous ne pouvons pas exclure le fait que ces drogues aient pu avoir un effet au niveau du SNC, du au fait que ces drogues peuvent traverser la BHE (Cf. Matériels et méthodes).

L'utilisation d'un inhibiteur du nNOS a permis de confirmer les résultats déjà obtenus (El Hasnaoui-Saadani, 2007), qui suggéraient que la production de NO induite par l'augmentation de l'expression de nNOS en hypoxie chronique pourrait moduler le patron ventilatoire en agissant sur le V_T afin de contribuer à la VAH, mais ne serait pas impliqué dans la RVH. Dans une étude de 2005, il a été montré que l'hypoxie induisait une forte augmentation de l'expression de la protéine nNOS (environ x10) alors que l'activité du nNOS augmentait de manière plus faible (x1,5) suggérant une différence entre expression et activité (Ward, 2005). On pourrait alors penser que l'activité nNOS serait plus faible chez nos souris Epo-TAg^h, ce qui serait en lien avec l'absence de RVH observée. Néanmoins, après 14 jours d'hypoxie chronique, nous avons tout de même observé une faible mais significative RVH chez les souris Epo-TAg^h, qui était abolie après traitement par SMTC. Ces résultats suggèrent que la voie du NO puisse être partiellement impliquée dans la RVH après acclimatation chez ces souris. En 2000, une étude a montré que l'incubation avec de l'Epo (Rhu-Epo) de coupes d'hippocampe chez le rat n'avait pas d'effet sur l'expression ou l'activité de nNOS (Yamamoto, 2000), ce qui suggère que l'Epo n'aurait pas d'action directe sur la voie du NO et impliquerait d'autres mécanismes de contrôle de la ventilation.

L'utilisation d'un antagoniste du NMDA-R a permis de confirmer que la voie de signalisation du glutamate est essentielle dans la RVH et dans la VAH. Il était déjà connu que l'hypoxie entraînait une libération rapide de glutamate induite par la stimulation des chémorécepteurs périphériques (Mizusawa, 1994) et l'activation des NMDA-R au niveau du NTS (Ohtake, 1998), ce qui suggérait une implication du NMDA-R dans la réponse à l'hypoxie. Des expériences de blocage du NMDA-R via l'utilisation de l'antagoniste MK-801 avaient déjà été réalisées et avaient montré l'abolition de la RVH avant et après acclimatation à l'hypoxie (Reid, 2005).

L'ensemble de ces observations a confirmé l'implication du NMDA-R dans la RVH après hypoxie chronique, ce qui suggère une plasticité du NMDA-R dans l'adaptation à l'hypoxie. Chez les souris Epo-TAg^h, l'injection de MK-801 n'a entraîné aucun effet sur le \dot{V}_E mais a entraîné des effets opposés sur la f_R (diminution) et le V_T (augmentation) suggérant un rôle du NMDA-R dans la régulation du patron ventilatoire chez les souris Epo-TAg^h. La similarité de ces observations avec les résultats obtenus chez les WT confirme l'existence d'un mécanisme compensatoire suite au blocage des NMDA-R, afin de maintenir la ventilation basale avant et après acclimatation à l'hypoxie chronique.

L'ensemble des résultats de cette étude a permis de mettre en évidence que le nNOS semble partiellement impliqué dans la RVH chez les souris Epo-TAg^h, comme nous avons pu déjà l'observer chez le plateau pikas. L'augmentation de l'expression de NMDA-R chez les souris Epo-TAg^h suggère l'implication de ces récepteurs dans la VAH. De plus, les récepteurs NMDA semblent cruciaux pour la mise en place de la RVH, comme nous l'avons déjà montré chez les souris Epo-TAg^h (Article 1). Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une plasticité du SNC faisant intervenir le nNOS et le NMDA-R pour la VAH et la RVH, associé à un rôle catalyseur de l'Epo dans l'expression de ces différents neurotransmetteurs.

C. Epo et RVH

1. Déficience en Epo et RVH chez les femelles : compensation par les hormones sexuelles ?

Lors de nos récentes expériences, nous avons étudié les effets d'une déficience en Epo sur la RVH chez les mâles (Article 1), ce qui nous a permis de mettre en évidence une ventilation basale normale des souris Epo-TAg^h par rapport aux WT, mais une absence de RVH et de VAH chez ces

souris Epo-TAg^h. Cela confirme que l'Epo est nécessaire à l'obtention d'une RVH, comme cela avait déjà été démontré (Soliz, 2005). Dans notre étude, la RVH avait été étudiée chez les individus mâles, mais nous avons également récemment étudié la RVH chez des animaux WT et Epo-TAg^h femelles.

De manière surprenante, nous avons observé une réponse à l'hypoxie similaire chez les souris femelles WT et Epo-TAg^h. Néanmoins, si les souris WT ont montré une augmentation du \dot{V}_E via une augmentation du V_T et de la f_R , les souris Epo-TAg^h présentaient une faible augmentation du V_T (non significatif) mais une augmentation de la f_R beaucoup plus importante que les WT (Figure 36).

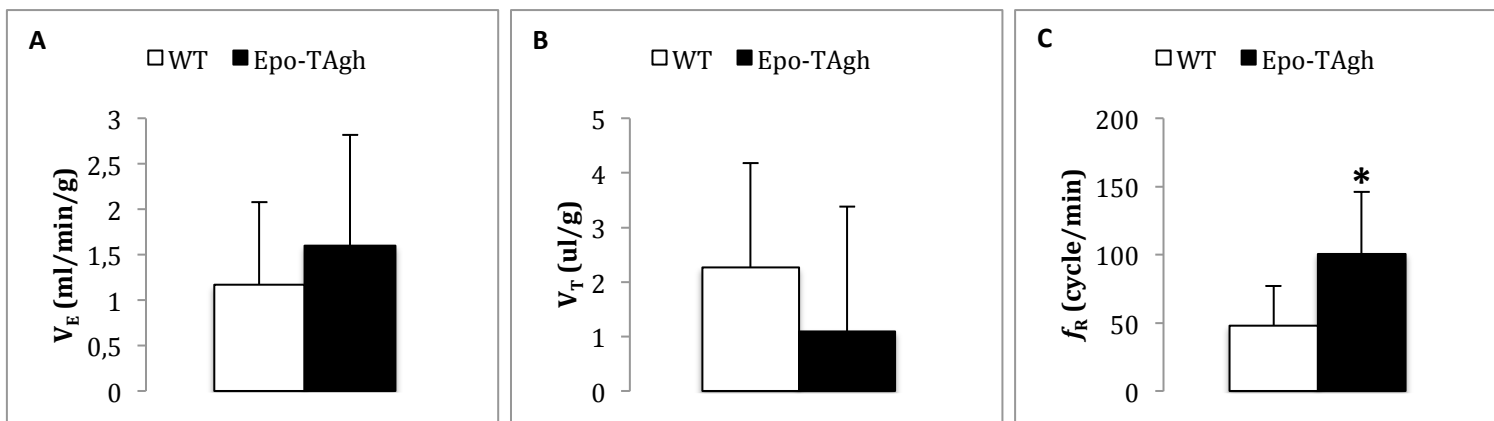


Figure 36 : Réponse ventilatoire à l'hypoxie chez les souris WT et Epo-TAg^h femelles. Débit ventilatoire (V_E , A), volume courant (V_T , B) et fréquence respiratoire (f_R , C). * $p < 0.05$ vs WT.

Ces observations confirment les hypothèses issues d'études précédentes qui suggéraient une interaction entre l'Epo et les hormones sexuelles femelles. De plus, cette interaction pourrait compenser la déficience en Epo et permettrait ainsi aux souris Epo-TAg^h femelles de conserver une RVH « normale », contrairement aux mâles.

En compilant nos différentes études et celles faites par les équipes de Jorge Soliz et Max Gassman, il a été mis en évidence un rôle important de l'Epo dans la RVH. En effet, des modifications dans son expression au sein de l'organisme a entraîné différentes modulations, positives ou négatives, de la RVH, qui sont résumées dans la figure 37.

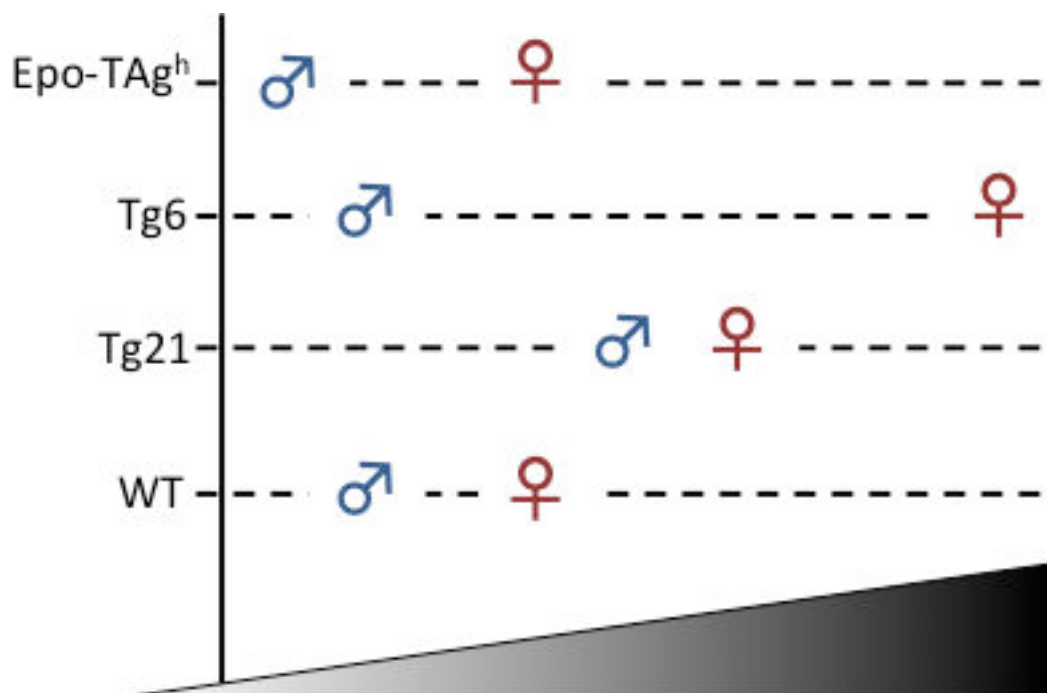


Figure 37 : Réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë pour les mâles et les femelles pour des souris WT ou présentant des modifications de l'expression d'Epo. Adapté de Gassman, 2009.

Nous avons mis en évidence que les souris Epo-TAg^h femelles présentaient une RVH plus importante que les WT femelles, alors que les Epo-TAg^h mâles ne possédaient pas de RVH, ce qui suggérerait l'implication des hormones sexuelles dans la mise en place de la RVH. Les premières observations dans notre étude en cours sont que, tout comme pour la réponse à l'hypercapnie, la phase du cycle oestral n'a aucune influence sur la RVH. Ces résultats étaient différents de ceux de la littérature, qui montrait une RVH différente en fonction du cycle oestral chez les rats femelles (Gargaglioni, 2011; Zabka, 2001), ce qui suggère une action différente des hormones sexuelles en fonction des espèces (rat/souris). Après traitement par la mifepristone, nous avons obtenu les résultats suivants : chez les souris WT, le traitement a entraîné une tendance à l'augmentation de la RVH dans les deux phases, via une augmentation du $D-V_T$ et du $D-f_R$ après traitement (Figure 38B-C). En revanche, chez les Epo-TAg^h, ce même traitement a induit une augmentation du $D-V_T$ mais une diminution du $D-f_R$, ce qui n'a donc pas eu d'impact significatif sur la RVH (Figure 38).

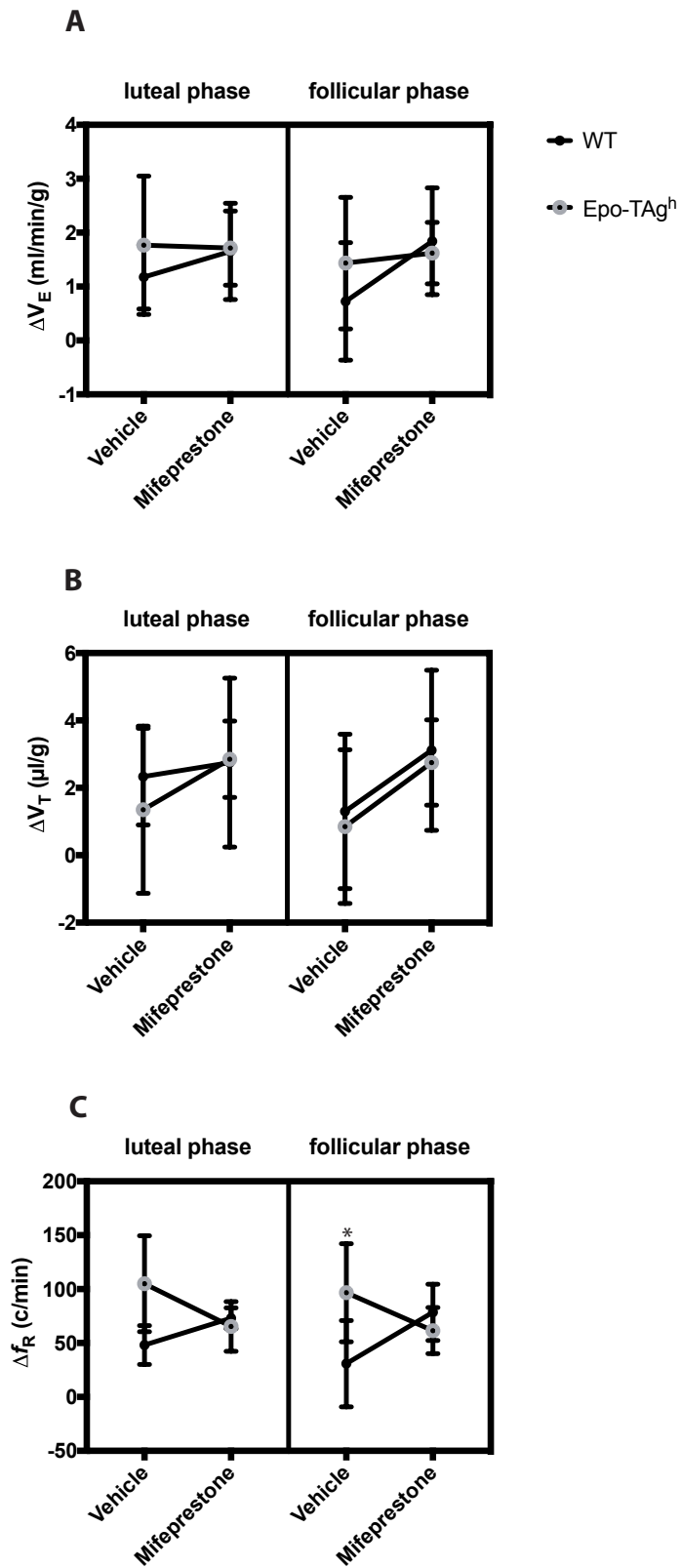


Figure 38 : Deltas des réponses ventilatoires à l'hypoxie aiguë pour les mâles chez les femelles WT et Epo-TAg^h femelles dans les deux phases du cycle oestral, avec et sans traitement par la mifepristone.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans une récente étude ayant montré un rôle crucial des récepteurs membranaires à la progestérone (mPR α et mPR β) dans le contrôle de la ventilation. Dans cette étude, il a été mis en évidence que l'utilisation de siARN contre mPR β avait pour effet d'abolir la réponse à l'hypoxie chez les mâles et les femelles (Boukari, 2016). Cela suggère un effet stimulant de la progestérone et de son récepteur (mPR β) dans la mise en place de la RVH, que nous n'avons pas retrouvé dans notre étude. Cela pourrait s'expliquer par des mécanismes d'action différents entre les siARN et la mifepristone, notamment *via* les récepteurs aux glucocorticoïdes dans le cas de la mifepristone. Nos observations restent néanmoins cohérentes avec une étude ayant montré que la RVH n'était pas modifiée par la mifepristone chez les individus nouveau-nés (Joseph, 2012).

Dans la mise en place de la RVH chez nos souris Epo-TAg^h, On pourrait penser que la déficience en Epo induirait des modifications dans l'expression et/ou le fonctionnement des récepteurs à la progestérone, ce qui permettrait à ce système hormonal de prendre le relais et de compenser la déficience en Epo dans la mise en place de la RVH chez les Epo-TAg^h femelles. Cela serait cohérent avec la littérature dans laquelle plusieurs expériences ont montré une corrélation entre l'expression de Epo-R et des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone dans le cancer du sein (Trost, 2013). De plus, une étude ont mis en évidence une régulation positive de la production d'Epo par la progestérone chez l'Homme (Ogawa, 2003). Si il semble exister un lien entre progestérone et Epo, un expérience a également mis en évidence que l'augmentation de la synthèse d'Epo en cas d'hypoxie chronique était atténuée en cas de traitement avec de l'œstradiol (Mukundan, 2002), ce qui suggère une implication de l'œstradiol dans la RVH et un potentiel lien avec l'Epo.

Cependant, comme pour les différences observées au niveau de la ventilation des souris Epo-TAg^h de lors des premières expériences sur cette lignée (Macarlupu, 2006a), il se pourrait que nos observations soient dues à une adaptation de la lignée au fil des générations et non pas à un effet direct de la déficience en Epo.

2. Epo et chémoréception périphérique dans la RVH

Le rôle de l'Epo, dans la RVH a déjà été étudié sur des souris surexprimant l'Epo soit uniquement au niveau cérébral (Tg21) soit au niveau cérébral et plasmatique (Tg6). Ces différentes expériences menées ont permis de mettre en évidence un effet central et périphérique de l'Epo sur la RVH, car les deux lignées de souris transgéniques présentaient une meilleure RVH que les WT (Figure 37). De plus, il a également été mis en évidence que les corps carotidiens des individus WT

étaient sensibles à l'Epo. De ce fait, l'absence de RVH et de VAH chez nos souris Epo-TAg^h pourrait être due à des défaillances de la chémosensibilité au niveau central mais aussi au niveau périphérique. Au cours des expériences réalisées au Chili, nous avons également étudié les effets de l'injection d'Epo sur l'activité du nerf sinusal carotidien en réponse à une stimulation hypoxique (10% et 5%). De manière surprenante, l'injection d'Epo en intraveineuse n'a entraîné aucun effet sur l'activité basale ou sur la RVH chez les rats mâles et femelles (Figure 39).

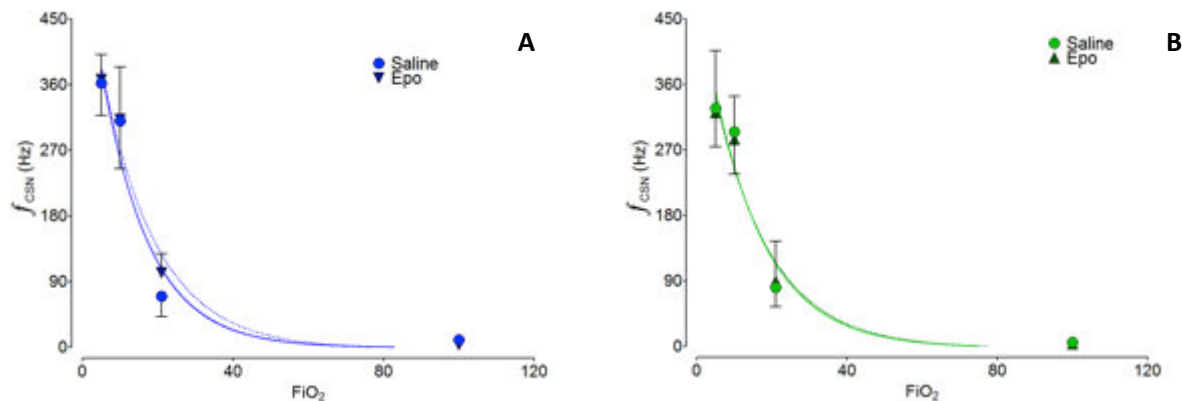


Figure 39 : Evolution de la fréquence de décharge du nerf sinusal carotidien en hypoxie, avec et sans injection d'Epo. Mâles (A) et femelles (B).

Ces résultats sont néanmoins concordants avec ceux obtenus dans différentes études faites chez le rat, dans lesquelles il a été mis en évidence que l'injection IV d'Epo n'avait aucun effet sur les variables ventilatoires basales, contrairement à une injection IC qui entraînait une augmentation du V_T et de la f_R chez le rat anesthésié (Yalcin, 2007). Plus récemment, une étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de l'Epo et de son récepteur au sein des corps carotidiens en réponse à une hypoxie chronique (Lam, 2009). Ces résultats comparés à ceux obtenus par l'équipe de Jorge Soliz suggèrent donc que l'Epo pourrait avoir des modes d'action et des effets différents selon les espèces (rat et souris) et selon les temps de réponse permis (adaptation aiguë ou chronique).

L'ensemble de ces résultats a montré le rôle crucial de l'Epo dans la mise en place de la RVH, comme cela avait déjà été démontré précédemment. Néanmoins, nous avons mis en évidence qu'il pourrait exister des mécanismes de compensation de la déficience en Epo, notamment par les hormones sexuelles chez les femelles. De plus, la comparaison de la littérature avec nos expériences faites en collaboration avec le Chili semble suggérer de façon surprenante que l'Epo ne serait pas impliqué au niveau des corps carotidiens dans la RVH chez le rat, ce qui

pourrait mettre en évidence une action différente de l'Epo entre les espèces (rat et souris). Néanmoins, cela pourrait aussi être dû au nombre faible d'animaux ($n=3$) qui ont été analysés dans cette étude préliminaire.

IV. Rôle de l'Epo dans la RVHc

A. La déficience en Epo modifie le patron ventilatoire dans la RVHc

L'étude de la RVHc chez les souris WT a montré une augmentation de la ventilation via une augmentation du V_T , chez les mâles et les femelles, sans modification de la fréquence respiratoire. Ces observations sont en lien avec des études précédentes qui avaient suggérées une régulation de l'homéostasie au CO_2 majoritairement par le V_T (Ohashi, 2013 ; Wakai, 2015). Contrairement aux WT, les individus Epo-TAg^h ont présenté une augmentation du \dot{V}_E en hypercapnie consécutive à une augmentation du V_T et de la f_R ce qui est en concordance avec une précédente étude ayant suggéré que l'Epo n'était pas nécessaire à l'obtention de la RVHc (Ballot, 2015). De plus, cette modification du patron ventilatoire induit une RVHc plus élevée chez les Epo-TAg^h mâles et femelles. Ces résultats suggèrent donc un effet de l'Epo sur le contrôle du patron ventilatoire en réponse à l'hypercapnie. Nous avons aussi observé chez ces souris une $\dot{V}CO_2$ plus élevée, qui est probablement due au fait que la RVHc est plus grande. De plus, en réponse à l'hypercapnie, les souris WT mâles et femelles ont présenté une diminution de $\dot{V}O_2$, ce qui n'a pas été observé chez les individus Epo-TAg^h, et pourrait être dû à l'hyperventilation plus importante chez ces souris. Le QR était augmenté chez les deux espèces. Il y avait donc chez les souris Epo-TAg^h une réponse différente des WT au niveau de la $\dot{V}CO_2$. On pourrait penser que la déficience en Epo aurait entraîné des modifications dans le transport et/ou la fixation du CO_2 et qui conduirait les souris Epo-TAg^h avoir une ventilation plus élevée que les WT en hypercapnie, afin d'essayer d'éliminer le CO_2 . Nous pourrions aussi imaginer une modification du tampon de CO_2 induit par l'anémie sévère chez ses souris. Cette dernière hypothèse serait à privilégier car une ancienne étude avait suggéré que l'anémie n'entraînait pas de modification dans le transport du CO_2 (Deem, 1997).

Ces premiers résultats suggèrent un impact de la déficience en Epo sur la RVHc, mais nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse de mécanismes compensatoires qui auraient été mis en place par les souris Epo-TAg^h afin de pouvoir faire face à l'hypercapnie malgré leur déficience en Epo. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats, notamment en imaginant que les souris Epo-TAg^h

auraient développées différentes stratégies afin d'augmenter le transport de l'oxygène. Il a été montré dans une étude qu'une hémodilution chez le lapin avait pour effets d'augmenter le débit cardiaque et sanguin au niveau cérébral, sans aucun changement au niveau de la ventilation (Deem, 1999). Ces adaptations pourraient empêcher l'apparition d'une hypercapnie au niveau artérielle, ce qui aurait pour effet de stimuler les chémorécepteurs périphériques et centraux et d'augmenter la ventilation. Chez ces animaux anémiques, une augmentation de la ventilation serait contreproductive de part la forte demande en énergie et en oxygène des muscles respiratoires chez des animaux pour lesquels le transport d'O₂ est déjà limité.

B. La déficience en Epo modifie la chémosensibilité du bulbe rachidien

1. Activation des structures du bulbe rachidien en réponse à l'hypercapnie

La quantification du nombre de cellules activées par l'hypercapnie a montré chez les WT une augmentation de l'expression de *c-fos* dans les zones du bulbe rachidien déjà décrites dans la littérature, comme le NTS et le RTN/pFRG (Okada, 2002; Tankersley, 2002; Teppema, 1997). L'activation de cellules au niveau du NTS pourrait être due à l'augmentation d'activité des corps carotidiens (Fitzgerald & Dehghani, 1982) qui, comme déjà décrit, possèdent des projections au niveau du NTS (Torrealba, 1988 ; Finley, 1992). Chez les Epo-TAg^h, mâles et femelles, nous n'avons pas observé d'augmentation d'expression de *c-fos* au niveau du NTS, ce qui suggère que la déficience en Epo chez ces souris ait pu altérer la capacité du NTS à intégrer les informations provenant des afférences périphériques ou le fonctionnement des corps carotidiens. L'effet de l'Epo sur les corps carotidiens, qui supporterait notre hypothèse, a déjà été étudié récemment, notamment pendant la réponse à l'hypoxie (Soliz, 2005). Dans cette étude, l'injection IV d'Epo avait entraîné une augmentation de la ventilation chez des souris WT. Une autre hypothèse à l'absence d'activité au niveau du NTS serait que la déficience en Epo aurait un effet direct sur le fonctionnement des neurones du NTS, les rendant incapables d'intégrer les informations provenant des corps carotidiens. Différentes études supportent cette hypothèse, notamment au niveau du couplage Epo/Epo-R. En effet, la voie de signalisation entre l'Epo et son récepteur est indispensable au développement cérébral ainsi qu'à la prolifération des cellules progénitrices neuronales (Chen, 2007; Yu, 2002). Il a été démontré que l'Epo était capable de stimuler la prolifération des cellules progénitrices neuronales et d'empêcher l'apoptose de ces cellules via le maintien de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL (Silva, 1996; Sola, 2005). On pourrait donc penser que la

déficiences en Epo aurait pour effet de perturber *in utero* la mise en place du réseau neuronal, notamment au niveau du NTS, ou alors d'altérer son fonctionnement, sans perturber le nombre de neurones mis en place.

L'étude de l'expression de *c-fos* en hypercapnie nous a aussi permis d'observer une augmentation du nombre de cellules marquées au niveau du RTN/pFRG, moins importante chez les Epo-TAg^h que chez les WT, suggérant ainsi une altération du bon fonctionnement de la chémoréception centrale chez les Epo-TAg^h. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le nombre de neurones exprimant Phox2b, ces neurones étant connus pour jouer un rôle majeur dans la chémoréception centrale au CO₂ au niveau du RTN/pFRG (Ruffault, 2015). Nous avons alors observé un nombre global de neurones marqués similaire entre les WT et les Epo-TAg^h. La faible proportion de neurones exprimant *c-fos* chez les Epo-TAg^h ne peut donc pas être associée à un déficit de neurones exprimant Phox2b, ce qui suggère plutôt une modification dans leur fonctionnement. Cela pourrait là aussi être expliqué par une altération dans la mise en place du RTN/pFRG pendant le développement embryonnaire, induite par la déficience en Epo. D'autres hypothèses pourraient expliquer les modifications de fonctionnement du RTN/pFRG. La première serait une implication des cellules gliales et leur habilité à réguler les neurones adjacents *via* des facteurs paracrines (V Gourine, 2010). De plus, les astrocytes étant une source de production d'Epo (Marti, 1996), ils pourraient avoir été affectés par une déficience en Epo, ce qui les aurait rendus moins actifs. C'est cette perte d'activité qui aurait conduit à une plus faible stimulation du RTN/pFRG. Une deuxième hypothèse repose sur l'implication des neurotransmetteurs, comme par exemple les catécholamines, dont les groupes de neurones sont connus pour être sensibles au CO₂ (Haxhiu, 1996), ou à la dopamine, pour laquelle nous avons déjà vu que sa libération était stimulée par l'Epo (Yamamoto, 2000). La déficience en Epo pourrait diminuer l'effet stimulateur des catécholamines et ainsi affecter la chémosensibilité au CO₂.

La principale observation de cette étude vient du fait que malgré l'apparente déficience de chémosensibilité des structures décrites précédemment, nous avons observé chez toutes les souris Epo-TAg^h une hyperventilation, supérieure à celle des individus WT en réponse à l'hypercapnie. Cela suggère donc une activation ou une sur-activation d'autres zones chémosensibles du bulbe rachidien. Nous avons en effet mis en évidence une augmentation significative de l'expression de *c-fos* au niveau des raphés pallidus et magnus chez les souris Epo-TAg^h en réponse à l'hypercapnie. L'intérêt de ces zones est qu'elles contiennent des neurones sérotoninergiques, dont il a été montré qu'ils jouent un rôle important dans la chémosensibilité centrale (Teran, 2014). Dans notre étude, nous avons mis en évidence qu'une majorité de neurones exprimant *c-fos* en hypercapnie étaient sérotoninergiques (expression de 5-HT), surtout au niveau du RPa. De manière intéressante, c'est dans cette même zone que des neurones sérotoninergiques chémosensibles au CO₂ ont été étudiés

(Iceman, 2013), ce qui est en adéquation avec nos résultats. Néanmoins, une récente étude a mis en évidence une autre population de neurones non-sérotoninergique sensibles au CO₂ au sein des raphés (Iceman & Harris, 2014). Ces neurones non-5HT expriment le marqueur NK1-R, dont on sait qu'il joue un rôle dans la modulation de la ventilation. Il a en effet été montré qu'il avait une action excitatrice sur les neurones inspiratoires (Bongianni, 2008; Fong & Potts, 2008) et que des souris mutantes pour le gène NK1-R perdaient leur RVH (Hilaire, 2003). Ce récepteur pourrait donc être impliqué dans la RVHc chez les Epo-TAg^h.

L'ensemble de nos résultats suggère chez les souris Epo-TAg^h une réorganisation du réseau neuronal impliqué dans la RVHc, avec une modification du rôle joué par chaque structure, notamment au niveau du RTN/pFRG. L'activité de cette structure, considérée comme le chémorécepteur central principal, a été diminuée par la déficience en Epo, ce qui a conduit à l'implication d'autres structures, comme les raphés bulbaires. En revanche, même si la déficience en Epo semble entraîner un remodelage au niveau du bulbe rachidien, nous ne pouvons pas exclure l'implication de structures supra-pontiques dans la RVHc chez les Epo-TAg^h, comme notamment le locus coeruleus, la substance grise au niveau du mésencéphale ou encore l'hypothalamus caudal, qui sont des structures connues pour être impliquées dans la chémosensibilité centrale (Fink, 1962; Horn & Waldrop, 1998; Nattie, 1999, 2006).

2. Différences entre mâles et femelles

Lors de l'observation de nos différents résultats, nous avons remarqué une différence dans les zones activées par l'hypercapnie entre les mâles et les femelles WT. En effet, certaines zones du bulbe rachidien ont été activées chez les femelles en hypercapnie mais pas chez les mâles, comme le groupe parapyramidal. Cette structure bilatérale est localisée au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien, le long de l'axe rostro-caudal. Peu d'études se sont intéressées à son implication dans les réponses ventilatoires et/ou la chémosensibilité, mais il a quand même été mis en évidence des propriétés chémosensibles de cette zone (Bradley, 2002; Miura, 1998; Okada, 2002; Reiner, 2000), notamment suite à une stimulation hypercapnique (Issa & Remmers, 1992; Ribas-Salgueiro, 2005). Dans l'étude de Ribas-salgueiro, il a été mis en évidence, en plus de la réponse des neurones du Ppy à l'hypercapnie, que cette structure possédait des projections vers le RPa et le NTS. Ces résultats suggèrent donc un possible rôle de cette structure dans la RVHc. Si l'implication de cette structure dans la RVHc a fait l'objet d'études, il n'existe à ce jour aucune donnée sur un dimorphisme sexuel dans sa réponse au stimulus hypercapnique. L'existence de zones du SNC pouvant être

influencée par le sexe a déjà été mise en évidence, notamment au niveau du locus coeruleus (de Carvalho, 2016). Outre les propriétés chémosensibles déjà décrites, il a été mis en évidence que cette structure avait une taille plus importante chez les femelles, qu'elle possédait plus de neurones et de cellules dendritiques, et qu'elle présentait plus de cellules dopaminergiques (exprimant la dopamine- β -hydroxylase) (Bangasser, 2011; Guillamon, 1988; Luque, 1992). Il serait donc intéressant d'étudier la structure et l'activation de cette zone chez nos souris Epo-TAg^h, d'une part afin de déterminer si cette structure est activée chez nos souris WT et si elle reste fonctionnelle chez les souris déficientes en Epo, mais également afin de savoir si on retrouve chez nos souris (WT et Epo-TAg^h) un dimorphisme sexuel au niveau du LC.

C. Injection d'Epo et RVHc

L'injection d'Epo (IV et IC) n'a entraîné aucun effet sur la RVHc chez les souris WT mâles et femelles. En revanche, un important effet de l'Epo a été mis en évidence chez les femelles Epo-TAg^h. En effet, nous avons mis en évidence que les injections d'Epo entraînaient une diminution significative de la RVHc chez ces souris. De plus, l'injection d'Epo en IV a eu un effet sur le V_T alors que celle en IC a eu un effet sur la f_R . Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses sur le mode d'action de l'Epo ainsi qu'un rôle potentiel des hormones sexuelles dans la régulation de la ventilation et du patron ventilatoire, ce qui est en concordance avec plusieurs études précédentes. Si l'interaction entre Epo et hormones sexuelles a déjà été étudié, il avait été mis en évidence que l'injection d'Epo n'entraînait pas de modifications de la RVHc chez des animaux WT (Ballot, 2015). Ces résultats sont cohérent avec ceux que nous observons chez les souris WT mais différent de nos observations chez les Epo-TAg^h. Comme pour les observations faites en normocapnie, la différence dans les résultats observés entre les deux études peut venir de plusieurs points (Cf. Discussion-I-A). Un des principaux point de différence entre nos deux études sont le temps de latence entre injection et mesure des paramètres ventilatoires. En effet, nous avons attendu 6h entre l'injection IC et les mesures plethysmographique contre 24h dans l'étude de Ballot. Ce temps d'attente très long pourrait expliquer l'absence d'effets observés dans leur étude, car l'injection de S-EpoR pourrait induire des modifications du ratio Epo/S-EpoR et induire une synthèse d'Epo (Villafuerte, 2014).

Nos différentes expériences suggèrent un rôle de l'Epo dans la mise en place du patron ventilatoire lors de la RVHc, chez les mâles et chez les femelles. Notre étude a confirmé que l'Epo n'était pas indispensable pour obtenir une RVHc (Ballot, 2015), mais semblait néanmoins jouer un rôle important dans la mise en place d'un patron ventilatoire spécifique lors d'une stimulation hypercapnique avec une augmentation du V_T uniquement, comme cela avait déjà été montré. De plus, certaines différences entre les souris mâles et femelles WT semblent suggérer un dimorphisme sexuel dans l'implication de certaines structures du SNC. Ces résultats suggèrent un rôle majeur des hormones sexuelles dans la RVHc et la plasticité neuronale en relation avec le contrôle de la ventilation. De plus, même si une récente étude a mis en évidence que l'injection d'Epo ne modifiait pas la RVHc chez des souris WT (Ballot, 2015), nous avons mis en évidence un effet significatif de l'injection d'Epo chez les femelles Epo-TAg^h, ce qui suggère une interaction entre déficience en Epo et hormones sexuelles femelles.

V. Epo et hormones sexuelles femelles

A. Considérations méthodologiques

Lors de cette dernière série expérimentale, les souris utilisées étaient toutes des femelles âgées environ de 10-12 semaines, hors nous avons choisi de suivre le protocole de gavage réalisé dans différentes études faites chez le nouveau-né. Nous devons donc tenir compte de cette différence lors de l'observation et de la compréhension de nos résultats. En effet, les différences observées entre les résultats de ces études et la notre pourraient être attribués au fait que les quantités d'hormones produites chez les nouveau-nés sont faibles (Galeeva, 2010) et qu'ils n'ont encore jamais été exposés aux hormones endogènes comparés aux individus adultes qui possèdent un système hormonal fonctionnel. De ce fait, la dose utilisée dans nos expériences et/ou la durée du traitement pourrait être trop faible pour bloquer totalement les effets de la progestérone. Enfin, la mifépristone a également une forte affinité pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (Healy, 1983; Jung-Testas & Baulieu, 1983; Moguilewsky & Philibert, 1984; Schreiber, 1983) et peut avoir des effets anti-androgéniques (Schreiber, 1983). Nous ne pouvons donc pas exclure que les effets observés soient dus à des effets de la mifépristone sur ces voies d'action, associée ou non au blocage du récepteur à la progestérone.

B. Effet du cycle oestral et de la déficience en Epo sur la RVHc

Comme pour la ventilation basale, nous n'avons pas observé d'effet de la phase du cycle oestral sur la RVHc, chez les WT et chez les Epo-TAG^h. Ces résultats sont concordant avec ceux de la littérature, car le rôle des hormones sexuelles femelles dans la RVHc est un sujet largement débattu (Cf. Introduction). Ces résultats suggèrent donc que les variations de concentration des hormones sexuelles femelles avec le cycle oestral auraient un rôle majoritairement sur la RVH (Joseph, 2002; Pequignot, 1997). Les résultats obtenus chez les souris Epo-TAG^h, montrant une RVHc plus importante que chez les WT quelle que soit la phase du cycle, suggèrent que la réponse pourrait impliquer les hormones sexuelles plus importante chez les souris Epo-TAG^h que chez les WT. De plus, la RVHc plus importante chez les Epo-TAG^h a aussi été retrouvée chez les mâles, ce qui suggère une implication de la testostérone. Parmi les hypothèses envisagées, on pourrait penser que la déficience en Epo chez ces souris et/ou l'anémie ait induit des modifications au niveau de la synthèse et/ou de l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles (progestérone, estrogènes, testostérone). Comme déjà explicité précédemment, le récepteur à la progestérone (mPR β) est impliqué dans les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Boukari, 2016) et les hormones stéroïdiennes sont synthétisées au niveau du SNC (Zwain, 1999). De plus, il a été mis en évidence que le récepteur à la progestérone était exprimé au niveau des corps carotidiens (Joseph, 2006) et que la progestérone jouait un rôle important dans le fonctionnement des corps carotidiens en réponse à l'hypoxie (Joseph, 2012). Le rôle de la progestérone dans la RVH a donc largement été étudié et coïncide avec nos observations faites sur les individus Epo-TAG^h. Cependant, même si son rôle dans la RVHc reste débattu, il semble que la progestérone pourrait être impliqué dans cette réponse, mais en ayant un effet compensatoire, probablement lors d'une défaillance des systèmes classiquement impliqués. Les principales hypothèses portent sur une potentielle interaction entre l'Epo et les bioamines, notamment la sérotonine et les catécholamines. Il a été mis en évidence que les catécholamines étaient impliquées dans la RVH (Soulage, 2003, 2004 ; Hilaire, 2004, 2006) et la RVHc (Biancardi, 2008; Guyenet, 2010; Li & Nattie, 2008). De plus, l'Epo jouerait un rôle modulateur sur la libération des catécholamines (Masuda, 1993 ; Koshimura, 1999 ; Yamamoto, 2000) et que le Epo-R était exprimé au sein de régions catécholaminergiques (Soliz, 2005). Pour ce qui est de la sérotonine, nous avons déjà discuté de la présence de neurones sérotoninergiques au sein des raphés bulbaires (Hilaire, 2010), associée à la présence de neurones GABAergiques dans ces régions (Holmes, 1994; Monti, 2010a, b). De plus, il a été mis en évidence que ces neurones sérotoninergiques joueraient un rôle dans l'activation du RTN (Mulkey, 2007) mais que la 5-HT était également libérée au niveau des corps carotidiens, modulant ainsi leur chémosensibilité (Yokoyama, 2013). Les études sur le lien

entre Epo et sérotonine ont mis en évidence que l'érythropoïèse était stimulée par la 5-HT (Lowy, 1970) et que la 5-HT stimulait la synthèse d'Epo dans l'hippocampe chez les souris (Choi & Son, 2013). Le Epo-R étant présent au niveau du bulbe rachidien (Soliz, 2005), nous pourrions penser à sa présence au niveau des structures sérotoninergiques. Ces études associées à nos observations sur nos souris Epo-TAg^h suggèrent un effet de la déficience en Epo sur les bioamines. *In fine*, ces modifications pourraient conduire à des effets sur la voie du NO.

C. Mifepristone, déficience en Epo et RVHc

L'administration de mifepristone (RU486) chez nos souris WT et Epo-TAg^h a montré un effet sur les variables ventilatoires et métaboliques en hypercapnie. Le principal résultat de cette série expérimentale est l'effet de la mifepristone sur la $\dot{V}O_2$ et la $\dot{V}CO_2$ sur les WT et les Epo-TAg^h. En effet, avant traitement, les deux lignées présentaient une légère diminution de la $\dot{V}O_2$ mais seules les Epo-TAg^h présentaient une augmentation $\dot{V}CO_2$ en réponse à l'hypercapnie. Après traitement par la mifepristone, les deux lignées ont présenté une forte diminution de la $\dot{V}O_2$ et de la $\dot{V}CO_2$ en réponse à l'hypercapnie. Comme évoqué précédemment, la progestérone pourrait avoir un effet stimulateur dans la RVHc, qui ne serait plus possible après utilisation de son antagoniste. On peut donc imaginer qu'un système impliqué dans la régulation du métabolisme prenne le relais afin de permettre de limiter les pertes en O₂ et d'évacuer le CO₂ de l'organisme. Ces modulations au niveau du métabolisme suggèrent une implication du couplage cardio-respiratoire, ce qui implique le couplage entre l'activité du système nerveux sympathique, qui permet de réguler le débit sanguin *via* la pression artérielle et la fréquence cardiaque, et le système ventilatoire afin de permettre des échanges gazeux optimaux et des systèmes en phase. Ce couplage a été mis en évidence notamment par la mise en évidence d'une représentation fonctionnelle du cycle cardiaque au niveau de l'activité des neurones ventilatoires du bulbe rachidien (Dick, 2005). En condition d'hypoxie, on observe une augmentation de la fréquence cardiaque qui est due à l'activité de la voie sympathique (Favret, 2001) mais aussi au couplage cardio-respiratoire (Spyer, 1981, 1994). Les modulations observées au niveau du métabolisme sur nos souris après traitement par la mifepristone pourraient faire appel aux mécanismes impliqués dans ce couplage, comme par exemples les récepteurs β -adrénergiques (Richalet, 1988), qui sont responsables de la stabilisation de la fréquence cardiaque, ou encore les récepteurs muscariniques (Kacimi, 1993) qui participent à l'augmentation du tonus parasympathique.

L'ensemble de ces expériences a mis en évidence une implication de la progestérone dans la RVHc, notamment au niveau des modifications induites sur le métabolisme des souris traitées à la mifépristone. De plus, ces modifications métaboliques traduisent l'implication d'un ou plusieurs autres systèmes ayant pris le relais afin d'assurer les échanges gazeux nécessaires pour évacuer le CO₂, suggérant l'implication des systèmes de couplage cardio-respiratoires.

VI. Effets de l'Epo sur les chémorécepteurs

Lorsque l'on s'intéresse aux données de la littérature, les études montrent que la RVHc est principalement due aux chémorécepteurs centraux, avec une remise en question de l'implication des chémorécepteurs périphériques (Cf. Introduction). Néanmoins, lors de nos différentes expériences sur l'étude des chémorécepteurs, nous avons mis en évidence que sur des préparations de bulbe rachidien *ex vivo*, une stimulation par acidose entraînait une augmentation de la fréquence mais pas de l'amplitude des bouffées. Lors des expériences de chémodénervation, nous avons mis en évidence que les souris WT et Epo-TAg^h chémodénervées perdaient leur capacité de réponse à l'hypercapnie. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux effets de la chémodénervation sur la RVHc. La perte de réponse à l'hypercapnie observée dans notre étude n'est pas en adéquation avec de précédentes études ayant mis en évidence que la RVHc était essentiellement une réponse centrale. Mais dans une récente étude, la chémodénervation chez des chiens a mis en évidence une absence d'hyperventilation en hypercapnie (Smith, 2015). Cela suggère donc la nécessité de la présence des chémorécepteurs périphériques et des corps carotidiens dans l'obtention d'une RVHc classique. Lors de nos expériences d'enregistrement du nerf sinusal carotidien *in vivo* (collaboration avec le Chili), nous avons mis en évidence une réponse faible et transitoire (environ 2,5sec) à l'hypercapnie. On pourrait donc émettre l'hypothèse d'un rôle de déclencheur des corps carotidiens dans la RVHc. Ces derniers seraient activés en premier par un stimulus hypercapnique, afin d'envoyer un « signal » au SNC qui va ensuite déclencher la RVHc. Cette hypothèse serait en lien avec les récents résultats obtenus par Smith, qui montraient la capacité des corps carotidiens à influencer le seuil de sensibilité des chémorécepteurs centraux et leur gain (Smith, 2015).

Lors de cette dernière série expérimentale, après avoir évalué la réponse au CO₂ des corps carotidiens, nous avons injecté de l'Epo en IV, à la même dose utilisée dans nos premières expériences (2000 UI/Kg). Nous avons alors mis en évidence un potentiel effet de l'Epo, de manière

sexe-dépendante. En effet, si l'injection d'Epo a eu un effet sur la durée de la réponse chez les mâles, il a eu un effet sur la fréquence de décharge chez les femelles. Ces résultats suggèrent une action directe de l'Epo sur les corps carotidiens et confirment l'effet sexe-dépendant de l'Epo et l'importance de cette dernière dans le contrôle du patron ventilatoire.

Conclusion générale et perspective

L'ensemble de nos expériences a permis de mieux comprendre les différents mécanismes et facteurs impliqués dans la mise en place des réponses ventilatoires induites par des stimulations hypoxiques et hypercapniques. Nous avons mis en évidence l'implication de la voie du NO et de la sérotonine dans la RVH. L'étude d'un animal adapté à l'altitude a montré que cette adaptation faisait appel à d'autres mécanismes, qui restent encore aujourd'hui à préciser.

En ce qui concerne la réponse à l'hypercapnie, nos expériences réalisées sur des animaux WT et déficients en Epo ont permis de mettre en évidence que l'Epo n'était pas nécessaire à l'obtention d'une RVHc mais qu'un déficit en Epo induisait une modification du patron ventilatoire suite certainement à une plasticité neuronale importante chez notre modèle de souris anémique. L'hyperventilation observée chez les animaux Epo-TAg^h pourrait être due à de nombreux mécanismes, impliquant une communication très fine entre les chémorécepteurs centraux et périphériques et *via* de nombreux neurotransmetteurs ou neuromodulateurs, comme par exemple le monoxyde d'azote et la sérotonine. Le rôle précis de l'Epo dans la régulation de cette réponse ventilatoire reste encore à explorer. Nous avons vu qu'il pourrait exister une interaction entre l'Epo et la voie du NO mais aussi avec les hormones sexuelles femelles, mais seule la progestérone a été testée. Il est envisageable que les estrogènes et/ou la testostérone soient aussi impliqués, ce qui pourrait être étudié chez les souris femelle par des expériences d'ovariectomies. De plus l'équipe de Joseph ayant observé des effets de la mifepristone chez les mâles, nous pourrions envisager de refaire nos expériences de gavage sur nos souris WT et Epo-TAg^h mâles afin de voir si l'on retrouve ou non les mêmes effets du traitement chez les souris Epo-TAg^h, ce qui pourrait suggérer une interaction entre Epo et hormones sexuelles également chez les mâles. Toujours, chez les mâles, suite aux observations de Bachman (Bachman, 2014), il pourrait être intéressant d'inhiber la testostérone chez ces souris et d'observer les effets sur la ventilation et sur la synthèse d'Epo. En parallèle, puisqu'il semble que les hormones sexuelles soient impliquées dans la RVHc, il semblerait judicieux d'étudier la synthèse de ces hormones et l'expression de leurs récepteurs chez nos individus déficients en Epo.

En ce qui concerne la chémoréception centrale, nous avons mis en évidence une modification de la contribution des zones du bulbe rachidien impliquées dans la RVHc chez nos animaux déficients en

Epo. Il serait donc intéressant de continuer l'exploration afin de savoir si d'autres zones sont activées chez les Epo-TAg^h, notamment le locus coeruleus et les régions supra-pontiques. La caractérisation phénotypique des cellules activées par l'hypercapnie dans ces différentes zones sera aussi poursuivie, avec notamment des doubles marquages c-fos/GFAP afin de savoir si il y a une implication des cellules gliales dans le contrôle de la ventilation. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier la mise en place des structures du SNC lors du développement embryonnaire, afin de voir si la déficience en Epo a un impact sur l'apoptose.

Nous avons également entrepris une collaboration avec le Dr Rodrigo del Rio, qui a réalisé des ablations de corps carotidiens chez des souris WT et Epo-TAg^h mâles. Les mesures ventilatoires et métaboliques seront réalisées avant et après la chirurgie chez nos souris. Cette série expérimentale sera associée à une observation phénotypique des corps carotidiens, qui seront récupérés après perfusion en PFA, afin de savoir si la déficience en Epo congénitale a eu un effet sur la structure et/ou le fonctionnement des corps carotidiens.

Enfin, à plus long terme, nous envisageons une nouvelle série expérimentale en utilisant une nouvelle lignée de souris transgénique. Cette lignée, utilisant le système CRE-recombinase, permet de diminuer l'expression du gène PHD2, ce qui a pour effet d'entraîner une expression constitutive de HIF et par conséquent de l'Epo conduisant à une polyglobulie excessive (Minamishima, 2008). L'analyse des réponses ventilatoires et l'activation cellulaire (*c-fos*) en hypoxie et en hypercapnie sur cette lignée seront effectuées afin de mettre en évidence l'impact d'une polyglobulie sur le contrôle de la ventilation.

L'ensemble des expériences complémentaires pourront permettre de comprendre de manière plus précise les mécanismes impliqués dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, et notamment ceux mettant en jeu l'Epo, les hormones sexuelles et les différents neurotransmetteurs présents au niveau du SNC. *In fine*, les résultats obtenus pourraient permettre de mieux comprendre les pathologies respiratoires induites lors de conditions pathologiques telles que l'anémie ou lors des pathologies qui surviennent en haute altitude, comme le mal chronique des montagnes (Maladie de Monge).

Bibliographie

- Aaron, E. A., & Powell, F. L. (1993). Effect of chronic hypoxia on hypoxic ventilatory response in awake rats. *J Appl Physiol*, *74*(4), 1635–1640. Retrieved
- Abbott, S. B. G., Stornetta, R. L., Coates, M. B., & Guyenet, P. G. (2011). Phox2b-Expressing Neurons of the Parafacial Region Regulate Breathing Rate, Inspiration, and Expiration in Conscious Rats. *Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16410–16422.
- Abbott, S. B. G., Stornetta, R. L., Fortuna, M. G., Depuy, S. D., West, G. H., Harris, T. E., & Guyenet, P. G. (2009). Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(18), 5806–19.
- Abbrecht, P., & Littell, J. (1972). Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol*, *32*(1), 54–8.
- Accorsi-Mendonça, D., Castania, J. A., Bonagamba, L. G. H., Machado, B. H., & Leão, R. M. (2011). Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. *Neuroscience*, *197*, 107–120.
- Aicher, S. A., Goldberg, A., Sharma, S., & Pickel, V. M. (2000). μ -Opioid Receptors Present in Vagal Afferents and Their Dendritic Targets in the Medial Nucleus Tractus Solitarius. *Journal of Comparative Neurology*, *422*(2), 181–190.
- Aitken, M. L., Franklin, J. L., Pierson, D. J., & Schoene, R. B. (1986). Influence of body size and gender on control of ventilation. *J Appl Physiol*, *60*(6), 1894–9.
- Aleksandrin, V. V., Tarasova, N. N., & Tarakanov, I. A. (2005). Effect of serotonin on respiration, cerebral circulation, and blood pressure in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *139*(1), 64–67.
- Alheid, G. F., & Mcrimmon, D. R. (2008). Respiratory Physiology & Neurobiology The chemical neuroanatomy of breathing, *164*, 3–11.
- Almaguer-Melian, W., Merceron-Martinez, D., Pavon-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Leon-Martinez, R., Ledon, N., ... Bergado Rosado, J. (2015). Erythropoietin Promotes Neural Plasticity and Spatial Memory Recovery in Fimbria-Fornix-Lesioned Rats. *Neurorehabil Neural Repair*, *29*(10), 979–88.
- Alvarez-Buylla, R. (1951). Oscillographic study on activity of chemoreceptors of the carotid glomus in decerebrated cats. *Arch Inst Cardiol Mex*, *21*, 724–739.
- Amiel, J., Laudier, B., Attié-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., ... Lyonnet, S. (2003). Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nature genetics*, *33*(4), 459–461.
- Andresen, M. C., & Peters, J. H. (2008). Comparison of baroreceptive to other afferent synaptic transmission to the medial solitary tract nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *295*, 2032–2042.

- Ang, R. C., Hoop, B., & Kazemi, H. (1992). Role of glutamate as the central neurotransmitter in the hypoxic ventilatory response. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 72(4), 1480–7.
- Arcasoy, M. O., Jiang, X., & Haroon, Z. a. (2003). Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 307(4), 999–1007.
- Arieli, R., & Ar, A. (1979). Ventilation of a fossorial mammal (*Spalax ehrenbergi*) in hypoxic and hypercapnic conditions. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 47(5), 1011–7.
- Bachman, E., Trivison, T., Basaria, S., Davda, M., Guo, W., Li, M., ... Bhasin, S. (2014). Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(6), 725–35.
- Bai, Z., Voituren, N., Wuren, T., Jeton, F., Jin, G., Marchant, D., ... Pichon, A. P. (2015). Role of glutamate and serotonin on the hypoxic ventilatory response in high-altitude-adapted plateau Pika. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 212-214, 39–45.
- Bailey, T. W., Appleyard, S. M., Jin, Y.-H., & Andresen, M. C. (2008). Organization and properties of GABAergic neurons in solitary tract nucleus (NTS). *Journal of neurophysiology*, 99(4), 1712–22.
- Ballot, O., Joseph, V., & Soliz, J. (2015). Endogenous brain erythropoietin is a potent sex-specific respiratory stimulant in adult and newborn mice. *J Appl Physiol*, 118(11), 1386–95.
- Bamford, O. S., Sterni, L. M., Wasicko, M. J., Montrose, M. H., & Carroll, J. L. (1999). Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *The American journal of physiology*, 276(5 Pt 1), L875–84.
- Bangasser, D. A., Zhang, X., Garachh, V., Hanhauser, E., & Valentino, R. J. (2011). Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: a structural basis for sex differences in emotional arousal. *Physiol Behav*, 103(3-4), 342–351.
- Barros, R. C. H., & Branco, L. G. S. (2002). Central dopamine modulates anapyrexia but not hyperventilation induced by hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 92(3), 975–81.
- Barros, R. C., Zimmer, M. E., Branco, L. G., & Milsom, W. K. (2001). Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(2), 603–12.
- Bartlett, D., & Tenney, S. M. (1970). Control of breathing in experimental anemia. *Respiration Physiology*, 10(3), 384–395.
- Bautista, T. G., Burke, P. G. R., Sun, Q. J., Berkowitz, R. G., & Pilowsky, P. M. (2010). The generation of post-inspiratory activity in laryngeal motoneurons: A review. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 669, 143–149.
- Bavis, R. W., & Mitchell, G. S. (2008). Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *J Appl Physiol*, 104(4), 1220–9.
- Bayliss, D. a, & Millhorn, D. E. (1992). Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 73(2), 393–404.

- Bayliss, D. a, Millhorn, D. E., Gallman, E. a, & Cidlowski, J. a. (1987). Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(21), 7788–92.
- Baynes, R. D., Reddy, G. K., Shih, Y. J., Skikne, B. S., & Cook, J. D. (1993). Serum form of the erythropoietin receptor identified by a sequence-specific peptide antibody. *Blood*, *82*(7), 2088–2095.
- Bazzigaluppi, P., Dufour, S., & Carlen, P. L. (2015). Wide field fluorescent imaging of extracellular spatiotemporal potassium dynamics in vivo. *NeuroImage*, *104*, 110–116.
- Beall, C. M., Brittenham, G. M., Strohl, K. P., Blangero, J., Williams-Blangero, S., Goldstein, M. C., ... Gonzales, C. (1998). Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara. *American Journal of Physical Anthropology*, *106*(3), 385–400.
- Beall, C. M., & Reichsman, a B. (1984). Hemoglobin levels in a Himalayan high altitude population. *American Journal of Physical Anthropology*, *63*(3), 301–6.
- Beleslin-Cokic, B. B., Cokic, V. P., Yu, X., Weksler, B. B., Schechter, A. N., & Noguchi, C. T. (2004). Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*, *104*(7), 2073–2080.
- Berger, A. (1979). Distribution of carotid sinus nerve afferent fibers to solitary tract nuclei of the cat using transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience Letters*, *14*, 153–158.
- Bernaudin, M., Bellail, A., Marti, H., Yvon, A., Vivien, D., Duchatelle, I., ... Petit, E. (2000). Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*, *30*(3), 271–8.
- Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., Mackenzie, E. T., & Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, *19*(6), 643–651.
- Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., & Larnicol, N. (2000). Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. *Brain Research*, *857*(1-2), 30–40.
- Bert, P. (1878). La pression barométrique: recherches de physiologie expérimentale. *Paris : Masson*.
- Biancardi, V., Bicego, K., Almeida, M., & Gargaglioni, L. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *PLoS Arch.*, *455*(6), 1119–28.
- Bianchi, A., Denavit-Saubie, M., & Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev*, *75*, 1–45.
- Bianchi, A. L., & Gestreau, C. (2009). Respiratory Physiology & Neurobiology The brainstem respiratory network : An overview of a half century of research, *168*, 4–12.
- Bin-Jaliah, I., Ammar, H. I., Mikhailidis, D. P., Dallak, M. A., Al Hashem, F. H., Haidara, M. A., Isenovic, E. R. (2010). Cardiac adaptive responses after hypoxia in an experimental model. *Angiology*, *61*(2), 145–156.

- Binley, K., Askham, Z., Iqbal, S., Spearman, H., Martin, L., De Alwis, M., ... Naylor, S. (2002). Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood*, *100*(7), 2406–2413.
- Biscoe, T. J., Purves, M. J., & Sampson, S. R. (1970). The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *The Journal of physiology*, *208*(1), 121–31.
- Bisgard, G. E. (1995). Increase in carotid body sensitivity during sustained hypoxia. *Biol Signals*, *4*(5), 292–297.
- Bisgard, G. E. (2000). Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respiration Physiology*, *121*(2-3), 237–246. [http://doi.org/10.1016/S0034-5687\(00\)00131-6](http://doi.org/10.1016/S0034-5687(00)00131-6)
- Bissonnette, J. M. (2000). Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *278*(6), R1391–400.
- Black, A., Mc Closkey, D., & Torrance, R. (1971). The responses of carotid body chemoreceptors in the cat to sudden changes of hypercapnic and hypoxic stimuli. *Respiration Physiology*, *13*, 36–49.
- Blain, G. M., Smith, C. a, Henderson, K. S., & Dempsey, J. a. (2010). Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *The Journal of physiology*, *588*(Pt 13), 2455–71.
- Blanco, C. E., Dawes, G. S., Hanson, M. A., & McCooke, H. B. (1984). The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs. *The Journal of physiology*, *351*(1984), 25–37.
- Blanco, C. E., Hanson, M. A., & McCooke, H. B. (1988). Effects on carotid chemoreceptor resetting of pulmonary ventilation in the fetal lamb in utero. *Journal of developmental physiology*, *10*(2), 167–74.
- Bocking, A. D. (2003). Assessment of fetal heart rate and fetal movements in detecting oxygen deprivation in-utero. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 110.
- Boddy, K., Dawes, G. S., Fisher, R., Pinter, S., & Robinson, J. S. (1974). Foetal respiratory movements, electrocortical and cardiovascular responses to hypoxaemia and hypercapnia in sheep. *The Journal of physiology*, *243*(3), 599–618.
- Bodineau, L., Cayetanot, F., & Frugière, A. (2000a). Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an in vitro study in neonatal rat. *Neuroscience Letters*, *295*(1-2), 67–9.
- Bodineau, L., Frugière, A., Marlot, D., & Wallois, F. (2000b). Effect of hypoxia on the activity of respiratory and non-respiratory modulated retrotrapezoid neurons of the cat. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *86*(1-2), 70–77.
- Bodineau, L., & Larnicol, N. (2001). Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience*, *108*(4), 643–653.

- Boggs, D., & Birchard, G. (1989). Cardio-respiratory responses of the woodchuck and porcupine to CO₂ and hypoxia. *J Comp Physiol*, *158B*, 641–648.
- Boggs, D., Kilgore Jr, D., & Birchard, G. (1984). Respiratory physiology of burrowing mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, *77*, 1–7.
- Bongianni, F., Mutolo, D., Cinelli, E., & Pantaleo, T. (2008). Neurokinin receptor modulation of respiratory activity in the rabbit. *The European journal of neuroscience*, *27*(12), 3233–43.
- Bonis, J. M., Neumueller, S. E., Krause, K. L., Kiner, T., Smith, A., Marshall, B. D., ... Forster, H. V. (2010). The pontine respiratory group, particularly the Kölliker-Fuse nucleus, mediates phases of the hypoxic ventilatory response in unanesthetized goats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *108*(5), 1321–35.
- Bonora, M., & Gautier, H. (1987). Maturational changes in body temperature and ventilation during hypoxia in kittens. *Respiration Physiology*, *68*(3), 359–70.
- Bonora, M., Marlot, D., Gautier, H., & Duron, B. (1984). Effects of hypoxia on ventilation during postnatal development in conscious kittens. *J. Appl. Physiol.*, *56*(6), 1464–71.
- Bou-Flores, C., Lajard, A. M., Monteau, R., De Maeyer, E., Seif, I., Lanoir, J., & Hilaire, G. (2000). Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess. *Journal of Neuroscience*, *20*(12), 4646–4656.
- Boukari, R., Rossignol, O., Baldy, C., Marcouiller, F., Bairam, A., & Joseph, V. (2016). MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTOR β , BUT NOT α , IN DORSAL BRAINSTEM ESTABLISHES SEX-SPECIFIC CHEMOREFLEX RESPONSES AND REDUCES APNEA FREQUENCY IN ADULT MICE. *J Appl Physiol*.
- Bouvier, J., Thoby-Brisson, M., Renier, N., Dubreuil, V., Ericson, J., Champagnat, J., ... Fortin, G. (2010). Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nature neuroscience*, *13*(9), 1066–1074.
- Bradley, S. R., Pieribone, V. A., Wang, W., Severson, C. A., Jacobs, R. A., & Richerson, G. B. (2002). Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. *Nature neuroscience*, *5*(5), 401–2.
- Brines, M., & Cerami, A. (2005). Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(6), 484–94.
- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., ... Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(19), 10526–31.
- Brinton, R. D., Thompson, R. F., Foy, M. R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C. E., ... Nilsen, J. (2009). Progesterone Receptors: Form and Function in Brain. *Front Neuroendocrinol*, *29*(2), 313–339.
- Bruce, E., & Cherniack, N. (1987). Central chemoreceptors. *J. Appl. Physiol.*, *62*, 389–402.
- Brugniaux, J. V., Pialoux, V., Foster, G. E., Duggan, C. T. C., Eliasziw, M., Hanly, P. J., & Poulin, M. J. (2011). Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and

- ventilation in humans. *European Respiratory Journal*, 37(4), 880–887.
- Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3).
- Bureau, M. a, & Bégin, R. (1982). Postnatal maturation of the respiratory response to O₂ in awake newborn lambs. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 52(2), 428–33.
- Bureau, M. A., Lamarche, J., Foulon, P., & Dalle, D. (1985). The ventilatory response to hypoxia in the newborn lamb after carotid body denervation. *Respiration Physiology*, 60(1), 109–119.
- Burnet, H., Bevorgut, M., Chakri, F., Bou-Flores, C., Coulon, P., Gaytan, S., ... Hilaire, G. (2001). Altered respiratory activity and respiratory regulations in adult monoamine oxidase A-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), 5212–21.
- Burton, M. D., & Kazemi, H. (2000). Neurotransmitters in central respiratory control. *Respiration Physiology*. 122, 111–121).
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4).
- Cahan, C., Hoekje, P. L., Goldwasser, E., Decker, M. J., & Strohl, K. P. (1990). Assessing the characteristic between length of hypoxic exposure and serum erythropoietin levels. *The American journal of physiology*, 258(4 Pt 2), R1016–21.
- Cai, Z., & Semenza, G. (2004). Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 109(17), 2050–3.
- Cain, S. M. (1977). Oxygen delivery and uptake in dogs during anemic and hypoxic hypoxia. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 42(2), 228–34.
- Cardenas, H., & Zapata, P. (1981). Dopamine-induced ventilatory depression in the rat, mediated by carotid nerve afferents. *Neuroscience Letters*, 24(1), 29–33.
- Carroll, J., Bamford, O., & Fitzgerald, R. (1993). Postnatal maturation of carotid chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ in the cat. *J. Appl. Physiol.*, 75(6), 2383–91.
- Carroll, M. S., Patwari, P. P., & Weese-Mayer, D. E. (2010). Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 108(4), 979–988.
- Carroll, R., & Bureau, M. (1987). Decline in peripheral chemoreceptor excitatory stimulation during acute hypoxia in the lamb. *J. Appl. Physiol.*, 63(2), 795–802.
- Champagnat, J., Morin-Surun, M.-P., Bouvier, J., Thoby-Brisson, M., & Fortin, G. (2011). Prenatal development of central rhythm generation. *Respiratory physiology & neurobiology*, 178(1), 146–55.
- Chavez, J., Baranova, O., Lin, J., & Pichiule, P. (2006). The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical

- astrocytes. *J Neurosci*, 26(37), 9471–81.
- Chen, X., Wang, S., Du, J., & XC, C. (2007). Diversities in hepatic HIF-1, IGF-I/IGFBP-1, LDH/ICD, and their mRNA expressions induced by CoCl₂ in Qinghai-Tibetan plateau mammals and sea level mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(1), R516–26.
- Chen, Y., Imai, H., Ito, A., & Saito, N. (2013). Novel modified method for injection into the cerebrospinal fluid via the cerebellomedullary cistern in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 73(2), 304–11.
- Chen, Z. Y., Asavaritikrai, P., Prchal, J. T., & Noguchi, C. T. (2007). Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem*, 282(35), 25875–25883.
- Choi, M., & Son, H. (2013). Effects of serotonin on erythropoietin expression in mouse hippocampus. *Exp Neurobiol*, 22(1), 45–50.
- Chou, C. F., Tohari, S., Brenner, S., & Venkatesh, B. (2004). Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood*, 104(5), 1498–1503.
- Cilley, R. E., Scharenberg, A. M., Bongiorno, P. F., Guire, K. E., & Bartlett, R. H. (1991). Low oxygen delivery produced by anemia, hypoxia, and low cardiac output. *Journal of Surgical Research*, 51(5), 425–433.
- Ciriello, J., Hochstenbach, S., & Roder, S. (1994). Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. *I.R.A Barraco (Ed.), Nucleus of the solitary tract, CRC Press, Boca Raton, FL*, 35–49.
- Ciriello, J., & Moreau, J. M. (2013). Systemic administration of leptin potentiates the response of neurons in the nucleus of the solitary tract to chemoreceptor activation in the rat. *Neuroscience*, 229, 88–99.
- Cistulli, P., & Sullivan, C. (1994). Pathophysiology of sleep apnoea. *Saunders, NA.; Sullivan, CE., editors. Sleep and Breathing. New York: Marcel Dekker*, 405–448.
- Clewlow, F., Dawes, G. S., Johnston, B. M., & Walker, D. W. (1983). Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol*, 341, 463–476.
- Coates, E. L., Li, a, & Nattie, E. E. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *Journal of Applied Physiology*, 75(1), 5–14.
- Corcoran, A., & O'Connor, J. J. (2013). Hypoxia-inducible factor signalling mechanisms in the central nervous system. *Acta Physiologica*.
- D'Amato, F. R., Zanettini, C., Lampis, V., Coccurello, R., Pascucci, T., Ventura, R., ... Battaglia, M. (2011). Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO₂ sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS ONE*, 6(4).
- Da Silva, G. S. F., Giusti, H., Castro, O. W., Garcia-Cairasco, N., Gargaglioni, L. H., Branco, L. G. S., & Glass, M. L. (2013). Serotonergic neurons in the nucleus raphé obscurus are not involved in the ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxia in adult rats. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 187(2), 139–148.

- Dahan, A., Nieuwenhuijs, D., & Teppema, L. (2007). Plasticity of central chemoreceptors: Effect of bilateral carotid body resection on central CO₂ sensitivity. *PLoS Medicine*, 4(7), 1195–1204.
- Dale, E. A., Satriotomo, I., & Mitchell, G. S. (2012). Cervical spinal erythropoietin induces phrenic motor facilitation via extracellular signal-regulated protein kinase and Akt signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(17), 5973–83.
- Darnall, R. a, Green, G., Pinto, L., & Hart, N. (1991). Effect of acute hypoxia on respiration and brain stem blood flow in the piglet. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 70(1), 251–259.
- Davies, R. O., & Kalia, M. (1981). Carotid sinus nerve projections to the brain stem in the cat. *Brain Research Bulletin*, 6(4-6), 531–541.
- Davis, S. E., Solhied, G., Castillo, M., Dwinell, M., Brozoski, D., & Forster, H. V. (2006). Postnatal developmental changes in CO₂ sensitivity in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 101(4), 1097–103.
- Dawes, G. S. (1984). The central control of fetal breathing and skeletal muscle movements. *The Journal of physiology*, 346, 1–18.
- Dawes, G. S., Gardner, W. N., Johnston, B. M., & Walker, D. W. (1983). Breathing in fetal lambs: The effect of brain stem section. *Journal of Physiology*, 335, 535–553.
- Dawes, G. S., Walker, D. W., & Johnston, B. M. (1981). The central control of fetal breathing and movements. *Ciba Foundation symposium*, 86, 295–307.
- de Carvalho, D., Bicego, K. C., de Castro, O. W., da Silva, G. S. F., Garcia-Cairasco, N., & Gargaglioni, L. H. (2010). Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 172(1-2), 24–31.
- de Carvalho, D., Marques, D. A., Bernuci, M. P., Leite, C. M., Araújo-Lopes, R., Anselmo-Franci, J., ... Gargaglioni, L. H. (2016). Role of sex hormones in hypercapnia-induced activation of the locus coeruleus in female and male rats. *Neuroscience*, 313, 36–45.
- De Castro, D., Lipski, J., & Kanjhan, R. (1994). Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. *Brain Research*, 639(1), 49–56.
- De Castro, F. (1926). Sur la structure et l'innervation de la glande inter-carotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glosopharyngien. *Trav. Lab. Rech. Biol*, 24, 365–432.
- De Kock, L. (1954). The intra-glomerular tissues of the carotid body. *Acta Anat (Basel)*, 21(2), 101–16.
- Deem, S., Alberts, M., Bishop, M., Bidani, A., & Swenson, E. (1997). CO₂ transport in normovolemic anemia: complete compensation and stability of blood CO₂ tensions. *J Appl Physiol (1985)*, 83(1), 240–6.
- Deem, S., Hedges, R. G., McKinney, S., Polissar, N. L., Alberts, M. K., & Swenson, E. R. (1999). Mechanisms of improvement in pulmonary gas exchange during isovolemic hemodilution. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(1), 132–41.

- Dejours, P. (1962). Chemoreflexes in breathing. *Physiol Rev*, 42, 335–58.
- Del Rio, R., Moya, E. A., & Iturriaga, R. (2010). Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: The oxidative link. *European Respiratory Journal*, 36(1), 143–150.
- Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., & Perrotta, S. (2007). Erythropoietin receptors on cancer cells: a still open question. *J Clin Oncol*, 25(13), 1812–3.
- Demiot, C., Sarrazy, V., Javellaud, J., Gourloi, L., Botelle, L., Oudart, N., & Achard, J.-M. (2011). Erythropoietin Restores C-Fiber Function and Prevents Pressure Ulcer Formation in Diabetic Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), 2316–2322.
- Depuy, S. D., Kanbar, R., Coates, M. B., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2011). Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(6), 1981–90.
- Di Pasquale, E., Monteau, R., & Hilaire, G. (1994). Involvement of the rostral ventro-lateral medulla in respiratory rhythm genesis during the peri-natal period: an in vitro study in newborn and fetal rats. *Developmental Brain Research*, 78(2), 243–252.
- Dias, M. B., Nucci, T. B., Margatho, L. O., Antunes-Rodrigues, J., Gargaglioni, L. H., & Branco, L. G. S. (2007). Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(5), 1780–1788.
- Dick, T. E., & Coles, S. K. (2000). Ventrolateral pons mediates short-term depression of respiratory frequency after brief hypoxia. *Respiration Physiology*, 121(2-3), 87–100.
- Dick, T. E., Shannon, R., Lindsey, B. G., Nuding, S. C., Segers, L. S., Baekey, D. M., & Morris, K. F. (2005). Arterial pulse modulated activity is expressed in respiratory neural output. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 99(2), 691–8.
- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. a, Bauer, C., & Gassmann, M. (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3717–20.
- Digicaylioglu, M., & Lipton, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature*, 412(6847), 641–647.
- Donnelly, D. F. (2000). Developmental aspects of oxygen sensing by the carotid body. *J. Appl. Physiol.*, 88, 2296–2301.
- Donnelly, D. F. (2007). Orthodromic spike generation from electrical stimuli in the rat carotid body: implications for the afferent spike generation process. *The Journal of physiology*, 580(Pt 1), 275–84.
- Donnelly, D. F., & Doyle, T. P. (1994). Developmental changes in hypoxia-induced catecholamine release from rat carotid body, in vitro. *J Physiol*, 475(2), 267–275.
- Douglas, W., & Toh, C. (1953). The respiratory stimulant action of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the dog. *J Physiol*, 120(3), 311–8.

- Drorbaugh, J., & Fenn, W. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, *16*(1), 81–7.
- Dubreuil, V., Ramanantsoa, N., Trochet, D., Vaubourg, V., Amiel, J., Gallego, J., ... Goridis, C. (2008). A human mutation in Phox2b causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(3), 1067–72.
- Duncan, J., Paterson, D., Hoffman, J., Mokler, D., Borenstein, N., Belliveau, R., ... Kinney, H. (2010). Brainstem Serotonergic Deficiency in Sudden Infant Death Syndrome. *JAMA*, *303*(5), 430–437.
- Eaton, JW, TD Skelton, E Berger. (1974). Survival at extreme altitude: Protective effect of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Science*, *183*(4126), 743–744.
- Eaton, J. (1974). Oxygen affinity and environmental adaptation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *241*(0), 491–7.
- Eden, G. J., & Hanson, M. A. (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J Physiol*, *392*, 1–9.
- Edwards, N., Wilcox, I., Polo, O. J., & Sullivan, C. E. (1996). Hypercapnic blood pressure response is greater during the luteal phase of the menstrual cycle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *81*(5), 2142–6.
- El Hasnaoui-Saadani, R., Alayza, R. C., Launay, T., Pichon, a, Quidu, P., Beaudry, M., ... Favret, F. (2007). Brain stem NO modulates ventilatory acclimatization to hypoxia in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *103*(5), 1506–12.
- El Hasnaoui-Saadani, R., Marchant, D., Pichon, A., Escoubet, B., Pezet, M., Hilfiker-Kleiner, D., ... Favret, F. (2013). Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, *186*(2), 146–154.
- Elam, M., Yao, T., Thor??n, P., & Svensson, T. H. (1981). Hypercapnia and hypoxia: Chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Research*, *222*(2), 373–381.
- Elliott, S., Sinclair, A., Collins, H., Rice, L., & Jelkmann, W. (2014). Progress in detecting cell-surface protein receptors: The erythropoietin receptor example. *Annals of Hematology*.
- Elnazir, B., Marshall, J., & Kumar, P. (1996). Postnatal development of the pattern of respiratory and cardiovascular response to systemic hypoxia in the piglet: the roles of adenosine. *J Physiol*, *492*(Pt 2), 573–85.
- Erlichman, J., Cook, A., Schwab, M., Budd, T., & Leiter, J. (2004). Heterogeneous patterns of pH regulation in glial cells in the dorsal and ventral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *286*(2), R289–302.
- Evans, H., & Long, J. (1922). Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *8*(3), 38–9.
- Eyzaguirre, C., & Lewin, J. (1961a). Effect of different oxygen tensions on the carotid body in vitro.

- Journal of Physiology*, 159, 238–250.
- Eyzaguirre, C., & Lewin, J. (1961b). The effect of sympathetic stimulation on carotid nerve activity. *Journal of Physiology*, 159, 251–67.
- Ezure, K., & Tanaka, I. (2006). Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat. *Neuroscience*, 141(2), 1011–1023.
- Fallert, M., Böhmer, G., Dinse, H. R., Sommer, T. J., & Bittner, A. (1979). Microelectrophoretic application of putative neurotransmitters onto various types of bulbar respiratory neurons. *Archives Italiennes de Biologie*, 117(1), 1–12.
- Favier, R., Spielvogel, H., Caceres, E., Rodriguez, A., Sempore, B., Pequignot, J., & Pequignot, J. (1997). Differential effects of ventilatory stimulation by sex hormones and almitrine on hypoxic erythrocytosis. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 434(1), 97–103.
- Favret, F., Richalet, J. P., Henderson, K. K., Germack, R., & Gonzalez, N. C. (2001). Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 280(3), R730–8.
- Fedorko, L., Merrill, E., & Lipski, J. (1983). Two descending medullary inspiratory pathways to phrenic motoneurons. *Neuroscience Letters*, 30;43(2-3), 285–291.
- Ferner, K., & Mortola, J. P. (2009). Ventilatory response to hypoxia in chicken hatchlings: A developmental window of sensitivity to embryonic hypoxia. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 165(1), 49–53.
- Ferro, F. E., Kozak, S. L., Hoatlin, M. E., & Kabat, D. (1993). Cell surface site for mitogenic interaction of erythropoietin receptors with the membrane glycoprotein encoded by Friend erythroleukemia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5741–5747.
- Filosa, J. A., Dean, J. B., & Putnam, R. W. (2002). Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurons. *J Physiol*, 541(Pt 2), 493–509.
- Fink, B., Katz, R., Reinhold, H., & Schoolman, A. (1962). Suprapontine mechanisms in regulation of respiration. *Am J Physiol*, 202, 217–20.
- Finley, J. C. W., & Katz, D. M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Research*, 572(1-2), 108–116.
- Fitzgerald, R. S., & Dehghani, G. A. (1982). Neural responses of the cat carotid and aortic bodies to hypercapnia and hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*.
- Flourens, P. (1842). Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés. *Baillière ed.*, 1–516.
- Flourens, P. (1851). Note sur le point vital de la moelle allongée. *C.R.Acad.Sci., Paris*, (33), 437–439.
- Fong, A. Y., & Potts, J. T. (2008). Neurokinin-1 receptors modulate the excitability of expiratory neurons in the ventral respiratory group. *Journal of neurophysiology*, 99, 900–914.
- Fortuna, M. G., West, G. H., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2008). Botzinger Expiratory-

- Augmenting Neurons and the Parafacial Respiratory Group. *Journal of Neuroscience*, 28(10), 2506–2515.
- Fournier, S., Doan, V., & Joseph, V. (2012). Sex-specific effects of daily gavage with a mixed progesterone and glucocorticoid receptor antagonist on hypoxic ventilatory response in newborn rats. *Adv Exp Med Biol*, 758, 29–35.
- Frappell, P., Lanthier, C., Baudinette, R. V, & Mortola, J. P. (1992). Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *The American journal of physiology*, 262, R1040–R1046.
- Freeman, M. (1988). The ovarian cycle of the rat. *Physiology of reproduction*, 1893–1928.
- Freiria-Oliveira, A. H., Blanch, G. T., Pedrino, G. R., Cravo, S. L., Murphy, D., Menani, J. V, & Colombari, D. S. A. (2015). Catecholaminergic neurons in the commissural region of the nucleus of the solitary tract modulate hyperosmolality-induced responses. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 309(9), R1082–91.
- Fung, M. L., Wang, W., Darnall, R. a, & St John, W. M. (1996). Characterization of ventilatory responses to hypoxia in neonatal rats. *Respiration physiology*, 103(1), 57–66.
- Funk, G. D., & Greer, J. J. (2013). The rhythmic, transverse medullary slice preparation in respiratory neurobiology: Contributions and caveats. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (65), e3564.
- Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Pivina, S., & Ordyan, N. (2010). Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Vitamins and hormones*.
- Gao, K., & Mason, P. (2001). Physiological and Anatomic Evidence for Functional Subclasses of Serotonergic, 439(July), 426–439.
- Gargaglioni, L. H., Hartzler, L. K., & Putnam, R. W. (2010). The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Gargaglioni, L., Marques, D., Batalhao, M., de Carvalho, D., Szawka, R., Anselmo-Franci, J., & Bicego, K. (2011). Influence of estrous cycle on the ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia in rats. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1).
- Gassmann, M., Heinicke, K., Soliz, J., & Ogunshola, O. O. (2003). Non-erythroid functions of erythropoietin. *Advances in experimental medicine and biology*, 543, 323–330.
- Gassmann, M., Pfistner, C., Doan, V. D., Vogel, J., & Soliz, J. (2010). Impaired ventilatory acclimatization to hypoxia in female mice overexpressing erythropoietin: unexpected deleterious effect of estradiol in carotid bodies. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299(6), R1511–20.
- Gassmann, M., Tissot Van Patot, M., & Soliz, J. (2009). The neuronal control of hypoxic ventilation: Erythropoietin and sexual dimorphism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177, 151–161.

- Ge, R. L., Kubo, K., Kobayashi, T., Sekiguchi, M., & Honda, T. (1998). Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *The American journal of physiology*, *274*, H1792–H1799.
- Gesell, R., Bricker, J., & Magee, C. (1936). Structural and functional organization of the central mechanism controlling breathing. *American Journal of Physiology*, *117*, 423–452.
- Gesell, R., Magee, C., & Bricker, J. (1940). Activity patterns of the respiratory neurons and muscles. *American Journal of Physiology*, *128*, 615–628.
- Gestreau, C., Grélot, L., & Bianchi, a L. (2000). Activity of respiratory laryngeal motoneurons during fictive coughing and swallowing. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, *130*(1), 27–34.
- Ginzel, K., & Kottogoda, S. (1954). The action of 5-hydroxytryptamine and tryptamine on aortic and carotid sinus receptors in the cat. *J Physiol*, *26*(2), 277–88.
- Gluckman, P., & Johnston, B. (1987). Lesions in the upper lateral pons abolish the hypoxic depression of breathing in unanaesthetized fetal lambs in utero. *J Physiol*, *382*, 373–83.
- Gourine, A. V. (2005). On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *The Journal of physiology*, *568*(Pt 3), 715–724.
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., ... Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5991), 571–575.
- Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N., & Spyer, K. M. (2005). ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*, *436*(July), 108–111.
- Gourine, A. V., & Spyer, K. M. (2001). Chemosensitivity of medullary inspiratory neurones: a role for GABA(A) receptors? *Neuroreport*, *12*(15), 3395–400.
- Gozal, D., Gozal, E., & Simakajornboon, N. (2000). Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir Physiol*, *121*(2-3), 209–221.
- Gozal, D., Torres, J. E., Gozal, Y. M., & Littwin, S. M. (1996). Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *Journal of Applied Physiology*, *81*(5), 2068 – 2077.
- Granjeiro, E., da Silva, G., Giusti, H., Oliveira, J., Glass, M., & Garcia-Cairasco, N. (2016). Behavioral, Ventilatory and Thermoregulatory Responses to Hypercapnia and Hypoxia in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) Strain. *PLoS ONE*, *11*(5).
- Gray, P. a, Hayes, J. a, Ling, G. Y., Llona, I., Tupal, S., Picardo, M. C. D., ... Negro, C. a Del. (2010). Developmental Origin of preBötzing Complex Respiratory Neurons. *J. Neurosci.*, *30*(44), 14883–14895.
- Gray, P., Janczewski, W., Mellen, N., Mccrimmon, D., & Feldman, J. (2001). Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature neuroscience*, *4*, 927–930.

- Gruber, M., Hu, C.-J., Johnson, R. S., Brown, E. J., Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Acute postnatal ablation of Hif-2 α results in anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(7), 2301–6.
- Gu, H., Yang, Z., Teng, G., Liu, J., Long, W., & Ruan, Z. (1991). Oxygen-Hb dissociation curve in plateau pika. *Chin J Appl Physiol*, *7*, 365–367.
- Guiard, B. P., Guilloux, J., Reperant, C., Hunt, S. P., Toth, M., & Gardier, A. M. (2007). Substance P Neurokinin 1 Receptor Activation within the Dorsal Raphe Nucleus Controls Serotonin Release in the Mouse Frontal Cortex, *72*(6), 1411–1418.
- Guillamon, A., de Blas, M. R., & Segovia, S. (1988). Effects of sex steroids on the development of the locus coeruleus in the rat. *Developmental Brain Research*, *40*(2), 306–310.
- Guner, I., Yelmen, N., Sahin, G., & Oruç, T. (2002). The effect of intracerebroventricular dopamine administration on the respiratory response to hypoxia. *Tohoku J Exp Med*, *196*(4), 219–30.
- Gunga, H. C., Kirsch, K. A., Roecker, L., Kohlberg, E., Tiedemann, J., Steinach, M., & Schobersberger, W. (2007). Erythropoietin regulations in humans under different environmental and experimental conditions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, *158*(2-3), 287–297.
- Gury, C., & Cousin, F. (1999). [Pharmacokinetics of SSRI antidepressants: half-life and clinical applicability]. *L'Encephale*, *25*(5), 470–476.
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., Moreira, T. S., & Takakura, A. T. (2008). The Retrotrapezoid Nucleus and Central Chemoreception. *Tzu Chi Medical Journal*.
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L., Fortuna, M. G., Abbott, S. B. G., & DePuy, S. D. (2009). Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L., Ludwig, M.-G., Kumar, N. N., Shi, Y., Wenker, I. C. (2016). Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *The Journal of physiology*, *594*(6), 1529–51.
- Guyenet, P. G., & Mulkey, D. K. (2010a). Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., Abbott, S. B. G., Depuy, S. D., & Kanbar, R. (2012). The retrotrapezoid nucleus and breathing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *758*, 115–122.
- Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., & Bayliss, D. A. (2010b). Central respiratory chemoreception. *Journal of Comparative Neurology*.
- Hagström, L., Agbulut, O., El Hasnaoui-Saadani, R., Marchant, D., Favret, F., Richalet, J., Launay, T. (2010). Epo is relevant neither for microvascular formation nor for the new formation and maintenance of mice skeletal muscle fibres in both normoxia and hypoxia. *J Biomed Biotechnol*.
- Hagström, L., Canon, F., Agbulut, O., Marchant, D., Serrurier, B., Richalet, J. P., Launay, T. (2010). Skeletal muscle intrinsic functional properties are preserved in a model of erythropoietin deficient mice exposed to hypoxia. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *459*(5), 713–

723.

- Hanson, M., Kumar, P., & Williams, B. (1989). The effect of chronic hypoxia upon the development of respiratory chemoreflexes in the newborn kitten. *J Physiol*, *411*, 563–74.
- Hassan, M. G., Emara, K. M., Mohamed, H. A., Abdel-Wadood, H. M., Ikeda, R., Wada, M., ... Nakashima, K. (2012). Determination of memantine in rat plasma by HPLC-fluorescence method and its application to study of the pharmacokinetic interaction between memantine and methazolamide. *Biomedical Chromatography*, *26*(2), 214–219.
- Hatcher, J. D., Chiu, L. K., & Jennings, D. B. (1978). Anemia as a stimulus to aortic and carotid chemoreceptors in the cat. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, *44*(5), 696–702.
- Haxhiu, M. A., Yung, K., Erokwu, B., & Cherniack, N. S. (1996). CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respiration Physiology*, *105*(1-2), 35–45.
- Healy, D. L., Chrousos, G. P., Schulte, H. M., Williams, R. F., Gold, P. W., Baulieu, E. E., & Hodgen, G. D. (1983). Pituitary and adrenal responses to the anti-progesterone and anti-glucocorticoid steroid RU 486 in primates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *57*(4), 863–865.
- Heeringa, J., Berkenbosch, A., De Goede, J., & Olievier, C. N. (1979). Relative contribution of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂ during hyperoxia. *Respiration Physiology*, *37*(3), 365–379.
- Heir, P., Srikumar, T., Bikopoulos, G., Bunda, S., Poon, B. P., Lee, J. E., ... Ohh, M. (2016). Oxygen-Dependent Regulation of Erythropoietin Receptor Turnover And Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M115.694562.
- Heymans, C. (1965). The part played by vascular pressoreceptors and chemoreceptors in respiratory control. *Nobel Lectures - Physiology or Medicine (1922-1941)*, 460–481.
- Heymans, C., & Bouckaert, J. (1930). Sinus carotidus and respiratory reflexes. *Departement of Pharmacology, University of Ghent, I*, 254–266.
- Heymans, C., Bouckaert, J., & Regniers, P. (1933). Le sinus carotidien. *G. Doin, Paris*, 1–334.
- Heymans, J. (1927). Sur les modifications directes et sur la régulation réflexe de l'activité du centre respiratoire de la tête isolée du chien. *Arch. Int. Pharmacodyn*, *33*, 273–370.
- Hilaire, G., Burnet, H., Ptak, K., Sieweke, M., Blanchi, B., De Felipe, C., ... Monteau, R. (2003). Deletion of tachykinin NK1 receptor gene in mice does not alter respiratory network maturation but alters respiratory responses to hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, *536*, 497–504.
- Hilaire, G., Viemari, J. C., Coulon, P., Simonneau, M., & Bévengut, M. (2004). Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Hilaire, G., Voituron, N., Menuet, C., Ichiyama, R. M., Subramanian, H. H., & Dutschmann, M. (2010). The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respiratory physiology & neurobiology*, *174*(1-2), 76–88.
- Hirshman, C. A., McCullough, R. E., & Weil, J. V. (1975). Normal values for hypoxic and hypercapnic

- ventilatory drives in man. *Journal of Applied Physiology*, 38(6), 1095–1098.
- Hoch, M., Fischer, P., Stapel, B., Missol-Kolka, E., Sekkali, B., Scherr, M., ... Hilfiker-Kleiner, D. (2011). Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies. *Cell Stem Cell*, 9(2), 131–143.
- Hodges, M. R., Klum, L., Leekley, T., Brozoski, D. T., Bastasic, J., Davis, S., ... Forster, H. V. (2004a). Effects on breathing in awake and sleeping goats of focal acidosis in the medullary raphe. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 96(5), 1815–24.
- Hodges, M. R., Martino, P., Davis, S., Opansky, C., Pan, L. G., & Forster, H. V. (2004b). Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 97(6), 2303–9.
- Hodges, M. R., Tattersall, G. J., Harris, M. B., McEvoy, S. D., Richerson, D. N., Deneris, E. S., ... Richerson, G. B. (2008). Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(10), 2495–505.
- Hoff, & Breckenridge. (1949). The medullary origin of respiratory periodicity in the dog. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 158(2), 157–72.
- Holloway, B. B., Viar, K. E., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2015a). The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice, 42, 2271–2282.
- Holloway, B. B., Viar, K. E., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2015b). The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. *European Journal of Neuroscience*, 42(6), 2271–2282.
- Holmes, C., Mainville, L., & Jones, B. (1994). Distribution of cholinergic, GABAergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience*, 62, 1155–1178.
- Holtman, J. R., Marion, L. J., & Speck, D. F. (1990). Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat. *Neuroscience*, 37(2), 541–552.
- Hon, W.-C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D. W., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature*, 417(6892), 975–978.
- Hoop, B., Beagle, J. L., Maher, T. J., & Kazemi, H. (1999). Brainstem amino acid neurotransmitters and hypoxic ventilatory response. *Respiration Physiology*, 118(2-3), 117–129.
- Horbein, T., Griffo, Z., & Roos, A. (1961). Quantitation of chemoreceptor activity: Interrelation of hypoxia and hypercapnia. *Journal of Neurophysiology*, 24, 561–568.
- Horn, E. M., & Waldrop, T. G. (1998). Suprapontine control of respiration. *Respiration Physiology*.
- Hosogai, M., Matsuo, S., Sibahara, T., & Kawai, Y. (1998). Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. *Respiration Physiology*, 112(1), 37–50.
- Housley, G. D., Martin-Body, R. L., Dawson, N. J., & Sinclair, J. D. (1987). Brain stem projections of the glossopharyngeal nerve and its carotid sinus branch in the rat. *Neuroscience*, 22(1), 237–250.

- Housley, G. D., & Sinclair, J. D. (1988). Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *The Journal of physiology*, *406*, 99–114.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(14), 7987–92.
- Hudson, A. L., Gandevia, S. C., & Butler, J. E. (2011). Control of human inspiratory motoneurons during voluntary and involuntary contractions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Huey, K. A., Brown, I. P., Jordan, M. C., & Powell, F. L. (2000). Changes in dopamine D₂-receptor modulation of the hypoxic ventilatory response with chronic hypoxia. *Respiration Physiology*, *123*(3), 177–187.
- Huey, K. A., Szewczak, J. M., & Powell, F. L. (2003). Dopaminergic mechanisms of neural plasticity in respiratory control: Transgenic approaches. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Hupperets, M. D. W., Hopkins, S. R., Pronk, M. G., Tiemessen, I. J. H., Garcia, N., Wagner, P. D., & Powell, F. L. (2004). Increased hypoxic ventilatory response during 8 weeks at 3800 m altitude. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, *142*(2-3), 145–152.
- Iceman, K. E., & Harris, M. B. (2014). A group of non-serotonergic cells is CO₂-stimulated in the medullary raphé. *Neuroscience*, *259*, 203–213.
- Iceman, K. E., Richerson, G. B., & Harris, M. B. (2013). Medullary serotonin neurons are CO₂ sensitive in situ. *Journal of neurophysiology*, *110*(11), 2536–44.
- Issa, F., & Remmers, J. (1992). Identification of a subsurface area in the ventral medulla sensitive to local changes in PCO₂. *J Appl Physiol*, *72*, 439–446.
- Ivy, C. M., & Scott, G. R. (2014). Control of breathing and the circulation in high-altitude mammals and birds. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, *186*, 66–74.
- Izal-Azcárate, A., Belzunegui, S., San Sebastián, W., Garrido-Gil, P., Vázquez-Claverie, M., López, B., ... Luquin, M. a R. (2008). Immunohistochemical characterization of the rat carotid body. *Respiratory physiology & neurobiology*, *161*(1), 95–9.
- Jackson, a, & Nurse, C. (1997). Dopaminergic properties of cultured rat carotid body chemoreceptors grown in normoxic and hypoxic environments. *Journal of neurochemistry*, *69*(2), 645–54.
- Jacobs, B. (1986). Single unit activity of locus coeruleus neurons in behaving animals. *Progress in Neurobiology*, *27*(2), 183–94.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., ... Fritsch, E. F. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, *313*(6005), 806–810.
- Jansen, A. H., & Chernick, V. (1983). Development of respiratory control. *Physiological Reviews*, *63*(2), 437–483.
- Janssen, P. L., Dwinell, M. R., Pizarro, J., & Bisgard, G. E. (1998a). Intracarotid dopamine infusion does not prevent acclimatization to hypoxia. *Respiration Physiology*, *111*(1), 33–43.

- Janssen, P. L., O'Halloran, K. D., Pizarro, J., Dwinell, M. R., & Bisgard, G. E. (1998b). Carotid body dopaminergic mechanisms are functional after acclimatization to hypoxia in goats. *Respiration Physiology*, *111*(1), 25–32.
- Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, *72*(2), 449–89.
- Jelkmann, W. (2007). Erythropoietin after a century of research: Younger than ever. *European Journal of Haematology*.
- Jelkmann, W. (2013). Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *40*(5), 302–309.
- Johansen, S., Iceman, K., Iceman, C., Taylor, B., & Harris, M. (2015). Isoflurane causes concentration-dependent inhibition of medullary raphé 5-HT neurons in situ. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *193*, 51–6.
- Johnston, B. M., & Gluckman, P. D. (1993). Peripheral chemoreceptors respond to hypoxia in pontine-lesioned fetal lambs in utero. *J Appl Physiol (1985)*, *75*(3), 1027–1034.
- Joseph, V., Doan, V., Morency, C., Lajeunesse, Y., & Bairam, A. (2006). Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rats. *Brain Research*, *1073-1074*, 71–82.
- Joseph, V., Niane, L. M., & Bairam, A. (2012). Antagonism of progesterone receptor suppresses carotid body responses to hypoxia and nicotine in rat pups. *Neuroscience*, *207*, 103–109.
- Joseph, V., Soliz, J., Soria, R., Pequignot, J., Favier, R., Spielvogel, H., & Pequignot, J. M. (2002). Dopaminergic metabolism in carotid bodies and high-altitude acclimatization in female rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *282*(3), R765–73.
- Jourdanet, D. (1875). Influence de la pression de l'air sur la vie de l'homme. *Paris : Masson*.
- Julien, C., Bairam, A., & Joseph, V. (2008). Chronic intermittent hypoxia reduces ventilatory long-term facilitation and enhances apnea frequency in newborn rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *294*(4), R1356–R1366.
- Jung-Testas, I., & Baulieu, E. E. (1983). Inhibition of glucocorticosteroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts by RU 486, a new anti-glucocorticosteroid of high affinity for the glucocorticosteroid receptor. *Experimental Cell Research*, *147*(1), 177–182.
- Juul, S. (2012). Neuroprotective role of erythropoietin in neonates. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, *25 Suppl 4*, 105–7.
- JZ, D., & You, Z. (1992). A radioimmunoassay of corticotrophin releasing factor of hypothalamus in *Ochotona curzoniae*. *Acta. Theriol. Sin*, *12*, 223–229.
- KACIMI, R., RICHALET, J., & CROZATIER, B. (1993). HYPOXIA-INDUCED DIFFERENTIAL MODULATION

OF ADENOSINERGIC AND MUSCARINIC RECEPTORS IN RAT-HEART. *JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY*, 75(3), 1123–1128.

- Kameda, Y. (1996). Immunoelectron microscopic localization of vimentin in sustentacular cells of the carotid body and the adrenal medulla of guinea pigs. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 44(12), 1439–49.
- Kameda, Y., Kameya, T., & Frankfurter, A. (1993). Immunohistochemical localization of a neuron-specific α -tubulin isotype in the developing chicken ultimobranchial glands. *Brain Research*, 628(1-2), 121–127.
- Kanamaru, M., & Homma, I. (2009). Dorsomedial medullary 5-HT₂ receptors mediate immediate onset of initial hyperventilation, airway dilation, and ventilatory decline during hypoxia in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(1), R34–41.
- Kang, B. J., Chang, D. A., Mackay, D. D., West, G. H., Moreira, T. S., Takakura, A. C., ... Stornetta, R. L. (2007). Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 503(5), 627–641.
- Katz, D. M., Dutschmann, M., Ramirez, J. M., & Hilaire, G. (2009). Breathing disorders in Rett syndrome: Progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 168(1-2), 101–108.
- Kaur, S., Pedersen, N. P., Yokota, S., Hur, E. E., Fuller, P. M., Lazarus, M., ... Saper, C. B. (2013). Glutamatergic Signaling from the Parabrachial Nucleus Plays a Critical Role in Hypercapnic Arousal. *The Journal of Neuroscience*, 33(18), 7627–7640.
- Kawakami, M., Iwasaki, S., Sato, K., & Takahashi, M. (2000). Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(1), 293–297.
- Kaynar, K., Aliyazoglu, R., Ersoz, S., Ulusoy, S., Al, S., Ozkan, G., & Cansiz, M. (2012). Role of erythropoietin in prevention of amikacin-induced nephropathy. *Journal of Nephrology*, 25(5), 744–749.
- Kertesz, N., Wu, J., Chen, T., Sucov, H., & Wu, H. (2004). The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*, 276(1), 101–10.
- Khemiri, H., Maresca, M., & Gestreau, C. (2016). Carbamylated erythropoietin enhances mice ventilatory responses to changes in O₂ but not CO₂ levels. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 232, 1–12.
- Kihara, M., & Kubo, T. (1991). Immunocytochemical localization of glutamate containing neurons in the ventrolateral medulla oblongata and the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Hirnforsch*, 32(1), 113–8.
- Kim, Y.-C., Mungunsukh, O., McCart, E. a, Roehrich, P. J., Yee, D. K., & Day, R. M. (2014). Mechanism of Erythropoietin Regulation by Angiotensin II. *Molecular pharmacology*, (June), 898–908.
- King, T. L., Heesch, C. M., Clark, C. G., Kline, D. D., & Hasser, E. M. (2012). Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J*

- Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(10), R1219–32.
- Kline, D. D., King, T. L., Austgen, J. R., Heesch, C. M., & Hasser, E. M. (2010). Sensory afferent and hypoxia-mediated activation of nucleus tractus solitarius neurons that project to the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience*, 167(2), 510–527.
- Kobayashi, K., Lemke, R. P., & Greer, J. J. (2001). Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. *J Appl Physiol*, 91(1), 316–320.
- Koda, L., & Bloom, F. (1983). Distribution of catecholamine-containing cell bodies and blood vessels in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 289(1-2), 71–8.
- Kondo, H., Iwanaga, T., & Nakajima, T. (1982). Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. *Cell Tissue Res.*, 227(2), 291–5.
- Koos, B. J., Chao, A., & Doany, W. (1992). Adenosine stimulates breathing in fetal sheep with brain stem section. *J Appl Physiol*, 72(1), 94–99.
- Koos, B. J., Sameshima, H., & Power, G. G. (1987). Fetal breathing, sleep state, and cardiovascular responses to graded hypoxia in sheep. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 62(3), 1033–1039.
- Koshimura, K., Murakami, Y., Sohmiya, M., Tanaka, J., & Kato, Y. (1999). Effects of erythropoietin on neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2565–2572.
- Krause, K. L., Forster, H. V., Davis, S. E., Kiner, T., Bonis, J. M., Pan, L. G., & Qian, B. (2009). Focal acidosis in the pre-Bötzinger complex area of awake goats induces a mild tachypnea. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 106(1), 241–50.
- Krejcy, K., Schwarzacher, S., & Raberger, G. (1993). Distribution and metabolism of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L-arginine methylester in canine blood in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 347(3), 342–345.
- Kuhnen, G. (1986). O₂ and CO₂ concentrations in burrows of euthermic and hibernating golden hamsters. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 84(3), 517–522.
- Kuribayashi, J., Sakuraba, S., Hosokawa, Y., Hatori, E., Tsujita, M., Takeda, J., ... Kuwana, S. (2008). CO₂-sensitivity of GABAergic neurons in the ventral medullary surface of GAD67-GFP knock-in neonatal mice. *Adv Exp Med Biol*, 605, 338–42.
- Kuwana, S. I., Tsunekawa, N., Yanagawa, Y., Okada, Y., Kuribayashi, J., & Obata, K. (2006). Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzinger complex. *European Journal of Neuroscience*, 23(3), 667–674.
- Lacombe, C., & Mayeux, P. (1999). Erythropoietin (Epo) receptor and Epo mimetics. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 29, 177–89.
- Lacoste, B., Riad, M., & Descarries, L. (2006). Immunocytochemical evidence for the existence of substance P receptor (NK1) in serotonin neurons of rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci*, 23(11), 2947–2958.
- Lahiri, S., Mokashi, A, Mulligan, E., & Nishino, T. (1981a). Comparison of aortic and carotid

- chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 51(1), 55–61.
- Lahiri, S., Mulligan, E., Nishino, T., Mokashi, A., & Davies, R. O. (1981b). Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to carboxyhemoglobinemia. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 50(3), 580–6.
- Lahiri, S., Nishino, T., Mulligan, E., & Mokashi, A. (1980). Relative latency of responses of chemoreceptor afferents from aortic and carotid bodies. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 48(2), 362–369.
- Lam, S. Y., Tipoe, G. L., & Fung, M. L. (2009). Upregulation of erythropoietin and its receptor expression in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, 648, 207–214.
- Larnicol, N., Rose, D., & Duron, B. (1985). Identification of phrenic afferents to the external cuneate nucleus: A fluorescent double-labeling study in the cat. *Neuroscience Letters*, 62(2), 163–167.
- Lechner, a J. (1976). Respiratory adaptations in burrowing pocket gophers from sea level and high altitude. *Journal of applied physiology*, 41(2), 168–73.
- Lee, S., Kim, S., Noh, Y., Choi, B., Noh, G., Park, W., ... Bae, C. (2016). Pharmacokinetics of Memantine after a Single and Multiple Dose of Oral and Patch Administration in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 118(2), 122–7.
- Legallois, C. (1812). *Expériences sur le principe de la vie*, pp, 328.
- Lemes, E. V., Aiko, S., Orbem, C. B., Formentin, C., Bassi, M., Colombari, E., & Zoccal, D. B. (2016). Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. *Acta Physiologica*.
- Leusen, I. (1954a). Chemosensitivity of the respiratory center influence of changes in the H⁺ and total buffer concentrations in the cerebral ventricles on respiration. *American Journal of Physiology*, 176(1), 45–51.
- Leusen, I. (1954b). Chemosensitivity of the respiratory center; influence of CO₂ in the cerebral ventricles on respiration. *American Journal of Physiology*, 176(1), 39–44.
- Lhuissier, F. J., Canouï-Poitaine, F., & Richalet, J.-P. (2012). Ageing and cardiorespiratory response to hypoxia. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 21), 5461–5474.
- Li, A., & Nattie, E. (2002). CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 133(1-2), 11–22.
- Li, A., & Nattie, E. (2008). Serotonin transporter knockout mice have a reduced ventilatory response to hypercapnia (predominantly in males) but not to hypoxia. *The Journal of physiology*, 586(9), 2321–2329.
- Li, A., Zhou, S., & Nattie, E. (2006). Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. *J Physiol*, 577, 307–318.

- Li, H., Guo, S., Ren, Y., Wang, D., Yu, H., Li, W., ... Chang, Z. (2013). VEGF189 expression is highly related to adaptation of the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) inhabiting high altitudes. *High Altitude Medicine & Biology*, *14*(4), 395–404.
- Lieutaud, T., Andrews, P., Rhodes, J., & Williamson, R. (2008). Characterization of the pharmacokinetics of human recombinant erythropoietin in blood and brain when administered immediately after lateral fluid percussion brain injury and its pharmacodynamic effects on IL-1beta and MIP-2 in rats. *J Neurotrauma*, *25*(10), 1179–85.
- Liu, J., Boujedaini, N., Cazin, L., Mallet, E., & Clabaut, M. (2000). Developmental changes in cardio-respiratory responses to hypoxia and hypercapnia in anesthetized low-birth-weight rats. *Respiration Physiology*, *123*(3), 189–199.
- Liu, M., Kuhel, D., Shen, L., Hui, D., & Woods, S. (2012). Apolipoprotein E does not cross the blood-cerebrospinal fluid barrier, as revealed by an improved technique for sampling CSF from mice. *American Journal of Physiology*, *309*(9), R903–R908.
- Livnah, O., Stura, E. a, Middleton, S. a, Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., & Wilson, I. a. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(February), 987–990.
- Loeppky, J. A., Scotto, P., Charlton, G. C., Gates, L., Icenogle, M., & Roach, R. C. (2001). Ventilation is greater in women than men, but the increase during acute altitude hypoxia is the same. *Respiration Physiology*, *125*(3), 225–237.
- Loeschcke, H. H. (1982). Central chemosensitivity and the reaction theory. *The Journal of physiology*, *332*, 1–24.
- López-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Current Opinion in Neurobiology*.
- López-López, J., González, C., Ureña, J., & López-Barneo, J. (1989). Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *The Journal of general physiology*, *93*(5), 1001–1015.
- Lorry, A. (1760). Sur les mouvements du cerveaux. Second mémoire. Sur les mouvements contre nature de ce viscère, et sur les organes qui font le principe de son action. *Mém Math Phys Prés Acad Roy Sci Div Sav, Paris* *3*, 344–377.
- LOWRY, T. F., FORSTER, H. V., PAN, L. G., KORDUCKI, M. A., PROBST, J., FRANCIOSI, F. R., & Forster, M. (1999). Effect of carotid body denervation on breathing in neonatal goats. *J Appl Physiol*, *87*, 1026–1034.
- Lowry, T. F., Forster, H. V, Pan, L. G., Serra, a, Wenninger, J., Nash, R., ... Franciosi, R. a. (1999). Effects on breathing of carotid body denervation in neonatal piglets. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *87*(6), 2128–35.
- Lumsden, T. (1923a). The regulation of respiration. Part I., *I*.
- Lumsden, T. (1923b). The regulation of respiration. Part II., *II*.
- Lundby, C., Hellsten, Y., Jensen, M. B. F., Munch, A. S., & Pilegaard, H. (2008). Erythropoietin receptor

- in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 104(4), 1154–1160.
- Lundby, C., & Olsen, N. V. (2011). Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. *The Journal of physiology*, 589(Pt 6), 1265–71.
- Luo, Y., Gao, W., Gao, Y., Tang, S., Huang, Q., Tan, X., ... Huang, T. (2008). Mitochondrial genome analysis of *Ochotona curzoniae* and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation. *Mitochondrion*, 8(5-6), 352–357.
- Luque, J. M., de Blas, M. R., Segovia, S., & Guillaumon, A. (1992). Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Brain Res Dev Brain Res*, 67(2), 211–215.
- Macarlupu, J. L., Buvry, A., Morel, O. E., León-Velarde, F., Richalet, J. P., & Favret, F. (2006). Time course of ventilatory acclimatisation to hypoxia in a model of anemic transgenic mice. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 153(1), 14–22.
- Macarlupú, J. L., Buvry, A., Morel, O. E., León-Velarde, F., Richalet, J. P., & Favret, F. (2006). Characterisation of the ventilatory response to hypoxia in a model of transgenic anemic mice. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 150(1), 19–26.
- Machaalani, R., & Waters, K. (2002). Distribution and quantification of NMDA R1 mRNA and protein in the piglet brainstem and effects of intermittent hypercapnic hypoxia (IHH). *Brain Research*, 951(2), 293–300.
- Malek, G., & Lad, E. (2014). Emerging roles for nuclear receptors in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci*, 71(23), 4617–4636.
- Manabe, S., & Broccoli, A. J. (1990). Mountains and arid climates of middle latitudes. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4939), 192–195.
- Mancini, D. M., Katz, S. D., Lang, C. C., LaManca, J., Hudaihed, A., & Androne, A. S. (2003). Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation*, 107(2), 294–299.
- Manzke, T., Bidon, O., Dutschmann, M., & Richter, D. (2008). Mecp2-deficiency causes developmental changes in the serotonergic system. *Acta Physiologica*, 192, PT03–PT05.
- Marchal, F., Bairam, A., Haouzi, P., Crance, J. P., Di Giulio, C., Vert, P., & Lahiri, S. (1992). Carotid chemoreceptor response to natural stimuli in the newborn kitten. *Respiration Physiology*, 87(2), 183–193.
- Marcouiller, F., Boukari, R., Laouafa, S., Lavoie, R., & Joseph, V. (2014). The nuclear progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice. *PLoS ONE*, 9(6).
- Marques, D. A., de Carvalho, D., da Silva, G. S. F., Szawka, R. E., Anselmo-Franci, J. A., Bícigo, K. C., & Gargaglioni, L. H. (2015). Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 119(1), 61–8.
- Marti, H. H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *The Journal of experimental biology*, 207(Pt

18), 3233–3242.

- Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., ... Gassmann, M. (1996). Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, 8(4), 666–676.
- Martino, P. F., Davis, S., Opansky, C., Krause, K., Bonis, J. M., Pan, L. G., ... Forster, H. V. (2007). The cerebellar fastigial nucleus contributes to CO₂-H⁺ ventilatory sensitivity in awake goats. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 157(2-3), 242–251.
- Marzo, F., Lavorgna, A., Coluzzi, G., Santucci, E., Tarantino, F., Rio, T., ... Andreotti, F. (2008). Erythropoietin in heart and vessels: Focus on transcription and signalling pathways. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 26(3), 183–187.
- Mason, B. (2003). Himalayas age nine times overnight. *Nature*.
- Massari, V. J., Shirahata, M., Johnson, T. A., & Gatti, P. J. (1996). Carotid sinus nerve terminals which are tyrosine hydroxylase immunoreactive are found in the commissural nucleus of the tractus solitarius. *J Neurocytol*, 25(3), 197–208.
- Massey, C., Iceman, K., Johansen, S., Wu, Y., Harris, M., & Richerson, G. (2015). Isoflurane abolishes spontaneous firing of serotonin neurons and masks their pH/CO₂ chemosensitivity. *J Neurophysiol.*, 113(7), 2879–88.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., & Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production: Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(30), 19488–19493.
- Matsuoka, T., Saiki, C., & Mortola, J. P. (1994). Metabolic and ventilatory responses to anemic hypoxia in conscious rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 77(3), 1067–72.
- Maxova, H., & Vizek, M. (2001). Ventilatory response to sustained hypoxia in carotid body denervated rats. *Physiological Research*, 50(3), 327–331.
- Maxová, H., & Vizek, M. (2001). Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiological Research*, 50(1), 91–96.
- Maxwell, P. H., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Nicholls, L. G., Tan, C. C., ... Ratcliffe, P. J. (1993). Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney International*, 44(5), 1149–1162.
- McCloskey, D. (1975). Mechanisms of autonomic control of carotid chemoreceptor activity. *Respiration Physiology*, 25(1), 53–61.
- McDonald, J. D., Lin, F. K., & Goldwasser, E. (1986). Cloning, sequencing, and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene. *Molecular and cellular biology*, 6(3), 842–8.
- McGuire, M., Liu, C., Cao, Y., & Ling, L. (2008). Formation and maintenance of ventilatory long-term facilitation require NMDA but not non-NMDA receptors in awake rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 105(3), 942–50.
- Mehta, D. C., Short, J. L., & Nicolazzo, J. A. (2013). Memantine transport across the mouse blood-brain barrier is mediated by a cationic influx H⁺ antiporter. *Molecular Pharmaceutics*, 10(12),

4491–4498.

- Mellen, N. M., Janczewski, W. A., Bocchiaro, C. M., & Feldman, J. L. (2003). Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*, *37*(5), 821–826.
- Minamishima, Y., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R., & Kaelin, W. J. (2008). Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood*, *111*(6), 3236–44.
- Minson, J., Pilowsky, P., Llewellyn-Smith, I., Kaneko, T., Kapoor, V., & Chalmers, J. (1991). Glutamate in spinally projecting neurons of the rostral ventral medulla. *Brain Research*, *555*(2), 326–331.
- Miró-Murillo, M., Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Albacete-Albacete, L., Ordoñez, A., Balsa, E., ... Aragonés, J. (2011). Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-Dependent erythropoietin gene expression. *PLoS ONE*, *6*(7).
- Mitchell, J. a, & Ham, S. (1998). Scanning electron microscopy of central nervous system cerebrospinal-fluid-contacting surfaces: a bibliography (1963-1995). *Microscopy research and technique*, *41*(2), 158–71.
- Mitchell, R. A., Sinha, A. K., & McDonald, D. M. (1972). Chemoreceptive properties of regenerated endings of the carotid sinus nerve. *Brain Research*, *43*(2), 681–685.
- Miura, M., Okada, J., & Kanazawa, M. (1998). Topology and immunohistochemistry of proton-sensitive neurons in the ventral medullary surface of rats. *Brain Research*, *780*(1), 34–45.
- Miyake, T., Kung, C. K., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, *252*(15), 5558–5564.
- Mizusawa, A, Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W., & Shirato, K. (1995). Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats. *The Journal of physiology*, *489* (Pt 3(1995), 877–84.
- Mizusawa, A., Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W., Kurosawa, H., Okabe, S., Shirato, K. (1994). In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *J Physiol*, *478*(1), 55–66.
- Moguilewsky, M., & Philibert, D. (1984). RU 38486: Potent antigluocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation. *Journal of Steroid Biochemistry*, *20*(1), 271–276.
- Molkov, Y. I., Abdala, A. P. L., Bacak, B. J., Smith, J. C., Paton, J. F. R., & Rybak, I. A. (2010). Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *Journal of neurophysiology*, *104*(5), 2713–2729.
- Monti, J. (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep medicine reviews*, *14*, 319–327.
- Monti, J. M. (2010). The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Medicine Reviews*.
- Moore, P. J., Ackland, G. L., & Hanson, M. a. (1996). Unilateral cooling in the region of locus coeruleus blocks the fall in respiratory output during hypoxia in anaesthetized neonatal sheep.

- Experimental physiology*, 81(6), 983–94.
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., & Sasaki, R. (1996). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 76(1), 105–116.
- Mortola, J. P., & Lanthier, C. (1996). The ventilatory and metabolic response to hypercapnia in newborn mammalian species. *Respiration Physiology*, 103(3), 263–270.
- Mortola, J. P., Rezzonico, R., & Lanthier, C. (1989). Ventilation and oxygen consumption during acute hypoxia in newborn mammals: a comparative analysis. *Respiration Physiology*, 78(1), 31–43.
- Mortola, J., & Saiki, C. (1996). Ventilatory response to hypoxia in rats: gender differences. *Respiration Physiology*, 106(1), 21–34.
- Mukundan, H., Resta, T. C., & Kanagy, N. L. (2002). 17Beta-estradiol decreases hypoxic induction of erythropoietin gene expression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 283(2), R496–504.
- Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., Weston, M. C., Simmons, J. R., Parker, A., Bayliss, D. A., & Guyenet, P. G. (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nature neuroscience*, 7(12), 1360–1369.
- Mutolo, D., Bongiani, F., Nardone, F., & Pantaleo, T. (2005). Respiratory responses evoked by blockades of ionotropic glutamate receptors within the Bötzing complex and the pre-Bötzing complex of the rabbit. *Eur J Neurosci*, 21(1), 122–34.
- Nagao, M., Masuda, S., Abe, S., Ueda, M., & Sasaki, R. (1992). Production and ligand-binding characteristics of the soluble form of murine erythropoietin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(2), 888–897.
- Nagao, M., Suga, H., Okano, M., Masuda, S., Narita, H., Ikura, K., & Sasaki, R. (1992). Nucleotide sequence of rat erythropoietin. *BBA - Gene Structure and Expression*, 1171(1), 99–102.
- Nakano, H., Lee, S. D., & Farkas, G. A. (2002). Dopaminergic modulation of ventilation in obese Zucker rats. *J Appl Physiol*, 92(1), 25–32.
- Nattie, E. (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in Neurobiology*.
- Nattie, E. (2000). Multiple sites for central chemoreception: Their roles in response sensitivity and in sleep and wakefulness. *Respiration Physiology*, 122, 223–235).
- Nattie, E. E., Fung, M. L., Li, A., & St. John, W. M. (1993). Responses of respiratory modulated and tonic units in the retrotrapezoid nucleus to CO₂. *Respiration Physiology*, 94(1), 35–50.
- Nattie, E. E., & Li, A. (2001). CO₂ dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(4), 1247–57.
- Nattie, E. E., Li, A., Richerson, G. B., Richerson, G., & Lappi, D. a. (2004). Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *The Journal of physiology*, 556(Pt 1), 235–53.
- Nattie, E., & Li, A. (2002). CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation

- in sleep and wakefulness. *Journal of applied physiology* (1985), 92(5), 2119–30.
- Nattie, E., & Li, A. (2006). Central chemoreception 2005: A brief review. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*.
- Nattie, E., & Li, A. (2012). Central Chemoreceptors: Locations and Functions. *Compr Physiol*, 2(1), 221–254.
- Neil, E., & O'Regan, R. (1971). The effects of electrical stimulation of the distal end of the cut sinus and aortic nerves on peripheral arterial chemoreceptor activity in the cat. *Journal of Physiology*, 215, 15–32.
- Nicholas, A. P., Pieribone, V. A., Arvidsson, U., & Hokfelt, T. (1992). Serotonin-, substance P- and glutamate/aspartate-like immunoreactivities in medullo-spinal pathways of rat and primate. *Neuroscience*, 48(3), 545–559.
- Nitsos, I., & Walker, D. W. (1999). Characterization of pontine neurons which respond to hypoxia in fetal sheep. *Neuroscience Letters*, 266(1), 33–36.
- Nogawa-Kosaka, N., Hirose, T., Kosaka, N., Aizawa, Y., Nagasawa, K., Uehara, N., ... Kato, T. (2010). Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. *Experimental Hematology*, 38(5), 363–372.
- Nurse, C. A., & Fearon, I. M. (2002). Carotid body chemoreceptors in dissociated cell culture. *Microscopy Research and Technique*, 59(3), 249–255.
- O'Regan, R. (1975). The influences exerted by the centrifugal innervation of the carotid sinus nerv. Purves, MJ., editor. *The Peripheral Arterial Chemoreceptors*. London: Cambridge University Press, 221–240.
- O'Regan, R. (1981). Responses of carotid body chemosensory activity and blood flow to stimulation of sympathetic nerves in the cat. *Journal of Physiology*, 315, 81–98.
- Obara, N., Suzuki, N., Kim, K., Nagasawa, T., Imagawa, S., & Yamamoto, M. (2008). Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*, 111(10), 5223–5232.
- Ogawa, A., Terada, S., Sakuragawa, N., Masuda, S., Nagao, M., & Miki, M. (2003). Progesterone, but not 17beta-estradiol, up-regulates erythropoietin (EPO) production in human amniotic epithelial cells. *J Biosci Bioeng*, 96(5), 448–53.
- Ogawa, H., Mizusawa, a, Kikuchi, Y., Hida, W., Miki, H., & Shirato, K. (1995). Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rats during hypoxia. *The Journal of physiology*, 486, Pt 2, 495–504.
- Ogilvie, M., Yu, X., Nicolas-Metral, V., Pulido, S. M., Liu, C., Ruegg, U. T., & Noguchi, C. T. (2000). Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39754–39761.
- Ohata, M., Fredericks, W. R., Sundaram, U., & Rapoport, S. I. (1981). Effects of immobilization stress on regional cerebral blood flow in the conscious rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(2), 187–194.

- Ohtake, P. J., Simakajornboon, N., Fehniger, M. D., Xue, Y. D., & Gozal, D. (2000). N-Methyl-D-aspartate receptor expression in the nucleus tractus solitarii and maturation of hypoxic ventilatory response in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*, *162*(3 Pt 1), 1140–1147.
- OHTAKE, P. J., SIMAKAJORNBOON, N., FEHNIGER, M. D., XUE, Y.-D., & GOZAL, D. (2000). N-Methyl-D-Aspartate Receptor Expression in the Nucleus Tractus Solitarii and Maturation of Hypoxic Ventilatory Response in the Rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, *162*(3), 1140–1147.
- Ohtake, P. J., Torres, J. E., Gozal, Y. M., Graff, G. R., & Gozal, D. (1998). NMDA receptors mediate peripheral chemoreceptor afferent input in the conscious rat. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *84*(3), 853–61.
- Ohtake, P., & Jennings, D. (1992). Ventilation is stimulated by small reductions in arterial pressure in the awake dog. *J Appl Physiol (1985)*, *73*(4), 1549–57.
- Okada, Y., Chen, Z., Jiang, W., Kuwana, S.-I., & Eldridge, F. L. (2002). Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *Journal of Applied Physiology*, *93*(2), 427–439.
- Okada, Y., Kawai, A., Mückenhoff, K., & Scheid, P. (1998). Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respiration Physiology*, *111*(1), 55–63.
- Onimaru, H., Arata, A., & Homma, I. (1987). Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. *Neuroscience Letters*, *78*(2), 151–155.
- Onimaru, H., Arata, A., & Homma, I. (1988). Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Research*, *445*(2), 314–324.
- Onimaru, H., Arata, A., & Homma, I. (1989). Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale*, *76*(3), 530–536.
- Onimaru, H., & Homma, I. (1987). Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Research*, *403*(2), 380–384.
- Onimaru, H., & Homma, I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(4), 1478–1486.
- Onimaru, H., Ikeda, K., & Kawakami, K. (2008). CO₂-Sensitive Preinspiratory Neurons of the Parafacial Respiratory Group Express Phox2b in the Neonatal Rat. *Journal of Neuroscience*, *28*(48), 12845–12850.
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Mückenhoff, K., & Scheid, P. (1998). Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *The Journal of physiology*, *513*, Pt 2, 381–398.
- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K., & Feldman, J. L. (2011). Active Expiration Induced by Excitation of Ventral Medulla in Adult Anesthetized Rats. *Journal of Neuroscience*, *31*(8), 2895–2905.

- Pamenter, M. E., Carr, J. A., Go, A., Fu, Z., Reid, S. G., & Powell, F. L. (2014). Glutamate receptors in the nucleus tractus solitarius contribute to ventilatory acclimatization to hypoxia in rat. *The Journal of physiology*, 592(Pt 8), 1839–56.
- Pamenter, M. E., Go, A., Fu, Z., & Powell, F. L. (2015). No evidence of a role for neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarius in ventilatory responses to acute or chronic hypoxia in awake rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*.
- Pan, X., Suzuki, N., Hirano, I., Yamazaki, S., Minegishi, N., & Yamamoto, M. (2011). Isolation and characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS ONE*, 6(10).
- Panneton, W., & Loewy, A. (1980). Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat. *Brain Research*, 191, 239–244.
- Pappenheimer, J., Fencel, V., Heisey, S., & Held, D. (1965). ROLE OF CEREBRAL FLUIDS IN CONTROL OF RESPIRATION AS STUDIED IN UNANESTHETIZED GOATS. *American Journal of Physiology*, 208, 436–50.
- Pascual, O., Morin-Surun, M. P., Barna, B., Denavit-Saubie, M., Pequignot, J. M., & Champagnat, J. (2002). Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J Physiol*, 544(Pt 2), 511–520.
- Pascual, O., Roux, J., Soulage, C., Morin-Surun, M., Denavit-Saubie, M., & Pequignot, J. (2004). Carotid chemodenervation approach to study oxygen sensing in brain stem catecholaminergic cells. *Methods Enzymol*, 381, 422–49.
- Patel, G. M., Horstman, D. J., Adams, J. M., & Rich, G. F. (1998). Nitric oxide synthase inhibitors alter ventilation in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology*.
- Paterson, D. S., Hilaire, G., & Weese-Mayer, D. E. (2009). Medullary serotonin defects and respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 168(1-2), 133–143.
- Paterson, D., & Thompson, E. (2006). Multiple Serotonergic Brainstem Abnormalities in Sudden Infant Death Syndrome. *JAMA*, 296(17), 2124–2132.
- Patrone, L. G. A., Bicego, K. C., Hartzler, L. K., Putnam, R. W., & Gargaglioni, L. H. (2014). Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the locus coeruleus in unanesthetized adult rats. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 190(1), 86–95.
- Patwari, P., Carroll, M., Rand, C., Kumar, R., Harper, R., & Weeze-Mayer, D. (2010). A human mutation in Phox2B causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea and specific loss of parafacial neurons. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 173, 322–335.
- Pawloski-Dahm, C., & Gordon, F. J. (1992). Evidence for a kynurenate-insensitive glutamate receptor in nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 262(5), H1611–1615.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press (2nd).
- Pearce, W. (2006). Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *Journal of applied physiology*,

- 100(2), 731–738.
- Peers, C. (1990). EFFECT OF LOWERED EXTRACELLULAR pH ON Ca²⁺-DEPENDENT K⁺ CURRENTS IN TYPE I CELLS FROM THE NEONATAL RAT CAROTID BODY. *Journal of Physiology*, 422, 381–395.
- Pepper, D. R., Landauer, R. C., & Kumar, P. (1995). Postnatal development of CO₂-O₂ interaction in the rat carotid body in vitro. *The Journal of physiology*, 485, Pt 2, 531–541.
- Pequignot, J. M., Spielvogel, H., Caceres, E., Rodriguez, A., Sempor??, B., Pequignot, J., & Favier, R. (1997). Influence of gender and endogenous sex steroids on catecholaminergic structures involved in physiological adaptation to hypoxia. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 433(5), 580–586.
- Petruzzelli, R., Aureli, G., Lania, A., Galtieri, A., Desideri, A., & Giardina, B. (1996). Diving behaviour and haemoglobin function: the primary structure of the alpha- and beta-chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) and its functional implications. *J. Biochem*, 316, 959–965.
- Peyronnet, J., Roux, J. C., Mamet, J., Perrin, D., Lachuer, J., Pequignot, J. M., & Dalmaz, Y. (2007). Developmental plasticity of the carotid chemoafferent pathway in rats that are hypoxic during the prenatal period. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2865–2872.
- Pichon, A., Lamarre, Y., Voituron, N., Marchant, D., Vilar, J., Richalet, J. P., & Connes, P. (2014). Red blood cell deformability is very slightly decreased in erythropoietin deficient mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 56(1), 41–46.
- Pichon, A., Launay, T., Marchant, D., Quidu, P., Macarlupu, J., & Richalet, J. (2016). Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia*, 4, 29–39.
- Pichon, A., Voituron, N., Bai, Z., Jeton, F., Tana, W., Marchant, D., Ge, R. L. (2015). Comparative ventilatory strategies of acclimated rats and burrowing plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in response to hypoxic-hypercapnia. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 187, 103–110.
- Pichon, A., Zhenzhong, B., Favret, F., Jin, G., Shufeng, H., Marchant, D., Ge, R.-L. (2009). Long-term ventilatory adaptation and ventilatory response to hypoxia in plateau pika (*Ochotona curzoniae*): role of nNOS and dopamine. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(4), R978–R987.
- Pichon, A., Zhenzhong, B., Marchant, D., Jin, G., Voituron, N., Haixia, Y., Ge, R.-L. (2013). Cardiac adaptation to high altitude in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Physiological reports*, 1.
- Pietruschka, F., & Acker, A. (1985). Membrane potential and Ca influx in hypoxic and normoxic carotid body type-I cells. *Adv Exp Med Biol*, 191, 727–35.
- Pineda, J., & Aghajanian, G. K. (1997). Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, 77(3), 723–743.
- Pitts, R. (1941). The differentiation of respiratory centers. *American Journal of Physiology*, 134, 192–201.
- Pitts, R. (1946). Organisation of the respiratory center. *Physiol Rev*, 26, 609–630.
- Pitts, R., Magoun, H., & Ranson, S. (1939). Localization of the medullary respiratory centers in the cat.

- American Journal of Physiology*, 126, 673–688.
- Ponte, J., & Purves, M. (1974). Frequency response of carotid body chemoreceptors in the cat to changes of PaCO₂, PaO₂, and pHa. *J. Appl. Physiol.*, 37, 635–647.
- Powell, F. L., Milsom, W. K., & Mitchell, G. S. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respiration Physiology*, 112(2), 123–134.
- Prabhakar, N. R., Peng, Y. J., Yuan, G., & Kumar, G. K. (2006). Reactive oxygen species facilitate oxygen sensing. *Novartis Foundation Symposium*, 272, 95,131–140.
- Prieto-Lloret, J., Donnelly, D. F., Rico, a J., Moratalla, R., González, C., & Rigual, R. J. (2007). Hypoxia transduction by carotid body chemoreceptors in mice lacking dopamine D(2) receptors. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(4), 1269–1275.
- Ptak, K., Yamanishi, T., Aungst, J., Milescu, L. S., Zhang, R., Richerson, G. B., & Smith, J. C. (2009). Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(12), 3720–3737.
- Purves, M. (1970). The role of the cervical sympathetic nerve in the regulation of oxygen consumption of the carotid body of the cat. *J Physiol. Journal of Physiology*, 209, 417–431.
- Putnam, R. W., Conrad, S. C., Gdovin, M. J., Erlichman, J. S., & Leiter, J. C. (2005). Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Pyatin, V. F., & Tatarnikov, V. S. (2005). Nitric oxide in the A5 region modulates reaction of the respiratory center and blood pressure to hypoxia in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 139(2), 159–162.
- Pyatin, V. F., & Tatarnikov, V. S. (2015). NMDA Receptors of A5 Area in the Regulation of Blood Pressure and Respiratory Activity during Hypoxia in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 159(4), 420–423.
- Pyatin, V. F., Tatarnikov, V. S., & Glakova, E. (2006). Control of respiratory and hypotensive response during hypoxic chemoreflex by A5 region neurons in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 142(6), 654–6.
- Qi, X., Wang, X., Zhu, S., Rao, X., Wei, L., & Wei, D. (2008). Hypoxic adaptation of the hearts of plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Sheng Li Xue*, 60(3), 348–54.
- Ravid, O., Shams, I., Ben Califa, N., Nevo, E., Avivi, A., & Neumann, D. (2007). An extracellular region of the erythropoietin receptor of the subterranean blind mole rat *Spalax* enhances receptor maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(36), 14360–5.
- Ray, R. S., Corcoran, A. E., Brust, R. D., Kim, J. C., Richerson, G. B., Nattie, E., & Dymecki, S. M. (2011). Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science*, 333(6042), 637–42.
- Rebuck, A., Kangalee, M., Pengelly, L., & Campbell, E. (1973). Correlation of ventilatory responses to

- hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol*, 35(2), 173–7.
- Regensteiner, J. G., McCullough, R. G., McCullough, R. E., Pickett, C. K., & Grindlay Moore, L. (1990). Combined effects of female hormones and exercise on hypoxic ventilatory response. *Respiration Physiology*, 82(1), 107–114.
- Regensteiner, J. G., Woodard, W. D., Hagerman, D. D., Weil, J. V, Pickett, C. K., Bender, P. R., & Moore, L. G. (1989). Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *Journal of Applied Physiology*, 66(2), 808–13.
- Reid, S. G., & Powell, F. L. (2005). Effects of chronic hypoxia on MK-801-induced changes in the acute hypoxic ventilatory response. *J Appl Physiol*, 99(6), 2108–2114.
- Reiner, A., Veenman, C. L., Medina, L., Jiao, Y., Del Mar, N., & Honig, M. G. (2000). Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *Journal of Neuroscience Methods*, 103(1), 23–37.
- Rekling, J. C., & Feldman, J. L. (1998). PreBötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annual review of physiology*, 60(1), 385–405.
- Remy, I. (1999). Erythropoietin Receptor Activation by a Ligand-Induced Conformation Change. *Science*, 283(5404), 990–993.
- Ribas-Salgueiro, J. L., Gaytan, S. P., Ribas, J., & P??saro, R. (2005). Characterization of efferent projections of chemosensitive neurons in the caudal parapyramidal area of the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 66(3), 235–248.
- Richalet, J. P., Larmignat, P., Rathat, C., Keromes, A., Baud, P., & Lhoste, F. (1988). Decreased cardiac response to isoproterenol infusion in acute and chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, 65(5), 1957–1961.
- Richalet, J.-P., & Lhuissier, F. J. (2015). Aging, Tolerance to High Altitude, and Cardiorespiratory Response to Hypoxia. *High Altitude Medicine & Biology*, 16(2), 117–124.
- Richerson, G. B. (2004). Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(6), 449–461.
- Richerson, G. B., Wang, W., Tiwari, J., & Risso, S. (2001). Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla, 129, 175–189.
- Richerson, G., Wang, W., Hodges, M., Dohle, C., & Diez-Sampedro, A. (2005). Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Experimental physiology*, 90(3), 259–66.
- Richter, D. W., Schmidt-Garcon, P., Pierrefiche, O., Bischoff, A. M., & Lalley, P. M. (1999). Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *Journal of Physiology*, 514(2), 567–578.
- Rigatto, H. (1984). Control of ventilation in the newborn. *Annual review of physiology*, 46, 661–74.
- Rigatto, H., Wiebe, C., Rigatto, C., Lee, D., & Cates, D. (1988). Ventilatory response to hypoxia in unanesthetized newborn kittens. *J Appl Physiol*, 64(6), 2544–51.
- Robach, P., Fulla, Y., Westerterp, K., & Richalet, J. (2004). Comparative response of EPO and soluble

- transferrin receptor at high altitude. *Med Sci Sports Exerc*, 36(9), 1493–8.
- Rossert, J., & Eckardt, K. (2005). Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*, 20(6), 1025–28.
- Rossor, T., Soe, A., Bhat, R., & Greenough, A. (2014). Congenital central hypoventilation syndrome and carbon dioxide sensitivity. *European Journal of Pediatrics*, 173(12), 1727–1730.
- Roux, J. C., Pequignot, J. M., Dumas, S., Pascual, O., Ghilini, G., Pequignot, J., ... Denavit-Saubié, M. (2000). O₂-sensing after carotid chemodenervation: Hypoxic ventilatory responsiveness and upregulation of tyrosine hydroxylase mRNA in brainstem catecholaminergic cells. *European Journal of Neuroscience*, 12(9), 3181–3190.
- Ruffault, P. L., D'Autréaux, F., Hayes, J. A., Nomaksteinsky, M., Autran, S., Fujiyama, T., ... Goridis, C. (2015). The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO₂. *eLife*, 2015(4), 1–25.
- Rundqvist, H., Rullman, E., Sundberg, C. J., Fischer, H., Eisleitner, K., Ståhlberg, M., Gustafsson, T. (2009). Activation of the erythropoietin receptor in human skeletal muscle. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 161(3), 427–34.
- Ruschitzka, F. T., Wenger, R. H., Stallmach, T., Quaschnig, T., de Wit, C., Wagner, K., Luscher, T. F. (2000). Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21), 11609–11613.
- Saha, S., Sieghart, W., McWilliam, P. N., & Batten, T. F. C. (2001). γ -Aminobutyric Acid Receptor (GABAA) Subunits in Rat Nucleus Tractus Solitarius (NTS) Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Immunohistochemistry, 257, 241–257.
- Saiki, C., & Mortola, J. (1996). Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J Physiol*, 491(Part 1), 261–269.
- Sampson, S. (1972). Mechanism of efferent inhibition of carotid body chemoreceptors in the cat. *Brain Research*, 45, 266–270.
- Sanchis-Gomar, F., Garcia-Gimenez, J. L., Pareja-Galeano, H., Romagnoli, M., Perez-Quilis, C., & Lippi, G. (2014). Erythropoietin and the heart: Physiological effects and the therapeutic perspective. *International Journal of Cardiology*.
- Santin, J. M., & Hartzler, L. K. (2013). Respiratory signaling of locus coeruleus neurons during hypercapnic acidosis in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 185(3), 553–561.
- Schmitt, P., Soulier, V., Péquignot, J. M., Pujol, J. F., & Denavit-Saubié, M. (1994). Ventilatory acclimatization to chronic hypoxia: relationship to noradrenaline metabolism in the rat solitary complex. *The Journal of physiology*, 477, Pt 2(1994), 331–7.
- Schoene, R. B., Robertson, H. T., Pierson, D. J., & Peterson, A. P. (1981). Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 50(6), 1300–5.
- Schreiber, J. R., Hsueh, A. J. W., & Baulieu, E. E. (1983). Binding of the anti-progestin RU-486 to rat ovary steroid receptors. *Contraception*, 28(1), 77–85.

- Schwartz, N. (1964). Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *American Journal of Physiology*, *107*, 1251–1259.
- Schwarzacher, S. W., Rüb, U., & Deller, T. (2011). Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain*, *134*(1), 24–35.
- Schwenke, D. O., Pearson, J. T., Kangawa, K., & Shirai, M. (2006). Does central nitric oxide chronically modulate the acute hypoxic ventilatory response in conscious rats? *Acta Physiologica*, *186*(4), 309–318.
- Semenza, G. L. (2004a). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *19*, 176–82.
- Semenza, G. L. (2004b). O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *96*(3), 1173–1177; discussion 1170–1172.
- Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B. H., ... Yu, a. (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney international*, *51*(2), 553–555.
- Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., & Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(13), 5680–4.
- Sheafor, B. a. (2003). Metabolic enzyme activities across an altitudinal gradient: an examination of pikas (genus *Ochotona*). *The Journal of experimental biology*, *206*(Pt 7), 1241–1249.
- Shoemaker, C. B., & Mitscock, L. D. (1986). Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol*, *6*(3), 849–858.
- Shughrue, P. J., & Merchenthaler, I. (2001). Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, *436*(1), 64–81.
- Silva, J. N., Tanabe, F. M., Moreira, T. S., & Takakura, A. C. (2016). Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *227*, 9–22.
- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nuñez, G., & Fernández-Luna, J. L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*, *88*(5), 1576–82.
- Simakajornboon, N., & Kuptanon, T. (2005). Maturation changes in neuromodulation of central pathways underlying hypoxic ventilatory response. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Simonian, S. X., & Herbison, A. E. (1996). Localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity within sub-populations of noradrenergic A1 and A2 neurons in the rat. *Brain Research*, *732*(1-2), 247–252.
- Sirén, A., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., ... Ghezzi, P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(7), 4044–9.

- Siren, A., Knerlich, F., Poser, W., Gleiter, C., Bruck, W., & Ehrenreich, H. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*, *101*(3), 271–6.
- Smeraski, C. A., Dunwiddie, T. V., Diao, L., & Finger, T. E. (1998). Excitatory amino acid neurotransmission in the primary gustatory nucleus of the goldfish *Carassius auratus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *855*, 442–449.
- Smith, C., Blain, G., Henderson, K., & Dempsey, J. (2015). Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂: role of carotid body CO₂. *Journal of Physiology*, *593*(18), 4225–43.
- Smith, J. C., Abdala, A. P. L., Koizumi, H., Rybak, I. A., & Paton, J. F. R. (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *Journal of neurophysiology*, *98*(6), 3370–87.
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., & Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5032), 726–9.
- Sola, A., Wen, T., Hamrick, S., & Ferriero, D. (2005). Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatr Res*, *57*(5 Pt 2), 110R–117R.
- Soliz, J., Gassmann, M., & Joseph, V. (2007). Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *The Journal of physiology*, *583*(Pt 1), 329–36.
- Soliz, J., Joseph, V., Soulage, C., Becskei, C., Vogel, J., Pequignot, J. M., ... Gassmann, M. (2005). Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *The Journal of physiology*, *568*(Pt 2), 559–71.
- Soliz, J., Soulage, C., Hermann, D. M., Gassmann, M., & Bernard, C. (2007). Acute and chronic exposure to hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice overexpressing erythropoietin, 1702–1710.
- Song, G. (2006). Cytoarchitecture of Pneumotaxic Integration of Respiratory and Nonrespiratory Information in the Rat. *Journal of Neuroscience*, *26*(1), 300–310.
- Song, G., Xu, H., Wang, H., MacDonald, S. M., & Poon, C. S. (2011). Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kölliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. *Neuroscience*, *175*, 145–153.
- Spyer, K. (1981). Neural organisation and control of the baroreceptor reflex. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *88*, 24–124.
- Spyer, K. (1994). Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol*, *474*(1), 1–19.
- Spyer, K. M., & Gourine, A. V. (2009). Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *364*(1529), 2603–2610.

- St.-John, W. M. (1998). Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Progress in Neurobiology*, 56(1), 97–117.
- Stark, R. I., Daniel, S. S., Kim, Y. I., Leung, K., Myers, M. M., & Tropper, P. J. (1994). Patterns of fetal breathing in the baboon vary with EEG sleep state. *Early Human Development*, 38(1), 11–26.
- Stornetta, R. L., Moreira, T. S., Takakura, A. C., Kang, B. J., Chang, D. A., West, G. H., ... Guyenet, P. G. (2006). Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10305–14.
- Stunden, C., Filosa, J., Garcia, A., Dean, J., & Putnam, R. (2001). Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respiration Physiology*, 127(2-3), 135–55.
- Suguihara, C., Hehre, D., & Bancalari, E. (1994). Effect of dopamine on hypoxic ventilatory response of sedated piglets with intact and denervated carotid bodies. *J. Appl. Physiol.*, 77(1), 285–9.
- Sumitra, M., Manikandan, P., Rao, K. V. K., Nayeem, M., Manohar, B. M., & Puvanakrishnan, R. (2004). Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats - A comparative analysis. *Life Sciences*, 75(15), 1887–1896.
- Suzue, T. (1984). Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *The Journal of physiology*, 354(1984), 173–183.
- Suzuki, N. (2015). Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 235(3), 233–40.
- Suzuki, N., Hirano, I., Pan, X., Minegishi, N., & Yamamoto, M. (2013). Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nature communications*, 4, 2902.
- Suzuki, N., Obara, N., Pan, X., Watanabe, M., Jishage, K.-I., Minegishi, N., & Yamamoto, M. (2011). Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Molecular and cellular biology*, 31(18), 3896–905.
- Tan, W., Janczewski, W. A., Yang, P., Shao, X. M., Callaway, E. M., & Feldman, J. L. (2008). Silencing preBötzing complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat.
- Tan, W., Sherman, D., Turesson, J., Shao, X. M., Janczewski, W. A., & Feldman, J. L. (2012). Reelin demarcates a subset of pre-Bötzing complex neurons in adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 520(3), 606–619.
- Tanaka, J., Koshimura, K., Sohmiya, M., Murakami, Y., & Kato, Y. (2001). Involvement of tetrahydrobiopterin in trophic effect of erythropoietin on PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(2), 358–62.
- Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., & Sigler, P. B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 5998–6003.

- Tankersley, C., Haxhiu, M., & Gauda, E. (2002). Differential CO₂-induced c-fos gene expression in the nucleus tractus solitarius of inbred mouse strains. *J Appl Physiol* (1985), 92(3), 1277–84.
- Taranakov, I., Dymetska, A., & Tarasova, N. (2005). The effect of the NMDA-receptor blocker MK-801 on sensitivity of the respiratory system to carbon dioxide. *Patol Fiziol Eksp Ter*, (2), 13–5.
- Tatsumi, K., Hannhart, B., Pickett, C. K., Weil, J. V., & Moore, L. G. (1991). Influences of gender and sex hormones on hypoxic ventilatory response in cats. *J Appl Physiol*, 71(5), 1746–1751.
- Taube, H. (1743). Dissertationem inauguralem de vera nervi inter costalis origine. *Gottigen*.
- Taylor, N. C., Li, A., & Nattie, E. E. (2005). Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *The Journal of physiology*, 566(Pt 2), 543–557.
- Teng, R., Gavrilova, O., Suzuki, N., Chanturiya, T., Schimel, D., Hugendubler, L., Noguchi, C. T. (2011). Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. *Nature Communications*, 2, 520.
- Teppema, L. J., Berkenbosch, A., Veening, J. G., & Olievier, C. N. (1994). Hypercapnia induces c-fos expression in neurons of retrotrapezoid nucleus in cats. *Brain Research*, 635(1-2), 353–356.
- Teppema, L. J., & Dahan, A. (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiological reviews*, 90(2), 675–754.
- Teppema, L. J., Veening, J. G., Kranenburg, A., Dahan, A., Berkenbosch, A., & Olievier, C. (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *Journal of Comparative Neurology*, 388(2), 169–190.
- Teran, F. A., Massey, C. A., & Richerson, G. B. (2014). Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: where are we now? *Progress in brain research*.
- Thoby-Brisson, M., Karlén, M., Wu, N., Charnay, P., Champagnat, J., & Fortin, G. (2009). Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzing complex. *Nature neuroscience*, 12(8), 1028–35.
- Thoby-brisson, M., Trinh, J., Champagnat, J., & Fortin, G. (2005). Emergence of the Pre-Bötzing Respiratory Rhythm Generator in the Mouse Embryo. *Journal of Neuroscience*, 25(17), 4307–4318.
- Tokarev, D., & Jezova, D. (1997). Effect of central administration of the non-NMDA receptor antagonist DNQX on ACTH and corticosterone release before and during immobilization stress. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.*, 19 (0379-0355 (Print)), 323–328.
- Torreálba, F., & Calder??n, F. (1990). Central projections of coarse and fine vagal axons of the cat. *Brain Research*, 510(2), 351–354.
- Torreálba, F., & Claps, A. (1988). The carotid sinus connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Research*, 455(1), 134–143.
- Trost, N., Hevir, N., Rizner, T. L., & Debeljak, N. (2013). Correlation between erythropoietin receptor(s) and estrogen and progesterone receptor expression in different breast cancer cell

- lines. *International journal of molecular medicine*, 31(3), 717–725.
- Trouth, C., Loeschcke, H., & Berndt, J. (1973). Topography of the circulatory responses to electrical stimulation in the medulla oblongata. Relationship to respiratory responses. *Plügers Arch.*, 339(3), 185–201.
- Turek, Z., Kreuzer, F., & Hoofd, L. (1973). Advantage or disadvantage of a decrease of blood oxygen affinity for tissue oxygen supply at hypoxia. A theoretical study comparing man and rat. *Plügers Arch.*, 342(3), 185–97.
- Tzouvelekis, A., Harokopos, V., Paparountas, T., Oikonomou, N., Chatziioannou, A., Vilaras, G., ... Aidinis, V. (2007). Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(11), 1108–19.
- Veasey, S. C., Fornal, C. a, Metzler, C. W., & Jacobs, B. L. (1995). Response of serotonergic caudal raphe neurons in relation to specific motor activities in freely moving cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(7 Pt 2), 5346–5359.
- Venkatesha, S. H., Dudics, S., Acharya, B., & Moudgil, K. D. (2015). Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., ... Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine*, 12(6), 642–9.
- Verna, A., Baretts, A., & Salat, C. (1984). Distribution of sympathetic nerve endings within the rabbit carotid body: A histochemical and ultrastructural study. *J Neurocytol*, 13, 849–865.
- Vezzani, a, Serafini, R., Stasi, M. a, Caccia, S., Conti, I., Tridico, R. V, & Samanin, R. (1989). Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 249(1), 278–83.
- Viemari, J. C., Bévengut, M., Burnet, H., Coulon, P., Pequignot, J. M., Tiveron, M. C., & Hilaire, G. (2004). Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(4), 928–37.
- Viemari, J. C., Maussion, G., Bévengut, M., Burnet, H., Pequignot, J. M., Népote, V., ... Hilaire, G. (2005). Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *European Journal of Neuroscience*, 22(10), 2403–2412.
- Viemari, J.-C., Menuet, C., & Hilaire, G. (2013). [Electrophysiological, molecular and genetic identifications of the pre-Bötzing complex]. *Médecine sciences : M/S*, 29(10), 875–82.
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., ... Ghezzi, P. (2003). Erythropoietin Selectively Attenuates Cytokine Production and Inflammation in Cerebral Ischemia by Targeting Neuronal Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 971–975.
- Villafuerte, F. C., Macarlupú, J. L., Anza-Ramírez, C., Corrales-Melgar, D., Vizcardo-Galindo, G., Corante, N., & León-Velarde, F. (2014). Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-altitude excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *Journal of applied*

- physiology*, 117(11), 1356–62.
- Vincent, S. G., Waddell, A. E., Caron, M. G., Walker, J. K. L., & Fisher, J. T. (2007). A murine model of hyperdopaminergic state displays altered respiratory control. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), 1463–71.
- Vizek, M., Pickett, C. K., & Weil, J. V. (1987). Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin. *Journal of Applied Physiology*, 63(4), 1658–64.
- Vogel, J., & Gassmann, M. (2011). Erythropoietic and non-erythropoietic functions of erythropoietin in mouse models. *The Journal of physiology*, 589(Pt 6), 1259–1264.
- Voituron, N., Frugière, A., Champagnat, J., & Bodineau, L. (2006). Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. *The Journal of physiology*, 577(Pt 1), 55–68.
- Voituron, N., Frugière, A., Mc Kay, L. C., Romero-Granados, R., Domínguez-del-Toro, E., Saadani-Makki, F., ... Bodineau, L. (2011). The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience*, 194, 95–111.
- Voituron, N., Zanella, S., Menuet, C., Dutschmann, M., & Hilaire, G. (2009). Early breathing defects after moderate hypoxia or hypercapnia in a mouse model of Rett syndrome. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 168(1-2), 109–118.
- Voituron, N., Zanella, S., Menuet, C., Lajard, A. M., Dutschmann, M., & Hilaire, G. (2010). Early abnormalities of post-sigh breathing in a mouse model of Rett syndrome. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 170(2), 173–182.
- von Euler, U., Liliestrand, G., & Zotterman, Y. (1939). The excitation mechanism of the chemoreceptors of the carotid body. *Scand Arch Physiol*, 83, 132–152.
- Wagner, B. P., Stinglele, R., Williams, M. a, Wilson, D. a, Traystman, R. J., & Hanley, D. F. (1997). NO contributes to neurohypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon-induced hyperemia in cats. *The American journal of physiology*, 273(4 Pt 2), H1994–2000.
- Wakai, J., Takamura, D., Morinaga, R., Nakamuta, N., & Yamamoto, Y. (2015). Differences in respiratory changes and Fos expression in the ventrolateral medulla of rats exposed to hypoxia, hypercapnia, and hypercapnic hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 215, 1–9.
- Wakefield, I. D., March, J. E., Kemp, P. A., Valentin, J. P., Bennett, T., & Gardiner, S. M. (2003). Comparative regional haemodynamic effects of the nitric oxide synthase inhibitors, S-methyl-L-thiocitrulline and L-NAME, in conscious rats. *Br J Pharmacol*, 139(6), 1235–1243.
- Walker, B. R., Adams, E. M., & Voelkel, N. F. (1985). Ventilatory responses of hamsters and rats to hypoxia and hypercapnia. *Journal of applied physiology*, 59(6), 1955–60.
- Walker, D. (1995). Hypoxic inhibition of breathing and motor activity in the foetus and newborn. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22(8), 533–6.
- Walker, D. W. (1983). Breathing in Fetal Lambs: The Effect of Brain Stem Sections. *Journal of Physiology*, 535–553.
- Walker, D. W., Lee, B., & Nitsos, I. (2000). Effect of hypoxia on respiratory activity in the foetus. در

- Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27, 110–113).
- Wang, Sheng; Shi, Yingtang; Shu, Shaofang; Guyenet, Patrice G.; Baylis, Douglas A. (Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, V. (2013). Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. *J. Neurosci.*, 33(18), 7756–7761.
- Wang, C., Zhao, X., Liu, Z., Lippert, P. C., Graham, S. a, Coe, R. S., Li, Y. (2008). Constraints on the early uplift history of the Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 4987–4992.
- Wang, E., Kirby, E., Furlong, K. P., van Soest, M., Xu, G., Shi, X., Hodges, K. V. (2012). Two-phase growth of high topography in eastern Tibet during the Cenozoic. *Nature Geoscience*, 5(9), 640–645.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993a). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 268(29), 21513–21518.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993b). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ward, M. E., Toporsian, M., Scott, J. A., Teoh, H., Govindaraju, V., Quan, A., Marsden, P. A. (2005). Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3128–3139.
- Wasicko, M. J., Sterni, L. M., Bamford, O. S., Montrose, M. H., & Carroll, J. L. (1999). Resetting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. *Journal of Physiology*, 514(2), 493–503.
- Webb, C. L., & Milsom, W. K. (1994). Ventilatory Responses to Acute and Chronic Hypoxic Hypercapnia in the Ground-Squirrel. *Respiration Physiology*, 98(2), 137–152.
- Weese-Mayer, D. E., Berry-Kravis, E. M., Ceccherini, I., & Rand, C. M. (2008). Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and sudden infant death syndrome (SIDS): Kindred disorders of autonomic regulation. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 164(1-2), 38–48.
- Weeze-Mayer, D. (2006). Sudden Infant Death Syndrome: Is Serotonin the Key Factor? *JAMA*, 296(17), 2143–2144.
- Wen, D., Boissel, J. P., Tracy, T. E., Gruninger, R. H., Mulcahy, L. S., Czelusniak, J., Bunn, H. F. (1993). Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, 82(5), 1507–16.
- Wenger, R. H., & Gassmann, M. (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biological chemistry*, 378(7), 609–16.
- Wenninger, J. M., Olson, E. B., Cotter, C. J., Thomas, C. F., & Behan, M. (2009). Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 106(5), 1522–8.
- West, J. B. (2013). Joseph Barcroft's studies of high altitude physiology. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 305(8), L523–529.

- Weston, M., Wang, H., Stornetta, R. L., Sevigny, C. P., & Guyenet, P. G. (2003). Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 525–541.
- White, D. P., Douglas, N. J., Pickett, C. K., Weil, J. V., & Zwillich, C. W. (1983). Sexual influence on the control of breathing. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 54(4), 874–9.
- Whitney, G. M., Ohtake, P. J., Simakajornboon, N., Xue, Y. D., & Gozal, D. (2000). AMPA glutamate receptors and respiratory control in the developing rat: anatomic and pharmacological aspects. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 278(2), R520–8.
- Wickström, R., Hökfelt, T., & Lagercrantz, H. (2002). Development of CO₂-response in the early newborn period in rat. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 132(2), 145–158.
- Wiessner, C., Allegrini, P. R., Ekatodramis, D., Jewell, U. R., Stallmach, T., & Gassmann, M. (2001). Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(7), 857–864.
- Williams, D. D., & Rausch, R. L. (1973). Seasonal carbon dioxide and oxygen concentrations in the dens of hibernating mammals (Sciuridae). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 44(4).
- Winter, S. M., Fresemann, J., Schnell, C., Oku, Y., Hirrlinger, J., & Hülsmann, S. (2009). Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 458(3), 459–469.
- Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., & Ihle, J. N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, 74(2), 227–236.
- Wixson, S., White, W., Hughes, H. J., Lang, C., & Marshall, W. (1987). The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab Anim Sci*, 37(6), 736–42.
- Wong-Riley, M. T. T., & Liu, Q. (2008). Neurochemical and physiological correlates of a critical period of respiratory development in the rat. *Respiratory Physiology and Neurobiology*.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., & Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 83(1), 59–67.
- Wu, Y. W., Bauer, L. A., Ballard, R. A., Ferriero, D. M., Glidden, D. V., Mayock, D. E., ... Juul, S. E. (2012). Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. *Pediatrics*, 130(4), 683–91.
- Xenocostas, A., Cheung, W. K., Farrell, F., Zakszewski, C., Kelley, M., Lutynski, A., ... Messner, H. A. (2005). The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol*, 61(3), 189–195.

- Y. Meltzer, H., W. Massey, B., & Horiguchi, M. (2012). Serotonin Receptors as Targets for Drugs Useful to Treat Psychosis and Cognitive Impairment in Schizophrenia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(8), 1572–1586.
- Yalcin, M., Ak, F., Cangul, I. T., & Erturk, M. (2007). The effect of centrally administered erythropoietin on cardiovascular and respiratory system of anaesthetized rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *134*(1-2), 1–7.
- Yamamoto, M., Koshimura, K., Kawaguchi, M., Sohmiya, M., Murakami, Y., & Kato, Y. (2000). Stimulating effect of erythropoietin on the release of dopamine and acetylcholine from the rat brain slice. *Neuroscience Letters*, *292*(2), 131–133.
- Yamazaki, S., Souma, T., Hirano, I., Pan, X., Minegishi, N., Suzuki, N., & Yamamoto, M. (2013). A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nature communications*, *4*, 1950.
- Yang, B., Qin, C., Wang, J., He, M., Melvin, T. M., Osborn, T. J., & Briffa, K. R. (2014). A 3,500-year tree-ring record of annual precipitation on the northeastern Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(8), 2903–8.
- Yasuhara, H., Nakayama, S., & Mayahara, T. (1980). Depressed respiration induced by intravenously administered dopamine in anesthetized dogs. *Jpn J Pharmacol*, *30*(2), 251–5.
- Yet, M., & Jones, S. (1993). The extracytoplasmic domain of the erythropoietin receptor forms a monomeric complex with erythropoietin. *Blood*, *82*(6), 1713–9.
- Yingzhong, Y., Yue, C., Guoen, J., Zhenzhong, B., Lan, M., Haixia, Y., & Rili, G. (2007). Molecular cloning and characterization of hemoglobin α and β chains from plateau pika (*Ochotona curzoniae*) living at high altitude. *Gene*, *403*(1-2), 118–124.
- Yokota, S., Kaur, S., VanderHorst, V., Saper, C., & Chamberlin, N. (2015). Respiratory-related Outputs of Glutamatergic, Hypercapnia- Responsive Parabrachial Neurons in Mice. *Journal of Comparative Neurology*, *523*(6), 907–920. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8>.Screening
- Yokota, S., Niu, J. G., Tsumori, T., Oka, T., & Yasui, Y. (2011). Glutamatergic Kölliker-Fuse nucleus neurons innervate hypoglossal motoneurons whose axons form the medial (protruder) branch of the hypoglossal nerve in the rat. *Brain Research*, *1404*, 10–20.
- Yokoyama, T., Misuzu, Y. Y., & Yamamoto, Y. (2013). Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter in the carotid body of the rat. *Histochemistry and Cell Biology*, *140*(2), 147–155.
- Young, W. C., Boling, J. L., & Blandau, R. J. (1941). The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *The Anatomical Record*, *80*(03), 37–45.
- Yu, X., Shacka, J. J., Eells, J. B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R. M., Beleslin-Cokic, B., ... Noguchi, C. T. (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*, *129*(2), 505–516.
- Zabka, A. G., Behan, M., Mitchell, G. S., Aitken, M., Franklin, J., Pierson, D., ... Mitchell, G. (2001). Selected contribution: Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are

- influenced by age and by the estrus cycle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(6), 2831–8.
- Zafiriou, M. P., Noack, C., Unsöld, B., Didie, M., Pavlova, E., Fischer, H. J., Zelarayan, L. C. (2014). Erythropoietin responsive cardiomyogenic cells contribute to heart repair post myocardial infarction. *Stem Cells*, 32(9), 2480–2491.
- Zanella, S., Viemari, J. C., & Hilaire, G. (2007). Muscarinic receptors and alpha2-adrenoceptors interact to modulate the respiratory rhythm in mouse neonates. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 157(2-3), 215–225.
- Zanella, S., Watrin, F., Mebarek, S., Marly, F., Roussel, M., Gire, C., Hilaire, G. (2008). Necdin plays a role in the serotonergic modulation of the mouse respiratory network: implication for Prader-Willi syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(7), 1745–1755.
- Zapata, P., Iturriaga, R., & Larrain, C. (1996). Domperidone as a tool to assess the role of dopamine within carotid body chemoreception. *Adv Exp Med Biol*, 410, 291–7.
- Zhang, F., Xing, J., Liou, A. K. F., Wang, S., Gan, Y., Luo, Y., Cao, G. (2010). Enhanced Delivery of Erythropoietin Across the Blood-Brain Barrier for Neuroprotection Against Ischemic Neuronal Injury. *Translational Stroke Research*, 1(2), 113–121.
- Zhang, L., Wilson, C. G., Liu, S., Haxhiu, M. A., & Martin, R. J. (2003). Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 136(1), 25–37.
- Zhang, W., & Mifflin, S. W. (2007). Modulation of synaptic transmission to second-order peripheral chemoreceptor neurons in caudal nucleus tractus solitarius by alpha1-adrenoreceptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(2), 670–677.
- Zhu, B., Kidd, W., Rowley, D., Currie, B., & Shafique, N. (2005). Age of Initiation of the India-Asia collision in the East-Central Himalaya. *J Geol*, 113, 265–285.
- Zwain, I. H., & Yen, S. S. C. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140(8), 3843–3852.

Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice

Aurélien Pichon¹⁻³
 Florine Jeton^{1,2}
 Raja El Hasnaoui-Saadani⁴
 Luciana Hagström⁵
 Thierry Launay⁶
 Michèle Beaudry¹
 Dominique Marchant¹
 Patricia Quidu¹
 Jose-Luis Macaralupu⁷
 Fabrice Favret⁸
 Jean-Paul Richalet^{1,2}
 Nicolas Voituron^{1,2}

¹Laboratory "Hypoxia and Lung" EA 2363, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny Cedex, Paris, ²Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, ³Laboratory MOVE EA 6314, FSS, Poitiers University, Poitiers, France; ⁴Research Unit, College of Medicine, Princess Noura University, Riyadh, Saudi Arabia; ⁵Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ⁶Unité de Biologie Intégrative des Adaptations à l'Exercice, University Paris Saclay and Genopole®, University Sorbonne-Paris-Cité, Paris, France; ⁷High Altitude Unit, Laboratories for Research and Development, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru; ⁸Laboratory "Mitochondrie, Stress Oxydant et Protection Musculaire" EA 3072, University of Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence: Nicolas Voituron
 Laboratory "Hypoxia and Lung" EA 2363,
 UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017
 Bobigny Cedex, France
 Email nicolas.voituron@univ-paris13.fr

Abstract: Despite its well-known role in red blood cell production, it is now accepted that erythropoietin (Epo) has other physiological functions. Epo and its receptors are expressed in many tissues, such as the brain and heart. The presence of Epo/Epo receptors in these organs suggests other roles than those usually assigned to this protein. Thus, the aim of this review is to describe the effects of Epo deficiency on adaptation to normoxic and hypoxic environments and to suggest a key role of Epo on main physiological adaptive functions. Our original model of Epo-deficient (Epo-TAg^h) mice allowed us to improve our knowledge of the possible role of Epo in O₂ homeostasis. The use of anemic transgenic mice revealed Epo as a crucial component of adaptation to hypoxia. Epo-TAg^h mice survive well in hypoxic conditions despite low hematocrit. Furthermore, Epo plays a key role in neural control of ventilatory acclimatization and response to hypoxia, in deformability of red blood cells, in cerebral and cardiac angiogenesis, and in neuro- and cardioprotection.

Keywords: Epo-TAg^h mice, mouse model, physiological functions, hypoxia

Introduction

Life is dependent upon transport and utilization of oxygen (O₂) for the metabolic conversion of nutrients into energy,¹ making O₂ homeostasis an essential process for survival. Indeed, an inadequate level of O₂ is detrimental for the tissues, and complex mechanisms serve to maintain in vivo the cellular O₂ concentration within a physiological range.¹ An imbalance between O₂ delivery and requirement, such as at high altitude, activates a variety of specific mechanisms at molecular, cellular, and systemic levels. High altitude is accompanied by low atmospheric O₂ pressure, which sequentially leads to insufficient O₂ uptake and reduced tissue oxygenation. Hypoxic exposure can be intermittent (obstructive sleep apnea) or continuous (high altitude, cardiorespiratory failure), leading to different strategies to address these stresses. Indeed, acute hypoxia triggers rapid and transient compensatory mechanisms, while chronic hypoxia (CHx) leads to more durable changes with gene expression modifications.¹ The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is the most important protein regulating homeostasis when O₂ is lacking.² Under hypoxia, stabilization of HIF-1 modulates the expression of hypoxia-regulated genes such as vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporters, or erythropoietin (Epo).¹⁻⁵ Epo is a hematopoietic growth factor and represents the main regulator of erythropoiesis. In low O₂ conditions, the number of erythrocytes increases to sustain O₂ delivery.⁶ This polycythemia, secondary to an increase in Epo release, is one of the key factors of acclimatization to CHx, through



the increase in O₂-carrying capacity.⁷⁻⁹ However, despite this well-known role, it was suggested that Epo plays a key role in other physiological functions. Thus, Epo is also known to be fundamental for embryonic development,¹⁰ and it is also largely involved in the normal functioning of most organs, including brain, heart, and muscles by regulating numerous cell functions such as calcium flux or cell survival.^{11,12} To assess these pleiotropic actions of Epo on organs and cells, transgenic models of mice have been developed.^{13,14}

The aim of this review is to provide a brief presentation of the physiological effects of Epo and describe the effects of Epo deficiency on adaptation to normoxic and hypoxic environments in an original model of Epo-deficient (Epo-TAg^h) mice. From these observations, we suggest a key role of Epo on multiple physiological adaptive functions, especially in response to hypoxia.

Epo and Epo-receptor expression in organs

Epo is a glycoprotein that is synthesized by peritubular fibroblasts in the kidneys of adults and in hepatocytes of fetal liver.¹⁵ Epo was originally believed to play a role that restricted to stimulation of early erythroid precursor proliferation, inhibition of apoptosis, and differentiation of the erythroid lineage. Currently, in addition to its well-known role in red blood cell production, a diverse group of cells has been identified to produce Epo and/or Epo receptor (Epo-R) including endothelial cells, smooth muscle cells, retina tissues, testis, and cells of the central nervous system.^{12,16-19} Moreover, Epo mRNA was also detected in lungs, testis, heart, and brain but not in skeletal muscles, intestine, or bone marrow of rodents.^{20,21}

Epo and the brain

Epo mRNA is constitutively expressed in the mice brain,^{22,23} and Epo-R mRNA and protein are also expressed in the brain of rodents.^{23,24} Indeed, Epo and its receptors are found in the nervous system, including in neurons, astrocytes, and endothelial cells.^{16,18,22,23,25-27} Epo/Epo-R couple is involved in neuroprotection,²⁸ promotes neural plasticity,²⁹ and could have a potentially antidepressor effect.^{30,31} Furthermore, Epo/Epo-R pathway is required for normal brain development.³² Indeed, Epo is required for neural progenitor cell proliferation,³³ and it avoids neural apoptosis by maintaining Bcl-2 and Bcl-xl expression.^{34,35} Indirectly, Epo improves sensory, cognitive, and endocrine functions of the central nervous system through its erythropoiesis-stimulating effect, because it increases the O₂ supply to the brain. The direct effects of Epo are independent of erythropoiesis.³⁶

Epo has been demonstrated to have neuroprotective effects after ischemic, hypoxic, metabolic, neurotoxic, and excitotoxic stress in the nervous system. Epo operates at several levels within the central nervous system, including limiting the production of reactive O₂ species and glutamate, neurotransmission modulation, promotion of angiogenesis, prevention of apoptosis, reduction in inflammation, and recruitment of stem cells.³⁷⁻⁴⁰ Moreover, Epo-R was localized in both brainstem respiratory centers and carotid bodies,²⁴ and it is involved in ventilatory regulations during hypoxic challenges.

Epo and the heart

As in the brain, animal models of ischemia and acute myocardial infarction have shown that Epo reduces infarct size and improves left ventricular (LV) function. These effects are mediated mostly through apoptosis inhibition by activating pro-survival pathways in the myocardium, mobilization of endothelial progenitor cells, and inhibition of migration of inflammatory cells as well as potent pro-angiogenic properties.⁴¹ Moreover, recent studies reported that the heart could be a site of Epo production⁴²⁻⁴⁴ and, in particular, that cardiac tissue reveals Epo gene and protein expression.^{20,45,46} Epo-R expression is high in cardiac progenitor cells.⁴⁷ Epo has angiogenic and antiapoptotic effects in the heart,^{48,49} and intraperitoneal injection of Epo promotes the differentiation of cardiac progenitor cells into endothelial cells.⁴⁵ Overall, Epo is known to have a cardioprotective effect through antiapoptotic, anti-inflammatory, and angiogenic effects,⁵⁰ and it could act on the oxidative stress.⁵¹ For example, Epo may enhance protein kinase B or Akt and protect the heart from ischemia-reperfusion injuries.⁵² This effect of Epo on Akt could regulate cardiomyocyte mitochondrial biogenesis,⁵³ by acting on the Akt/endothelial nitric oxide (NO)-synthase pathway.⁵⁴ Recently, it has also been shown that acute Epo injection can efficiently improve resuscitation and survival rates in a model of cardiac arrest in pigs.^{55,56}

Epo and the muscle

Epo-R has been identified in muscle biopsies suggesting a potential but undefined role of Epo on muscle metabolism or function.^{57,58} In humans, these effects were suggested by excessive intake of Epo during endurance exercise in order to improve performance.⁵⁹ In some athletes, Epo increases performance during endurance exercises more than expected on the only basis of an increase in hematocrit. This suggests a potentially direct effect of Epo on muscle metabolism,⁶⁰ even if this effect remains to be validated.

Epo could induce angiogenesis and accumulation of VEGF in skeletal muscles submitted to ischemia–reperfusion experiments⁶¹ and act as a promoter of growth factors in skeletal muscles.⁵⁷ In vitro, Epo-R mRNA and protein expression were identified in the primary muscle cells of mammals.^{57,62,63} However, the effects of administration of human recombinant Epo (rhu-Epo) and the role of Epo-R in culture media remain controversial. Some authors showed a positive effect,⁵⁷ and some others showed no effect,^{62,63} on primary myoblast proliferation. In vivo, although mRNA-encoding Epo-R and Epo-R proteins were detected in rats,⁶⁴ skeletal muscle treatment by rhu-Epo have shown controversial results. However, Epo is suspected to induce a shift in muscle fiber metabolism toward a more oxidative phenotype^{65,66} and prevent the impairment of mitochondrial structure and function.⁶⁷ Moreover, some authors observed a positive effect of rhu-Epo on myoblast apoptosis,^{64,68} proteolysis, glycolysis, and mitochondrial functions.⁶⁹ The authors suggested⁷⁰ that indirect effects of Epo treatment through the amelioration of O₂ supply could explain the observed effects of Epo on skeletal muscles during endurance exercises.

Epo underproduction and clinical disorders

In adults, insufficient Epo production results mostly from direct damage to Epo-producing cells in the kidneys or to a lesser extent from the suppression of Epo production by inflammatory cytokines.⁷¹ Indeed, in patients suffering from rheumatoid arthritis, cancer, and acquired immune deficiency syndrome (AIDS), inflammatory cytokines suppress Epo gene expression.^{71–75} In contrast, patients with renal failure generally develop anemia due to the suppression of erythropoiesis and to a moderate reduction in red cell life span.⁷¹ Furthermore, the main reason of anemia in patients with uremia is an insufficient Epo production.^{71,76,77} Diabetic nephropathy can also lead to Epo deficiency and anemia.⁷⁸ Moreover, exposure to metals such as cadmium or platinum results in a modification of the structure and function of renal proximal tube, resulting in the suppression of Epo production.⁷¹ Patients with increased plasma viscosity due to monoclonal dysproteinemias have an inappropriate Epo production.^{71,79}

Mouse model of Epo deficiency

A mouse model of Epo-TAg^h mice was used for the first time for the identification of the renal Epo-producing cells.⁸⁰ We then developed this model in 2006 in our laboratory to assess the potential roles of Epo and/or anemia in the adaptation processes to hypoxia.

The transgenic construct contains an SV40 sequence in the five untranslated region of the mouse Epo gene, which is flanked on each side by 9 and 7.5 kb of DNA from the mouse Epo locus.⁸⁰ Anemia-inducible Epo expression was observed in the kidneys.⁸⁰ Thus, these mice present a severe reduction in Epo gene expression,^{13,80} leading to low plas-matic level of Epo (122±16 pg/mL in wild type [WT] vs 53±18 pg/mL in Epo-TAg^h mice) and thus chronic anemia with low hemoglobin concentration (17.1±0.3 g in WT vs 6.9±0.3 in Epo-TAg^h mice; Table 1). However, Epo-TAg^h mice have a good survival rate in CHx (14 days, 4,500 m) through an increase in ventilation and cardiac output.^{81,82} They also develop cerebrovascular adaptations to chronic anemia and hypoxia.⁸³

Characteristics of Epo-TAg^h mice in normoxic and hypoxic conditions: effect of Epo deficiency and/or anemia

Blood characteristics

Red blood cells are responsible for the transport of >98% of the O₂ into the blood. In order to deliver O₂ to the tissues, red blood cells deform as they enter capillaries. In Epo-TAg^h mice, hematocrit and hemoglobin are ~60% lower (Table 1) than those observed in WT mice.⁸² Furthermore, Epo deficiency decreases blood viscosity and slightly reduces red blood cell deformability.⁸⁴ After CHx, hemoglobin concentration remained 60% lower in Epo-TAg^h mice as compared with that of WT mice,⁸¹ despite a proportional increase in Epo concentration as compared with WT animals.⁸⁵ Nevertheless, in Epo-TAg^h mice, Epo concentration following acute hypoxia increased to reach only the normoxic WT value⁸³ and returned to basal value after CHx.²⁰

Cardiac characteristics

Epo-TAg^h mice show right ventricular and LV hypertrophy,⁸² leading to increased stroke volume and cardiac output (Table 1). This adaptive process, already described,⁸⁶ allows to offset the fall in arterial O₂ content due to anemia. Echocardiographic data confirmed compensatory LV hypertrophy, higher myocardial chamber volumes, and a higher cardiac output,²⁰ which could be explained by an increase in pre-load without change in left ventricle afterload as depicted by unchanged blood pressure. Although cardiac output was increased in Epo-TAg^h mice, O₂ delivery remained lower than in control WT animals. Furthermore, Epo/Epo-R pathway is known to be involved in the transcription of target genes that mainly involved in the inhibition of apoptosis and cell

Table 1 Characteristics of wild-type and Epo-TAg^h male mice in normoxic conditions

	References	Wild-type mice	Epo-TAg ^h mice	
Cardiac characteristics	Hemoglobin (g·dL ⁻¹) ^b	Macarlupu et al ⁸¹	17.1±0.3	6.9±0.3 ^a
	Hematocrit (%) ^b	Macarlupu et al ⁸¹	54.2±0.8	24.0±1.6 ^a
	Heart rate (bpm) ^c	El Hasnaoui-Saadani et al ²⁰	500±27	548±46
	Stroke volume (μL·g ⁻¹) ^c	El Hasnaoui-Saadani et al ²⁰	1.9±0.19	3.2±0.68 ^a
	Cardiac output (mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹) ^c	El Hasnaoui-Saadani et al ²⁰	0.94±0.14	1.76±0.43 ^a
	Systolic blood pressure (mmHg) ^c	El Hasnaoui-Saadani et al ²⁰	96.7±8.5	94.2±5.8
	Right ventricular weight (mg) ^b	Macarlupu et al ⁸²	23±1	33±2 ^a
	Left ventricular and septum weight (mg) ^b	Macarlupu et al ⁸²	80±2	113±3 ^a
Ventilatory parameters	Fulton ratio ^b	Macarlupu et al ⁸²	0.288±0.013	0.297±0.010 ^a
	Minute ventilation (mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹) ^c	Voituron et al ⁹⁰	2.26±0.48	2.17±0.53
	Respiratory frequency (c·min ⁻¹) ^c	Voituron et al ⁹⁰	261±34	284±54
	Tidal volume (μL·g ⁻¹) ^c	Voituron et al ⁹⁰	8.63±1.26	7.62±1.09
	Resting oxygen consumption (mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) ^b	Macarlupu et al ⁸¹	93.3±4.7	96.8±6.5
	Maximal oxygen consumption (mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹) ^b	Macarlupu et al ⁸¹	270.7±22.0	210.2±12.3 ^a

Note: ^aIndicates significant difference between wild-type and Epo-TAg^h mice. ^bData presented as mean ± SEM. ^cData presented as mean ± SD.

Abbreviations: Epo, erythropoietin; Epo-TAg^h mice, Epo-deficient mice; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean.

proliferation⁸⁷ through the phosphorylation of Jak2 and STAT-5. Because of unchanged P-STAT-5/STAT-5 ratio, we could not confirm the activation of this cardioprotective pathway in response to chronic Epo deficiency.²⁰ In addition to its angiogenic function, VEGF may also activate pathways associated with NO synthesis and thus induce vasodilation, improving blood supply to cardiac cells.⁸⁸ Thus, we demonstrated that chronic Epo deficiency induces a cardiac angiogenesis probably mediated by HIF-1 α /VEGF (Figure 1) and Epo-R pathways, which could optimize O₂ supply and limit the consequences of chronic anemia on cardiac cells.

The effects of both chronic Epo deficiency and hypoxia on myocardial contractile function and cardioprotective processes were investigated using Epo-TAg^h mice.²⁰ The initiation of cardioprotective mechanisms was estimated through Epo-R/P-STAT5 signalization as well as by a change in the P-STAT5/STAT5 ratio in response to chronic Epo deficiency and/or hypoxia. When 14 days of CHx were added to Epo deficiency, the expected cardiac hypertrophy⁸⁹ was reduced and cardiac output could not catch up with the O₂ demand. Systolic blood pressure did not increase indicating that systemic afterload was not responsible for the decrease in cardiac output. Moreover, CHx did not significantly affect right ventricular hemodynamics, and Epo-TAg^h mice did not develop pulmonary hypertension. Therefore, the decrease in cardiac output was not the consequence of right ventricular failure. After CHx, Epo-TAg^h mice displayed a lower LV hypertrophy than the normoxic anemic mice, which could account for the decrease in cardiac output and O₂ delivery. Furthermore, our data showed a mild alteration of diastolic and systolic LV function. These results suggested that altered myocardial function in Epo-TAg^h mice exposed to CHx

could participate in the failure of cardiac adaptation in this severe condition.

Although hypoxia or Epo-deficiency leads to an over-expression of HIF-1 α , VEGF (Figure 1), Epo, and Epo-R, we did not observe a synergic effect of these combined constraints on the heart of Epo-TAg^h mice exposed to CHx, except for P-STAT-5/STAT-5 ratio. However, this ratio was lower in Epo-TAg^h than in WT mice exposed to CHx, suggesting that the activation of the cardioprotective pathways downstream the Epo/Epo-R system may represent a limiting step. As we found a decrease in LV hypertrophy and functional LV adaptation, a depressed HIF-1 α /VEGF pathway (Figure 1) as well as a reduced O₂ delivery, we suggested that cardiac adaptive mechanisms that take place with chronic Epo deficiency and hypoxia might require extensive Epo effects (angiogenesis, cardioprotection) on the heart.

Ventilatory and metabolic characteristics

Our first publication on the Epo-TAg^h mice model showed a greater ventilation in normoxia in these anemic mice as compared to WT animals.⁸² This difference was mainly due to a larger tidal volume. However, more recently, we have not observed a baseline ventilatory adaptation in Epo-TAg^h male mice in normoxia (Table 1, Figure 2) when compared with that of WT mice.⁹⁰ Some explanations could be proposed to explain this difference. First, in the study of Macarlupu et al, the control animals were classical WT animals and not littermates, and it is well known that the environmental conditions during the first day of life could induce significant changes in ventilatory variables.⁹¹ Second, the method used to measure ventilatory variables can induce slight differences, according to the plethysmograph used, for example. Third,

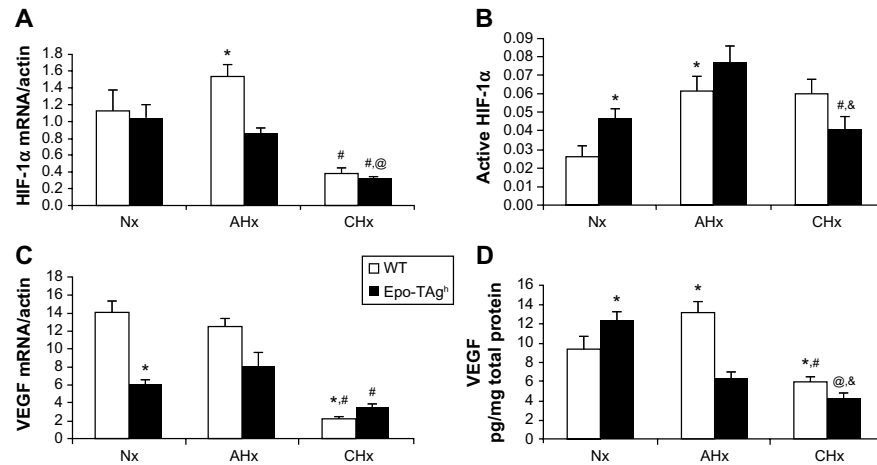


Figure 1 Cardiac angiogenesis in Epo-TAg^h mice.

Notes: HIF-1 α and VEGF mRNA (A, C) and protein (B, D) expression in the heart of WT (white bar) and Epo-TAg^h (black bar) mice in normoxia and after 48 hours (AHx) or 14 days (CHx) of hypoxic exposure. Epo deficiency led to a rise of angiogenesis through the HIF-1 α and VEGF pathway activation. Epo-TAg^h mice were not able to maintain cardiac adaptation to hypoxia during the long-term exposure. Values are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 vs Nx WT; ^a P <0.05 vs Nx Epo-TAg^h; [#] P <0.05 CHx vs AHx; [@] P <0.05 CHx Epo-TAg^h vs CHx WT. ^h P <0.05 AHx Epo-TAg^h vs AHx WT. Reprinted from *Respir Physiol Neurobiol*, Volume 186(2), El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, et al. Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia, pages 146–154. Copyright 2013 with permission from Elsevier.²⁰

Abbreviations: AHx, acute hypoxia; CHx, chronic hypoxia; Epo, erythropoietin; Epo-TAg^h mice, Epo-deficient mice; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; Nx, normoxia; SEM, standard error of the mean; VEGF, vascular endothelial growth factor; WT, wild type.

it could be possible that Epo-TAg^h mice could have exhibited some epigenetic adjustments between 2006 and 2014. Indeed, more than 30 generations of mice have lived between the first and the last experiment, and it is not impossible that

epigenetic changes would improve the whole O₂ transport steps, and thus, ventilatory adaptation could appear in the last generations of mice.⁹²

In female Epo-TAg^h mice, we observed a difference in respiratory frequency and minute ventilation with larger values for the Epo-TAg^h mice as compared with those of WT mice (unpublished data). There is no change in resting O₂ consumption ($\dot{V}O_2$) in Epo-TAg^h mice, while $\dot{V}O_2$ max is only 30% reduced (Table 1) as compared with that of WT mice,⁸² despite a 60% reduction in hemoglobin concentration. The normal resting $\dot{V}O_2$ in anemic Epo-TAg^h mice could also be explained by the elevated cardiac output associated with better tissue extraction of O₂,⁸⁶ which could compensate for the decrease in O₂ transport capacity. Severe anemia also generally induces a reduction in physical performance.^{93–95} In Epo-TAg^h mice, the reduction in $\dot{V}O_{2max}$ was only moderate, suggesting compensatory mechanisms such as an increase in maximal cardiac output, augmented capillarization, and better O₂ extraction.

The normal ventilatory response to acute hypoxia is characterized in adult mammals by a hyperventilation followed by a relative ventilatory decline named “roll off”.^{96,97} If hypoxia persists, an increase in ventilation occurs (ventilatory acclimatization to CHx),⁹⁸ which is accompanied by an increase in the sensitivity of the respiratory control system.^{99–101} Epo-TAg^h mice displayed neither ventilatory response to acute hypoxia nor ventilatory acclimatization to CHx (Figure 2).⁹⁰ However, after 14 days of exposure to chronic hypoxia, Epo-TAg^h mice increased their ventilation when exposed acutely to a hypoxic stress (Figure 2;

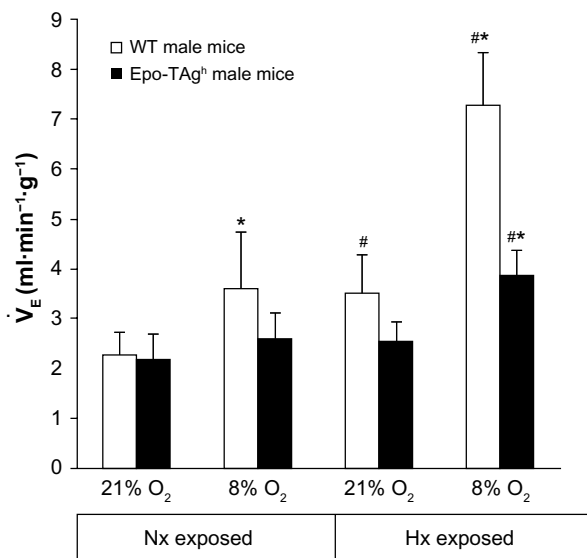


Figure 2 Ventilatory response to hypoxia in Epo-TAg^h mice.

Notes: Minute ventilation measured in normoxia (F_IO₂ 21%) or acute hypoxia (F_IO₂ 8%) in WT (white bar) and Epo-TAg^h (black bar) mice maintained in normoxic (Nx exposed) or hypoxic (14 days, Hx exposed) conditions. Epo-TAg^h mice had a normal ventilation at rest, did not display ventilatory acclimatization to hypoxia, and did not respond to acute hypoxia even after the exposure to chronic hypoxia. Values are expressed as mean \pm SD. * P <0.05 21% O₂ vs 8% O₂; [#] P <0.05 Nx exposed vs Hx exposed, same strain, same F_IO₂. Adapted from Voituron N, Jeton F, Cholley Y, et al. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep*. 2014;2(2):e00223. © 2014 Voituron N, Jeton F, Cholley Y, et al. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.⁹⁰

Abbreviations: Epo, erythropoietin; Epo-TAg^h mice, Epo-deficient mice; Hx, hypoxia; Nx, normoxia; SD, standard deviation; WT, wild type.

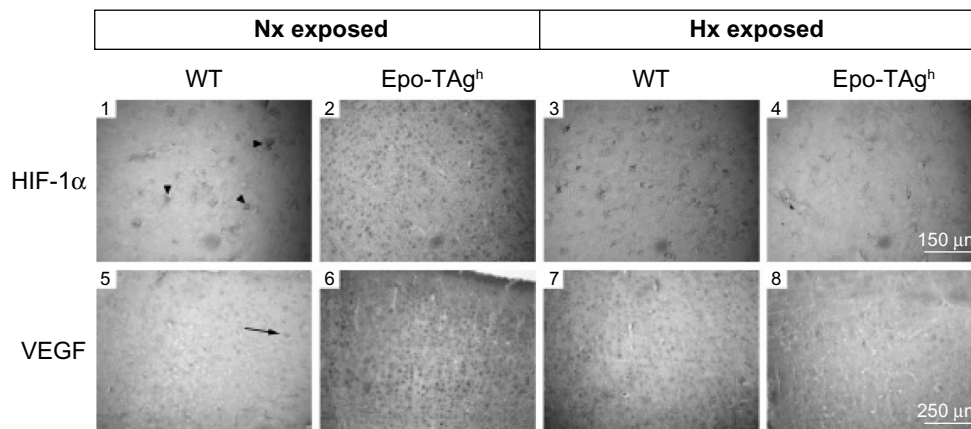


Figure 3 Cerebral angiogenesis in Epo-TAG^h mice.

Notes: Immunohistological detection of HIF-1 α and VEGF at the sensory cortex level in normoxia (Nx exposed) and after chronic hypoxia exposure (Hx exposed) in WT (1, 3, 5, 7) and Epo-TAG^h mice (2, 4, 6, 8). Arrowheads and arrow indicate HIF-1 α (1)- and VEGF (5)-positive cells, respectively. In normoxia, Epo-TAG^h mice showed an increase in HIF-1 α (2)- and VEGF (6)-positive cells suggesting an enhancement of cerebral angiogenesis through the HIF-1 α /VEGF pathway. In WT mice, chronic hypoxia led to an increase in HIF-1 α (3) and VEGF (7), while they led a decrease in Epo-TAG^h mice (4, 8). Adapted from *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Volume 296(3). El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, et al. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. Pages: R801–R811. Copyright 2009.⁸³

Abbreviations: Epo, erythropoietin; Epo-TAG^h mice, Epo-deficient mice; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; Hx, hypoxia; Nx, normoxia; VEGF, vascular endothelial growth factor; WT, wild type.

8% O₂, 5 minutes).⁹⁰ These results differ from those previously published.⁸² We cannot exclude the fact that our transgenic mice, along generations, developed adaptation strategies to cope with Epo deficiency and/or chronic anemia.

Brain adaptations

Epo deficiency in Epo-TAG^h mice leads to cerebral adaptations (Figures 3 and 4).⁸³ Indeed, in the brain of these normoxic mice, we observed an increase in the transcript and the protein levels of HIF-1 α , VEGF (Figure 3), Epo-R (Figure 4), and P-STAT-5/STAT-5 ratio accompanied with an increase in cerebral capillary density. Taken together, these data suggest that Epo-TAG^h mice have developed cerebral angiogenesis,

probably via the HIF-1 α /VEGF pathway (Figure 3), optimizing O₂ diffusion as previously described.^{83,102} Furthermore, the increase in P-STAT-5/STAT-5 ratio in the brain suggests neuroprotective mechanisms and angiogenesis with a decrease in apoptosis and an increase in cell proliferation.^{23,103} Overall, these results illustrate the direct and indirect effects of Epo in terms of O₂ delivery improvement and the activation of neuroprotective mechanism to counteract the lack of Epo in the brain.

Skeletal muscles

Our model of transgenic Epo-TAG^h mice has allowed us to study the role of Epo on skeletal muscle development, angiogenesis, and acclimatization to hypoxia. Our main

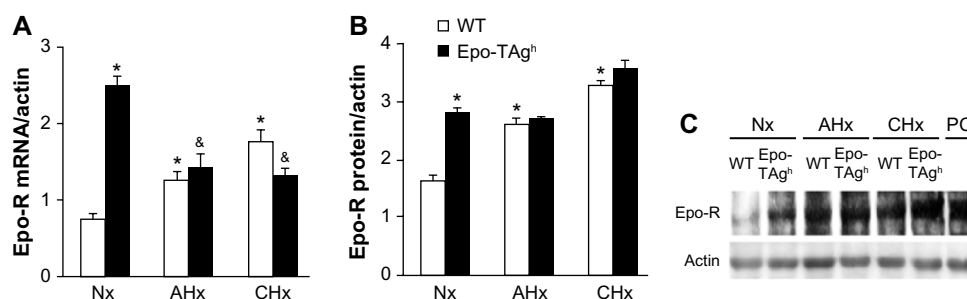


Figure 4 Effect of Epo deficiency on Epo-R expression in cerebral cortex.

Notes: Quantitative determination of Epo-R in the cerebral cortex of WT and Epo-TAG^h mice in Nx and following AHx and CHx. Epo-R mRNA (A) and protein level (B) are shown next to their corresponding protein bar graphs. Representative Western blot of Epo-receptor (Epo-R) (C). Values are expressed as mean \pm SD. * P <0.05 vs Nx WT; $^{\&}$ P <0.05 vs Nx Epo-TAG^h. Adapted from *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Volume 296(3). El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, et al. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. Pages: R801–R811. Copyright 2009.⁸³

Abbreviations: AHx, acute hypoxia; CHx, chronic hypoxia; Epo, erythropoietin; Epo-R, Epo receptor; Epo-TAG^h mice, Epo-deficient mice; Nx, normoxia; SD, standard deviation; WT, wild type; PC, peptide control.

Table 2 Main characteristics of Epo-TAG^h mice when compared with those of wild-type mice

	Blood	Heart	Ventilation	Brain	Muscle
Normoxia	Low Epo, low Hb	High CO, high angiogenesis		High angiogenesis	High microvessel network
Acute hypoxia			Low HVR		
Chronic hypoxia	Low Hb	Low cardioprotection	Low VAH		High microvessel network

Abbreviations: CO, cardiac output; Epo, erythropoietin; Epo-TAG^h mice, Epo-deficient mice; Hb, hemoglobin; HVR, hypoxic ventilatory response to hypoxia; VAH, ventilatory acclimatization to hypoxia.

results displayed a developmental adaptation to Epo deficiency and/or chronic anemia by an improvement of microvessel network (Table 2) in both fast and slow skeletal muscles.⁸⁵ This adaptation of Epo-TAG^h mice was not accompanied by any difference in skeletal muscles for contractile structure, metabolism, maximal strength, fatigability, contraction time, and relaxation time. Moreover, we never observed any overexpression of HIF-1 α or VEGF protein. The discrepancy between our results and those of Mille-Hamard et al's team⁶⁹ could be explained by a genetic developmental adaptation to chronic anemia in our transgenic model. In the Mille-Hamard et al's transgenic model, Epo deficiency is induced by vaccination of adult mice, so that developmental adaptation has not occurred. When exposed to severe chronic hypobaric hypoxia (4,300 m) during 14 days, skeletal muscles of Epo-TAG^h mice were not submitted to deconditioning. Neither skeletal muscle phenotype nor skeletal muscle functions were altered compared with those of WT mice.¹⁰⁴ In the skeletal muscles of our Epo-TAG^h model, we did not detect Epo mRNA in both normoxia and hypoxia. Moreover, the hypoxia-induced elevation of circulating Epo was not correlated with an increase in Epo concentration in skeletal muscle. Overall, these results favor the hypothesis of an indirect effect of Epo on skeletal muscles. We clearly show that, in our model, the deficit in oxygenation caused by anemia is responsible for the main change in skeletal muscles such as the improvement of microvessel network (Table 3). Unfortunately, we cannot study the regeneration process of the Epo-TAG^h model, because in this mutant, Epo has been replaced by antigen T, which has been shown to alter skeletal muscle regeneration.¹⁰⁵

Limits of our models

Experiments were performed on whole-body Epo-TAG^h mice¹³ that display a very low hematocrit (20%) and did not develop polycythemia after CHx.⁸¹ Therefore, it is important to note that our model of transgenic mice combines the effects of chronic anemia (low O₂ content) and the effects of chronic Epo deficiency. To differentiate the respective effect of each constraint is rather difficult since chronic anemia itself is a consequence of chronic Epo deficiency. However, it could be speculated from the activation of HIF/VEGF systems that the reduction in tissue O₂ delivery (and therefore chronic anemia) is the main trigger of the observed adaptations.

Conclusion

For many years, Epo was mainly considered a growth factor for erythropoiesis and a determinant factor for the acclimatization to CHx only through an increase in O₂ transport capacity. It appears from recent studies that it may also participate in the acute and chronic responses to hypoxia (Table 2) through the activation of Epo-Rs in various organs (brain, heart, muscle, chemoreceptors). However, there is still a lot of debates and uncertainties about the presence and functionalities of these receptors. Our model of Epo-TAG^h mice may help to unravel a possible key role of Epo in O₂ homeostasis. Indeed, our studies demonstrate that high levels of Epo are not necessary for survival in chronic moderate hypoxia. Moreover, we showed that Epo could play a key-regulating role in the neural control of ventilatory acclimatization to hypoxia and hypoxic ventilatory response probably via a catalyzing role on the NO central pathway. We also demonstrated that chronic Epo deficiency induced cerebral and cardiac angiogenesis, which could have synergic effects not only in neuro- and cardioprotection but

Table 3 Indices of the microvascular supply of the deep region of gastrocnemius muscle fibers in normoxia and after chronic hypoxia

	Normoxia		Chronic hypoxia	
	WT mice	Epo-TAG ^h mice	WT mice	Epo-TAG ^h mice
Capillary density (cap/mm ²)	1699±350	1587±180	1845±393	1701±211
Capillary-to-fiber ratio	2.23±0.29	2.69±0.29 ^a	2.28±0.20	2.62±0.29 ^a
Number of capillaries around single fibers	5.20±0.78	6.27±0.54 ^a	5.22±0.82	6.19±0.41 ^a
Individual capillary-to-fiber ratio	2.16±0.26	2.46±0.35 ^a	2.15±0.19	2.58±0.21 ^a

Notes: ^aIndicates significant difference between WT and Epo-TAG^h mice. Data presented as mean ± SD.

Abbreviations: Epo, erythropoietin; Epo-TAG^h mice, Epo-deficient mice; WT, wild type.

also in O₂ supply optimization, in order to limit the consequences of chronic anemia on cerebral and cardiac tissues. However, under both constraints (chronic Epo deficiency and hypoxia), angiogenesis, neuroprotective, and cardioprotective pathways along with a functional LV adaptation failed to occur, showing the limits of these adaptive processes in heart and brain, but more importantly suggesting a crucial role of Epo in main physiological functions.

Some future areas of research could focus on the role of Epo as a global regulator of the cardioventilatory adaptations from erythrocytes synthesis, blood hemorheology, blood volume regulation, and ventilatory control.¹⁰⁶ Epo seems to be able to protect tissues (cardiomyocytes, lung, neurons) from various aggressions such as hypoxia, ischemia–reperfusion, or inflammation.¹⁰⁷ Moreover, there are few data on the possible effect of Epo on the ventilatory response to hypercapnia in contrary to the response to hypoxia. The role of Epo/Epo-R on the oxidative stress needs also to be studied later as this is central on tissue antiapoptosis properties.

Acknowledgments

This work was supported by the University Paris 13, Sorbone Paris Cité, the “Bonus Qualité Recherche”, and “Institut Fédératif de Recherche Biomédicale” programs of the University Paris 13. FJ was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The Laboratory of Excellence GR-Ex (ANR-11-LABX-0051) was funded by the program “Investissement d’avenir” of the French National Research agency (ANR-11-IDEX-0005-02).

Author contributions

All authors contributed toward data analysis, drafting and critically revising the paper and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(3):336–361.
2. Gassmann M, Soliz J. Erythropoietin modulates the neural control of hypoxic ventilation. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(22):3575–3582.
3. Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res*. 2006;71(4):642–651.
4. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1061–1069.
5. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604–4613.
6. Franke K, Gassmann M, Wielockx B. Erythrocytosis: the HIF pathway in control. *Blood*. 2013;122(7):1122–1128.
7. Favret F, Richalet JP, Henderson KK, Germack R, Gonzalez NC. Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(3):R730–R738.
8. Gonzalez NC, Clancy RL, Moue Y, Richalet JP. Increasing maximal heart rate increases maximal O₂ uptake in rats acclimatized to simulated altitude. *J Appl Physiol*. 1998;84(1):164–168.
9. Robach P, Fulla Y, Westerterp KR, Richalet JP. Comparative response of EPO and soluble transferrin receptor at high altitude. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(9):1493–1498. [discussion 1492].
10. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83(1):59–67.
11. Ogunshola OO, Bogdanova AY. Epo and non-hematopoietic cells: what do we know? *Methods Mol Biol*. 2013;982:13–41.
12. Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, Ogunshola OO. Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol*. 2003;543:323–330.
13. Binley K, Askham Z, Iqbal S, et al. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood*. 2002;100(7):2406–2413.
14. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatothramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(7):857–864.
15. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med*. 2003;228(1):1–14.
16. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19488–19493.
17. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int*. 1997;51(2):416–418.
18. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(6):643–651.
19. Ammarguella F, Gogusev J, Drucke TB. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(4):687–692.
20. El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, et al. Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;186(2):146–154.
21. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*. 1992;263(3 pt 2):F474–F481.
22. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(9):3717–3720.
23. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol*. 2004;207(pt 18):3233–3242.
24. Soliz J, Joseph V, Soulage C, et al. Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J Physiol*. 2005;568(pt 2):559–571.
25. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*. 2001;101(3):271–276.
26. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*. 2000;30(3):271–278.
27. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(19):10526–10531.
28. Juul S. Neuroprotective role of erythropoietin in neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(suppl 4):105–107.
29. Almaguer-Melian W, Merceron-Martinez D, Pavon-Fuentes N, et al. Erythropoietin promotes neural plasticity and spatial memory recovery in fimbria-fornix-lesioned rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015;29(10):979–988.

30. Miskowiak KW, Vinberg M, Harmer CJ, Ehrenreich H, Kessing LV. Erythropoietin: a candidate treatment for mood symptoms and memory dysfunction in depression. *Psychopharmacology*. 2012; 219(3):687–698.
31. Osborn M, Rustom N, Clarke M, et al. Antidepressant-like effects of erythropoietin: a focus on behavioural and hippocampal processes. *PLoS One*. 2013;8(9):e72813.
32. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002;129(2):505–516.
33. Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25875–25883.
34. Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res*. 2005;57(4):481–487.
35. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nuñez G, Fernández-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*. 1996;88(5):1576–1582.
36. Jelkmann W. Effects of erythropoietin on brain function. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005;6(1):65–79.
37. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004;35(7):1732–1737.
38. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(10):891–896.
39. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci*. 2000;15:225–229.
40. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*. 2002;64(2):326–333.
41. Roubille F, Prunier F, Barrere-Lemaire S, et al. What is the role of erythropoietin in acute myocardial infarct? Bridging the gap between experimental models and clinical trials. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013; 27(4):315–331.
42. Bin-Jalilah I, Ammar HI, Mikhailidis DP, et al. Cardiac adaptive responses after hypoxia in an experimental model. *Angiology*. 2010;61(2):145–156.
43. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003;108(1):79–85.
44. Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2004;109(17):2050–2053.
45. Hoch M, Fischer P, Stapel B, et al. Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies. *Cell Stem Cell*. 2011;9(2):131–143.
46. Miro-Murillo M, Elorza A, Soro-Arnaiz I, et al. Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS One*. 2011;6(7):e22589.
47. Zafiriou MP, Noack C, Unsold B, et al. Erythropoietin responsive cardiomyogenic cells contribute to heart repair post myocardial infarction. *Stem Cells*. 2014;32(9):2480–2491.
48. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 2004;276(1):101–110.
49. Marzo F, Lavorgna A, Coluzzi G, et al. Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;26(3):183–187.
50. Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, Romagnoli M, Perez-Quilis C, Lippi G. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective. *Int J Cardiol*. 2014;171(2): 116–125.
51. Burger D, Xenocostas A, Feng QP. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol*. 2009;2(1):56–69.
52. Ong SB, Hall AR, Dongworth RK, et al. Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology. *Thromb Haemost*. 2015;113(3):513–521.
53. Carraway MS, Suliman HB, Jones WS, Chen CW, Babiker A, Piantadosi CA. Erythropoietin activates mitochondrial biogenesis and couples red cell mass to mitochondrial mass in the heart. *Circ Res*. 2010;106(11):1722–1730.
54. Qin C, Zhou S, Xiao Y, Chen L. Erythropoietin enhances mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia through Akt/eNOS signalling pathway. *Cell Biol Int*. 2014;38(3): 335–342.
55. Borovnik-Lesjak V, Whitehouse K, Baetiong A, Artin B, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. High-dose erythropoietin during cardiac resuscitation lessens postresuscitation myocardial stunning in swine. *Trans Res*. 2013;162(2):110–121.
56. Vasileiou PV, Xanthos T, Baroux D, et al. Erythropoietin administration facilitates return of spontaneous circulation and improves survival in a pig model of cardiac arrest. *Am J Emerg Med*. 2014;32(8): 871–877.
57. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39754–39761.
58. Rundqvist H, Rullman E, Sundberg CJ, et al. Activation of the erythropoietin receptor in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(3):427–434.
59. Lundby C, Olsen NV. Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. *J Physiol*. 2011;589(pt 6):1265–1271.
60. Lundby C, Hellsten Y, Jensen MB, Munch AS, Pilegaard H. Erythropoietin receptor in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2008;104(4):1154–1160.
61. Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, et al. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H274–H283.
62. Launay T, Hagstrom L, Lottin-Divoux S, et al. Blunting effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human primary and rat L6 myoblasts is not counteracted by Epo. *Cell Prolif*. 2010;43(1):1–8.
63. Lamon S, Zacharewicz E, Stephens AN, Russell AP. EPO-receptor is present in mouse C2C12 and human primary skeletal muscle cells but EPO does not influence myogenesis. *Physiol Rep*. 2014;2(3):e00256.
64. Rotter R, Menshykova M, Winkler T, et al. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res*. 2008;26(12):1618–1626.
65. Cayla JL, Maire P, Duvallet A, Wahrmann JP. Erythropoietin induces a shift of muscle phenotype from fast glycolytic to slow oxidative. *Int J Sports Med*. 2008;29(6):460–465.
66. Hojman P, Brolin C, Gissel H, et al. Erythropoietin over-expression protects against diet-induced obesity in mice through increased fat oxidation in muscles. *PLoS One*. 2009;4(6):e5894.
67. Nouette-Gaulain K, Bellance N, Prevost B, et al. Erythropoietin protects against local anesthetic myotoxicity during continuous regional analgesia. *Anesthesiology*. 2009;110(3):648–659.
68. Jia Y, Warin R, Yu X, Epstein R, Noguchi CT. Erythropoietin signaling promotes transplanted progenitor cell survival. *FASEB J*. 2009;23(9):3089–3099.
69. Mille-Hamard L, Billat VL, Henry E, et al. Skeletal muscle alterations and exercise performance decrease in erythropoietin-deficient mice: a comparative study. *BMC Med Genomics*. 2012;5:29.
70. Lamon S, Russell AP. The role and regulation of erythropoietin (EPO) and its receptor in skeletal muscle: how much do we really know? *Front Physiol*. 2013;4:176.
71. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3): a011619.
72. Means RT Jr. Clinical application of recombinant erythropoietin in the anemia of chronic disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1994;8(5):933–944.

73. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med*. 1990;322(24):1689–1692.
74. Spivak JL. Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. *Blood*. 1994;84(4):997–1004.
75. Fischl M, Galpin JE, Levine JD, et al. Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1488–1493.
76. Caro J, Brown S, Miller O, Murray T, Erslev AJ. Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med*. 1979;93(3):449–458.
77. Cotes PM. Physiological studies of erythropoietin in plasma. In: Jelkmann W, Gross AJ, editors. *Erythropoietin*. Berlin: Springer; 1989:57–79.
78. Bosman DR, Winkler AS, Marsden JT, Macdougall IC, Watkins PJ. Anemia with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2001;24(3):495–499.
79. Singh A, Eckardt KU, Zimmermann A, et al. Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. *J Clin Invest*. 1993;91(1):251–256.
80. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*. 1993;44(5):1149–1162.
81. Macarlupu JL, Buvry A, Morel OE, León-Velarde F, Richalet JP, Favret F. Time course of ventilatory acclimatization to hypoxia in a model of anemic transgenic mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006;153(1):14–22.
82. Macarlupu JL, Buvry A, Morel OE, León-Velarde F, Richalet JP, Favret F. Characterisation of the ventilatory response to hypoxia in a model of transgenic anemic mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006;150(1):19–26.
83. El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, et al. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(3):R801–R811.
84. Pichon A, Lamarre Y, Voituron N, et al. Red blood cell deformability is very slightly decreased in erythropoietin deficient mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;56(1):41–46.
85. Hagstrom L, Agbulut O, El-Hasnaoui-Saadani R, et al. Epo is relevant neither for microvascular formation nor for the new formation and maintenance of mice skeletal muscle fibres in both normoxia and hypoxia. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:137817.
86. Deem S, Hedges RG, McKinney S, Polissar NL, Alberts MK, Swenson ER. Mechanisms of improvement in pulmonary gas exchange during isovolemic hemodilution. *J Appl Physiol*. 1999;87(1):132–141.
87. Lopez TV, Lappin TR, Maxwell P, et al. Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;129(11):2566–2576.
88. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125(pt 11):2549–2557.
89. Favret F, Henderson KK, Clancy RL, Richalet JP, Gonzalez NC. Exercise training alters the effect of chronic hypoxia on myocardial adrenergic and muscarinic receptor number. *J Appl Physiol*. 2001;91(3):1283–1288.
90. Voituron N, Jeton F, Cholley Y, et al. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep*. 2014;2(2):e00223.
91. D'Amato FR, Zanettini C, Lampis V, et al. Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO₂ sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS One*. 2011;6(4):e18637.
92. Ivy CM, Scott GR. Control of breathing and the circulation in high-altitude mammals and birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2015;186:66–74.
93. Gregg SG, Willis WT, Brooks GA. Interactive effects of anemia and muscle oxidative capacity on exercise endurance. *J Appl Physiol*. 1989;67(2):765–770.
94. Hogan MC, Bebout DE, Wagner PD. Effect of hemoglobin concentration on maximal O₂ uptake in canine gastrocnemius muscle in situ. *J Appl Physiol*. 1991;70(3):1105–1112.
95. Koskolou MD, Roach RC, Calbet JA, Rådegran G, Saltin B. Cardiovascular responses to dynamic exercise with acute anemia in humans. *Am J Physiol*. 1997;273(4 pt 2):H1787–H1793.
96. Teppema LJ, Dahan A. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev*. 2010;90(2):675–754.
97. Maxova H, Vizek M. Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiol Res*. 2001;50(1):91–96.
98. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol*. 1998;112(2):123–134.
99. Olson EB Jr, Dempsey JA. Rat as a model for humanlike ventilatory adaptation to chronic hypoxia. *J Appl Physiol*. 1978;44(5):763–769.
100. Bisgard GE, Neubauer LA. Peripheral and central effects of hypoxia. In: Dempsey JA, Pack AI, editors. *Regulation of Breathing*. New York, NY: Dekker; 1995:617–618.
101. Powell FL, Huey KA, Dwinell MR. Central nervous system mechanisms of ventilatory acclimatization to hypoxia. *Respir Physiol*. 2000;121(2–3):223–236.
102. LaManna JC, Chavez JC, Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol*. 2004;207(pt 18):3163–3169.
103. Liu J, Narasimhan P, Yu F, Chan PH. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke*. 2005;36(6):1264–1269.
104. Hagstrom L, Canon F, Agbulut O, et al. Skeletal muscle intrinsic functional properties are preserved in a model of erythropoietin deficient mice exposed to hypoxia. *Pflugers Arch*. 2010;459(5):713–723.
105. Mouly V, Edom F, Decary S, Vicart P, Barbert JP, Butler-Browne GS. SV40 large T antigen interferes with adult myosin heavy chain expression, but not with differentiation of human satellite cells. *Exp Cell Res*. 1996;225(2):268–276.
106. Rosario R, Epstein M. Relationship between erythropoietin administration and alterations of renin-angiotensin-aldosterone. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006;7(3):135–138.
107. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, et al. Erythropoietin reduces acute lung injury and multiple organ failure/dysfunction associated to a scald-burn inflammatory injury in the rat. *Inflammation*. 2015;38(1):312–326.

Annexe 2

Video Article

The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses *In Vivo* and *Ex Vivo*

Anne-Sophie Perrin-Terrin^{1,2}, Florine Jeton^{1,3}, Aurelien Pichon^{1,3,4}, Alain Frugière², Jean-Paul Richalet^{1,3}, Laurence Bodineau², Nicolas Voituron^{1,3}

¹Sorbonne Paris Cité, Laboratory "Hypoxia & Lung" EA2363, University Paris 13

²UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, Sorbonne Universités

³Laboratory of Excellence GR-Ex

⁴Laboratory MOVE (EA 6314), University of Poitiers

Correspondence to: Nicolas Voituron at nicolas.voituron@univ-paris13.fr

URL: <http://www.jove.com/video/53613>

DOI: [doi:10.3791/53613](https://doi.org/10.3791/53613)

Keywords: Central Nervous System, c-FOS protein, immediate early gene, Immunohistochemistry, Neuronal marker, Transcription Factor

Date Published: 2/29/2016

Citation: Perrin-Terrin, A.S., Jeton, F., Pichon, A., Frugière, A., Richalet, J.P., Bodineau, L., Voituron, N. The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses *In Vivo* and *Ex Vivo*. *J. Vis. Exp.* (), e53613, doi:10.3791/53613 (2016).

Abstract

Many studies seek to identify and map the brain regions involved in specific physiological regulations. The proto-oncogene *c-fos*, an immediate early gene, is expressed in neurons in response to various stimuli. The protein product can be readily detected with immunohistochemical techniques leading to the use of c-FOS detection to map groups of neurons that display changes in their activity. In this article, we focused on the identification of brainstem neuronal populations involved in the ventilatory adaptation to hypoxia or hypercapnia. Two approaches were described to identify neuronal populations involved *in vivo* in animals and *ex vivo* in deafferented brainstem preparations. *In vivo*, animals were exposed to hypercapnic or hypoxic gas mixtures. *Ex vivo*, deafferented preparations were superfused with hypoxic or hypercapnic artificial cerebrospinal fluid. In both cases, either control *in vivo* animals or *ex vivo* preparations were maintained under normoxic and normocapnic conditions. The comparison of these two approaches allows the determination of the origin of the neuronal activation *i.e.* peripheral and/or central. *In vivo* and *ex vivo*, brainstems were collected, fixed and sliced into sections. Once sections were prepared, immunohistochemical detection of the c-FOS protein was made in order to identify the brainstem groups of cells activated by hypoxic or hypercapnic stimulations. Labelled cells were counted in brainstem respiratory structures. In comparison to control condition, hypoxia or hypercapnia increased the number of c-FOS labelled cells in several specific brainstem sites that are thus constitutive of the neuronal pathways involved in the adaptation of the central respiratory drive.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/53613/>

Introduction

The *c-fos* gene was identified for the first time at the beginning of 1980^{1,2} and its product was characterized in 1984 as a nuclear protein having gene-activator properties^{3,4}. It participates in long-term mechanisms associated with neuron stimulation. Indeed, changes of neuronal activity lead to second messenger signaling cascades that induce the expression of the immediate early gene *c-fos*, which induces the production of transcription factor c-FOS. The latter initiates the expression of late gene and thus participates to adaptive responses of the nervous system to many different types of stimuli⁴. Thus, since the end of 1980^{5,6}, c-FOS protein detection has been frequently used to study the effects of exogenous factors on gene transcription in general⁴ and on the activity of the central nervous system (CNS) for mapping out neuronal pathways involved under different physiological conditions.

The basal *c-fos* expression has been studied in various species including mice, rat, cat, monkey and human⁴. Thereby, the kinetics of its expression is relatively well known. The transcription activation is rapid (5 to 20 min)^{7,8}, the mRNA accumulation reaches a maximum between 30 and 45 min after the onset of stimulation⁹ and declines with a short half-life of 12 minutes. The c-FOS protein synthesis follows the mRNA accumulation and could be detected by immunohistochemistry in 20 to 90 minutes post stimulation⁶.

Analysis of *c-fos* expression is classically used in *in vivo* studies to identify the central respiratory network involved in the ventilatory responses to hypoxia or hypercapnia¹⁰⁻¹⁴. More recently, this tool was also used on *ex vivo* brainstem preparation to explore central respiratory network adaptations to hypoxia or hypercapnia¹⁵⁻¹⁸. Indeed, these preparations generate a rhythmic activity classically assimilated to the central respiratory drive⁹. Thus, this type of preparation has the advantage of being completely deafferented and therefore results regarding *c-fos* expression only reflect the consequences of a central stimulation without any intervention of peripheral structures.

The c-FOS detection could be made by immunohistochemical or immunohistochemistry approaches. Indirect immunodetection necessitates the use of a primary antibody against c-FOS and a secondary antibody directed against the species in which the primary antibody was produced.

For the immunohistochemical method, the secondary antibody is conjugated with an enzyme (peroxidase for example) that acts on a substrate (H_2O_2 for the peroxidase). The product of the enzymatic reaction is developed by a chromogen (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride), which stains it and can be observed under light microscopy. The reaction could be reinforced using nickel ammonium sulphate. These methods allow the detection of active neurons during different physiological challenges and therefore the identification and/or the mapping of peripheral and central pathways involved in the consecutive physiological responses.

Protocol

Note: The c-FOS detection is a standardized procedure involving several steps (Figure 1). All experiments were performed on rats or mice. Experimental protocols were approved by the Ethics Committee in Animal Experiment Charles Darwin (Ce5/2011/05), done in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and conducted in accordance with French laws for animal care.

1. Preparation of solutions

1. Prepare 0.2 M Sodium phosphate buffer: Add 6.24 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ and 22.56 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ to 1 L distilled water while stirring.
2. Prepare 4% Paraformaldehyde (PFA): add 20 g of PFA to 150 mL distilled water. Heat the solution to 80 °C while stirring. To clear the solution, reduce heat and add 1 or 2 drops of 1 N NaOH to help paraformaldehyde dissolving. Complete to 250 mL with distilled water and add 250 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4). Store at 4 °C. Take appropriate care when using these reagents. Handle with gloves, lab coats and safety goggles under chemical hood.
Note: Prepare 4% PFA on the day before the perfusions and the volume of 4% PFA must be determined in function of age, number and species of animals.
3. Prepare cryoprotective solution: In 250 mL of 0.2 M phosphate-buffered saline, mix 5 g of Polyvinyl-pyrrolidone, 150 g of sucrose and 2.5 g of sodium chloride. After complete dissolution, add 150 mL of ethylene glycol and adjust to 500 mL with distilled water. Store the cryoprotective solution at 4 °C.
4. Prepare 0.1 M Phosphate-Buffered Saline (PBS): Add 18 g of NaCl to 1 L distilled water while stirring. After complete dissolution, add 1 L 0.2 M of sodium phosphate buffer.
5. Prepare Phosphate Buffered Saline supplemented with 0.3% Triton X100 (PBST): Add 3 mL of Triton X100 to 997 mL of PBS.
6. Prepare 0.05 M Tris-Buffer (pH 7.6): Add 3.03 g of Tris-Hydrochloride and 0.70 g Tris-base to 500 mL distilled water while stirring.
7. Prepare 2% goat serum in PBST: For one plate, prepare 30 mL of solution. Add 600 μ L of goat serum to 30 mL PBST and mix well. Add 2.5 mL per well.
Note: Serum used must come from species used for secondary antibody production
8. Prepare rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein (1:4000, sc-52) in PBST with bovine serum albumin (0.25%). For one plate, prepare 30 mL of solution. Add 75 mg of bovine serum albumin to 30 mL PBST and mix well. Then, add 7.5 μ L of rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein.
9. Prepare biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:500) in PBST with serum albumin bovine (0.25%). For one plate, prepare 30 mL of solution. Add 75 mg of bovine serum albumin to 30 mL PBST and mix well. Then, add 60 μ L of biotinylated goat anti-rabbit antibody.
10. Prepare avidin-biotin-peroxidase complex (1:250) in PBST (ABC solution). For one plate, prepare 30 mL of solution. Add 120 μ L of reagent A and 120 μ L of reagent B to 30 mL PBST and mix well.
Note: ABC solution must be prepared at least 30 minutes before use.
11. Prepare substrate solution: Immediately before use, prepare the solution as follows (for one plate): add 20 mg of nickel ammonium sulfate, and 10 mg of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride to 50 mL Tris-Buffer. Filter and protect from light. Add 2.0 mL per well. In the remaining solution (25 mL) add 17 μ L of H_2O_2 (H_2O_2 solution 30% in H_2O). Add 2.0 mL per well.
Note: Appropriate care should be taken when using these reagents. Handle with gloves and lab coats.

2. c-fos induction and tissue achievement *in vivo*

Note: Experiments were performed in rats (Sprague Dawley) or mice (C57BL/6).

1. Place the animals in an airtight box ventilated with a hypoxic (O_2 8% balanced N_2) or hypercapnic (CO_2 4%, O_2 21% balanced N_2) gas mixture for 2 hours (Figure 2A).
2. Anaesthetize the animal with intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg). Perfuse the animal transcidentally with 4% PFA²⁰. Handle with care and gloves under chemical hood.
3. After perfusion, dissect the brain²⁰, immerse it 48 h at 4 °C in 7 mL of 4% PFA in a 15 mL tube, then remove the brain from PFA and immerse it completely in the cryoprotective solution. Store at -18 °C (Figure 3). Evacuate the rest of the animal's body by the appropriate waste-processing pathway.
Note: The cryoprotection is a step between PFA fixation and freezing. It must reduce the formation of ice crystals in cells with a solution whose freezing will be in amorphous form. The fixed samples must be impregnated in the cryoprotective solution (prepared in step 1.3) for at least 24 hours at 4 °C. Handle with care and gloves under chemical hood.

3. c-fos induction and tissues achievement *ex vivo*

Note: Experiments were performed in newborn rats or mice only.

1. Isolate the CNS as described by Suzue¹⁹ and place it in a recording chamber and superfuse it continuously at a rate of 7.5 mL/min at 26 °C with artificial cerebro-spinal fluid²¹ (aCSF: in mM: 130.0 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 26.0 $NaHCO_3$, 30.0 D-glucose; saturated with O_2 and adjusted to pH 7.4 by gassing with 95% O_2 and 5% CO_2) (Figure 2B).

2. Replace the aCSF by a deoxygenated aCSF (same composition bubbled with 95% N₂ and 5% CO₂, pH 7.4) for hypoxia or by an acidified aCSF (standard aCSF with NaHCO₃ reduced to 10.0 mM, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂) for hypercapnia. Apply the stimulation for 30 min (Figure 2B).
3. *Ex vivo*, after the induction period, transfer the CNS of newborn mice or rat in 2.5 mL of 4% PFA in a 2.5 mL tube during 48 hours and store it at -18 °C in a cryoprotective solution for later use (Figure 3).
Note: *Ex vivo*, it is not necessary to perfuse animals. Previous study suggests that small specimens measuring less than 10 mm in diameter could be fixed by simple diffusion²². A quoted rate of penetration (distance in millimeters for the fixative diffusion into the tissue) for aldehyde is 2 or 3 mm/hour.

4. Brainstem sectioning

Note: From this step to the end, the protocol is strictly the same for *in vivo* and *ex vivo* inductions.

1. Before slicing, place one individual well insert in a 12-well plate and add 2.5 mL of PBS in each well.
2. Make serial coronal sections (40 μm) of the brainstem with a cryostat and collect them in the 12-well plate. For the entire adult brainstem, make about 70 slices (Figure 3).
Note: It is possible to treat several animals in parallel in one plate.

5. Immunohistological procedures (Table 1)

Note: Throughout the proceedings, the sections remain in the well insert.

1. **Day 1 - Endogenous peroxidase activity destruction, non specific binding site blockade and incubation with the primary antibody (Figure 4)**
 1. Wash the sections for 10 minutes with 0.1 M PBS at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 3 times.
 2. Suppress the endogenous peroxidase activity by incubating the coronal sections for 30 minutes at room temperature with hydrogen peroxide H₂O₂, 3% in 0.1 M PBS (2.5 mL per well).
 3. Wash the sections for 10 minutes with 0.1 M PBS at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 3 times.
 4. Block the non specific binding site by incubating the coronal sections for 1 h at room temperature with goat serum (2%) in PBST.
 5. Incubate the coronal sections for 48 h at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein (1:4000, sc-52,) in PBST with bovine serum albumin (0.25%) (2.5 mL per well).
2. **Day 3 - Incubation with secondary antibody and development of a color reaction (Figure 4)**
 1. Wash the sections for 10 minutes with PBS 0.1 M at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 3 times.
 2. Incubate the coronal sections for 1 h at room temperature with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:500) in PBST with serum albumin bovine (0.25%) (2.5 mL per well).
Note: The investigator has the possibility to use a secondary antibody coupled to a fluorescent probe at this stage. In this case, stop the protocol at this stage and examine directly using a fluorescence microscope.
 3. Wash the sections for 10 minutes with PBST at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 3 times.
 4. Incubate the coronal sections for 1 h with an avidin-biotin-peroxidase complex (1:250) in PBST (2.5 mL per well).
 5. Wash the sections for 10 minutes with PBST at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 2 times.
 6. Wash the sections for 10 minutes with 0.05 M Tris-Buffer at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 2 times.
 7. Incubate the coronal sections with 0.02% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.04% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris-buffer (pH 7.6) at room temperature (2.0 mL per well). In the remaining solution (25 mL) add 17 μL H₂O₂ (H₂O₂ solution 30% in H₂O) (2.0 mL per well).
Note: The investigator should determine development times under light microscope. However 5 to 10 minutes provides good staining intensity.
 8. When staining intensity is optimal (controlled under light microscope, see Figure 5 and Figure 6), stop the reaction by washing the sections for 10 minutes with 0.1 M PBS at room temperature (2.5 mL per well). Repeat 4 times. Then, wash the sections with distilled water.
3. **Sampling mounting (handle with care and gloves under chemical hood).**
 1. Mount sections serially on slides and air-dry. For this, carefully spread the sections in rostro-caudal order with brushes on the slides. Clearly label the slides according to the samples.
 2. Dehydrate with absolute alcohol: immerse the slides for 30 seconds at room temperature in absolute alcohol bath. Repeat twice.
 3. Clear with xylene: immerse the slides in xylene bath for 3 minutes at room temperature. Repeat twice.
 4. Coverslip the slides with mounting medium. For this, apply 5 drops of mounting medium on the slide and then apply the cover glass by driving out the air bubbles. Air-dry for 48 h.

6. Data and statistical analysis

1. Examine sections under a light microscope. Visually count FLI neurons at high magnification (x200) using standard landmarks^{23,24}. The c-Fos punctiform staining is localized in nuclei of neuron.
2. For each analyzed area, count the number of c-FOS-positive cells per section and compare the mean number between control and stimulated conditions. Depending on normality of the data, use unpaired student *t* test or test of Mann-Whitney. Differences were considered significant if P<0.05. Plot distribution of FLI neurons onto drawing (magnification x100) using drawing tube attached to the microscope and photographed with digital camera (Figure 5).

Representative Results

The c-FOS detection is a useful tool that allows identifying groups of activated cells under specific conditions such as hypoxia and hypercapnia *in vivo* (Figure 2A) or situation that mimics these conditions *ex vivo* (Figure 2B). *In vivo*, newborn, young or adult rodents were placed in an airtight box in which the gaseous environment is continually renewed by a gas mixture with a composition precisely defined for 30 to 180 min^{13,25,26} (Figure 2A). As the stimulation acts on the whole body, the related c-FOS changed could reflect both central and peripheral activated pathways. *Ex vivo*, deafferented preparations containing the medulla oblongata and spinal cord were placed in a chamber continuously superfused with an aCSF with different content of O₂ or pH in order to model hypoxic or hypercapnic conditions (Figure 2B) for 30 min^{16-18,27}. As the stimulation acts only in these deafferented preparations, it is possible to conclude that only central mechanisms were involved in the activation of cells in the c-FOS identified structures.

The CNS was fixed with PFA, either by a perfusion via the systemic circulation *in vivo*, or by an immersion *ex vivo* (Figure 3). Due to this difference, the fixative diffusion is longer *ex vivo* than *in vivo*. Thus, the c-FOS signal might be affected, particularly in deep structures. However, because the c-FOS analysis is always performed in a comparative approach between control and stimulated *in vivo* animals or *ex vivo* preparations, this difference would not interfere with the results providing from a strict comparison of control and stimulated data. After that, the CNS was cryoprotected, sectioned and engaged in the immunohistochemical procedure (Figure 3, Figure 4). By this way, some respiratory brainstem areas have been identified *in vivo* as modifying their activity under hypoxic or hypercapnic challenges the retrotrapezoid nucleus (RTN), which is the main central site of CO₂ chemoreception^{10,13,28,29}, the ventrolateral medulla (VLM) which contain the inspiratory rhythm generator¹³, the commissural and median parts of the nucleus *tractus solitarius* (c/mNTS) which are the projection area of the carotid bodies input^{13,25,26,30} (Figure 5) and the medullary *raphe* nuclei^{12,13}.

Ex vivo, in deafferented conditions, neurons of the RTN and the VLM has been described to change their c-FOS immunoreactivity under O₂ reduced situations¹⁶⁻¹⁸. The c-FOS detection may also be combined with other immunohistochemical detections to characterize the phenotype of activated cells^{14,31}.

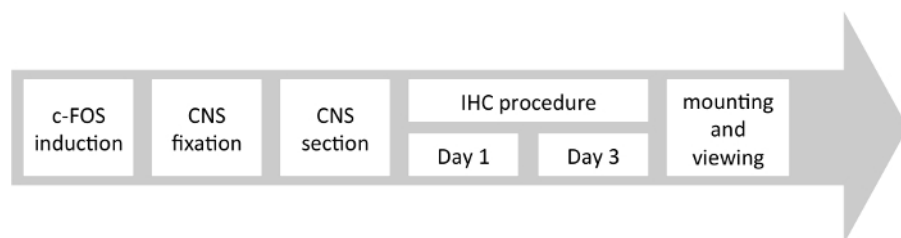


Figure 1. Study design for the use of c-FOS detection to map the neuronal structures involved in the respiratory adaptations to hypoxia or hypercapnia

Chronological steps of c-FOS technical in the CNS. CNS: Central Nervous System; IHC: Immunohistochemistry. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

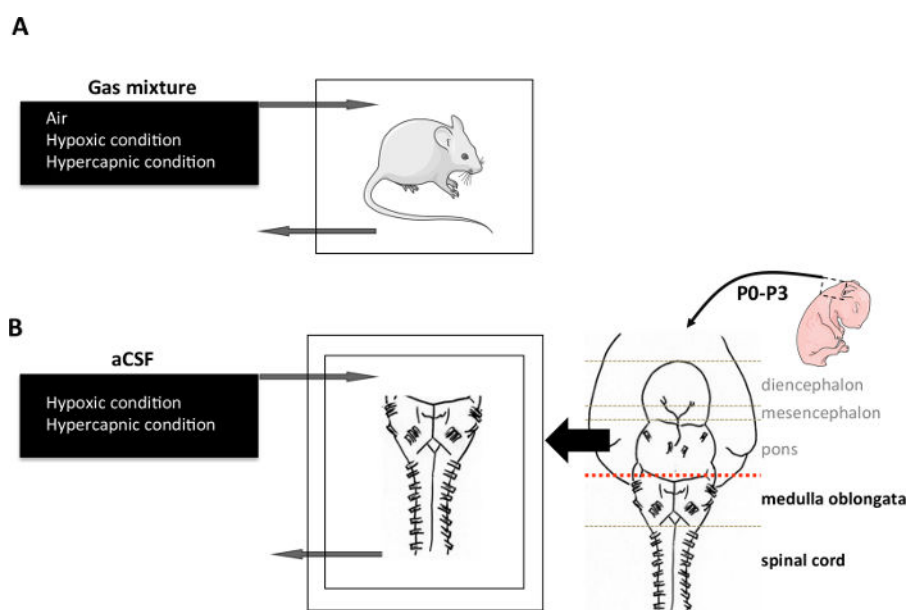


Figure 2. C-FOS induction

A. *In vivo* induction protocol. Whole animal was placed in a hermetic chamber and exposed to either air (21% O₂; 79% N₂), hypercapnic (21% O₂; 4% CO₂; 75% N₂) or hypoxic (10% O₂; 90% N₂) gas mixture for 2 hours.

B. *Ex vivo* induction protocol. CNS was dissected out from newborn rodent aged from 0 to 4 days. Medulla oblongata and spinal cord were isolated under magnification to obtain the preparations. They were placed in a chamber with the ventral surface facing upward, superfused with aCSF (pH 7.4) at 26 ± 1 °C. Modeling hypoxic stimulation *in vivo* was performed by reducing the fraction of O₂ in the aCSF by bubbling an anoxic gas mixture containing 95% N₂ and 5% CO₂. Modeling hypercapnic stimulation *in vivo* was performed using an acid aCSF that differed from normal aCSF in terms of NaHCO₃ concentration (decrease). The acid aCSF is saturated with O₂ and adjusted to pH 7.23 by bubbling with 95% O₂ and 5% CO₂. A 30 min period was applied for each stimulation.

aCSF: artificial cerebrospinal fluid. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

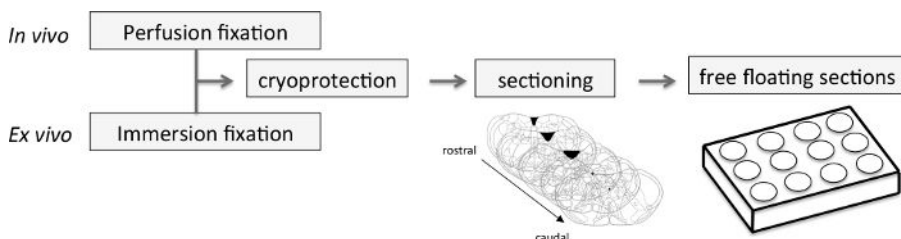


Figure 3. Central Nervous System sampling

In vivo, the CNS was obtained by dissection after fixative procedure using 4% paraformaldehyde perfused via the vascular system.

Ex vivo, the CNS was directly immersed in 4% paraformaldehyde after dissection. Subsequently, the CNS was cryoprotected by immersion in a cryoprotective solution and sliced into 40 μm thick coronal sections using a cryostat. The rostro-caudal sections of medulla were placed in a 12-wells plate containing PBS before immunohistochemical procedures.

CNS: Central Nervous System; PBS: Phosphate-Buffered Saline. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

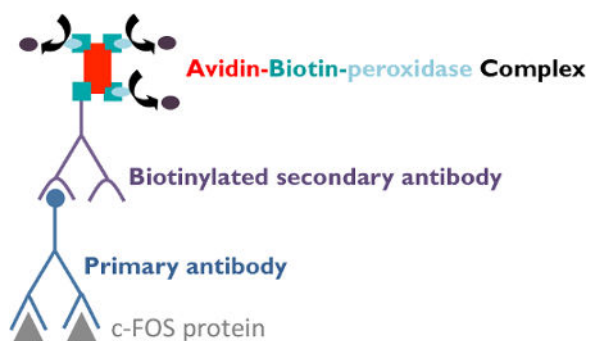


Figure 4. Indirect immunohistochemical procedures

The sections were first incubated with a rabbit polyclonal primary antibody against the c-FOS protein. After, they were treated with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody against the primary antibody. Following this incubation, sections were treated with an Avidin-Biotin-peroxidase complex, which binds tightly to the secondary antibody to amplify the signal. Indeed, the complex contains several peroxidase molecules leading to a high staining intensity. Finally, sections were stained using a solution of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and nickel ammonium sulfate which produces a dark gray precipitate in the presence of the peroxidase enzyme. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

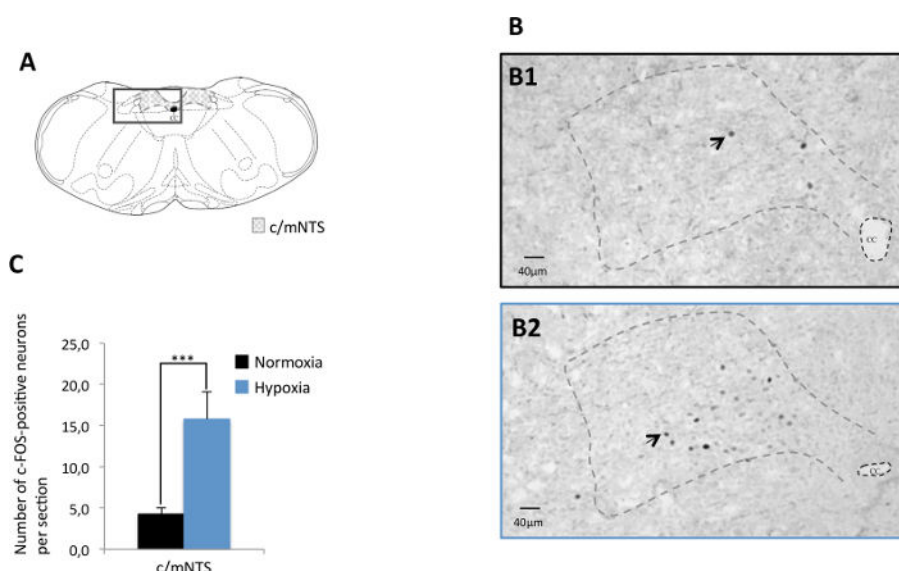


Figure 5. c-FOS-positive neurons on sections of the medulla oblongata in control mice and mice submitted to hypoxia *in vivo*

A. Drawing of a section of the *medulla oblongata* adapted from Paxinos and Franklin²⁴ (Bregma -7, 48 mm). The dotted area delimitates the commissural and median parts of the nucleus *tractus solitarius* c/mNTS. The box illustrates the structures illustrated by photomicrographs (B1 and B2).

B. Photomicrographs performed (x100) at the c/mNTS level in normoxia (B1. control, black frame) or under hypoxia (B2. blue frame). The black arrows show c-FOS-positive cells.

C. Histogram showing the mean number of c-FOS-positive cells per section at c/mNTS level in normoxia (black bar) or under hypoxia (blue bar). Values are expressed as mean \pm SD. * indicates a significant difference between normoxia and hypoxia values - Student's unpaired *t* test; ****p* < 0.001.

CC: central canal of spinal cord; c/mNTS: commissural and median parts of the nucleus *tractus solitarius*. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Time	Step	Media	Duration	T°C
Day 1	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	room temperature
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Endogenous peroxidase activity destruction	H ₂ O ₂ 3% in PBS 0.1M	30 minutes	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Non specific binding sites blockade	PBST + serum 2%	60 minutes	
	Incubation with primary antibody	Ab-I in PBST + BSA 0,25%	48 hours	4°C
Day 3	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	room temperature
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	
	Incubation with secondary antibody	Ab-II in PBST + BSA 0,25%	60 minutes	
	Avidin-biotin-peroxidase complex preparation	Avidine 1/250 Biotine 1/250 in PBST	prepare at least 30 minutes before use	
	Rinse	PBST	10 minutes	
	Rinse	PBST	10 minutes	
	Rinse	PBST	10 minutes	
	Incubation with avidin-biotin-peroxidase complex		60 minutes	
	Rinse	PBST	10 minutes	
	Rinse	PBST	10 minutes	
	Rinse	Tris-buffer	10 minutes	
	Rinse	Tris-buffer	10 minutes	
revelation	DAB 0.02% - Ni 0.04% - H202 0.01% in Tris-Buffer	5 - 15 minutes		
Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
	Storage in freezedge	PBS 0.1M		4°C

Ab-I, primary antibody; Ab-II, secondary antibody; BSA, Bovine Serum Albumine; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Ni, nickel ammonium sulphate; PBS 0.1M, 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4); PBST, 0.1 M Phosphate-buffered saline supplemented with 0.3% Triton X-100; Serum, serum from species used for secondary antibody production

Table 1: Immunohistological procedure

Chronological steps of the c-FOS procedure. Ab-I primary antibody; Ab-II, secondary antibody; BSA, Bovine Serum Albumine; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Ni, nickel ammonium sulphate; PBS 0.1 M, 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4); PBST, 0.1 M Phosphate-buffered saline supplemented with 0.3% Triton X-100; Serum, serum from species used for secondary antibody production. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

C-fos is an immediate early gene, and the detection of its product, the c-FOS protein, is classically used to identify neuronal populations involved in specific respiratory responses *in vivo*^{11,13,25,28} and *ex vivo*^{16-18,27,32,33}.

Critical steps within the protocol

Be careful during the perfusion step. The PFA 4% solution must be well prepared and the fixation and post-fixation steps must be long enough to obtain optimal slicing and staining. Furthermore, the revelation is the most important step of the procedure; the intensity of the staining should be controlled to avoid background noise.

Advantages of the technique and significance with respect to existing methods

Although some neurons do not seem to express the *c-fos* gene⁵, this method has been proved to be useful to determine neural pathways activated, for example in respiratory rhythm adaptation during chemical challenges. Compared to other immediate early genes, *c-fos* has a low expression in the absence of stimulation, allowing easier quantification of neuronal activity under a test situation⁶.

The c-FOS detection is a cellular technique that indicates global changes in activity in order to analyze neuronal populations involved in response to several stimuli. Compared with neuronal activity analysis using electrophysiological approach, that most of the time concerns only a small number of cells in a defined brain area, c-FOS detection permits to appreciate changes of activity in a large number of cells and therefore to define active areas in the whole CNS. C-FOS detection is easily compatible with unstrained and awake animals, which is not the case during neuronal activity recording by electrophysiology. This is an advantage because it avoids stress and anesthetics interferences with the obtained results.

Ex vivo, we used a 30-minute period of stimulation. It was previously shown that this stimulation is sufficient to induce changes in *c-fos* expression at the neuronal level³⁴⁻³⁶. Five minutes of stimulation are sufficient to induce changes in *c-fos* expression, which are observed after a latent period of 15 to 20 minutes³⁷. The related increases in *c-fos* expression are related to changes in activity taking place during the 10 first minutes of stimulation.

Limitations of the technique

Following stimulation, a delay is required before the accumulation of c-FOS in the nucleus. This delay of about 30 minutes corresponds to mRNA and protein synthesis. This item is opposed to the immediacy of the results that may be obtained by recording the activity of neurons with electrophysiology. This can cause a loss of information about rapid changes in neuronal activity after a specific and transient stimulus.

As c-FOS protein may have a half-life of 90 to 100 min⁴, its expression could be affected by the surgical procedures or stress associated with the manipulation of the animal, its constraint or change in its environment. Thus, it is necessary to minimize manipulations that could induce changes in neuronal activity not related to the studied stimulus and to perform tissue sampling immediately after the end of the physiological stimulus.

Modifications and troubleshooting of the technique

In this protocol, the revelation step used a solution which contained 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, nickel ammonium sulphate and hydrogen peroxide but the commercial kits for peroxidase could also be used for this step.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The University Paris 13 supported this work. ASPT was supported by a University Paris 13 fellowship and the "Association Française pour le Syndrome d'Ondine". FJ was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The GR-Ex (ref ANR-11-LABX-0051) is funded by the program "Investissement d'avenir" of the French National Research agency (ref ANR-11-IDEX-0005-02).

References

1. Curran, T., & Teich, N. M. Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology*. **116**, 221-235 (1982).
2. Curran, T., MacConnell, W. P., van Straaten, F., & Verma, I. M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the *v-fos* gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol*. **3**, 914-921 (1983).
3. Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L., & Verma, I. M. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell*. **36**, 259-268 (1984).
4. Herdegen, T., & Leah, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*. **28**, 370-490 (1998).
5. Dragunow, M., & Faull, R. The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. **29**, 261-265 (1989).
6. Bullitt, E. Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. **296**, 517-530 (1990).
7. Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature*. **311**, 433-438 (1984).
8. Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem*. **260**, 14101-14110 (1985).
9. Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., & Curran, T. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*. **312**, 716-720 (1984).
10. Teppema, L. J., Berkenbosch, A., Veening, J. G., & Olievier, C. N. Hypercapnia induces *c-fos* expression in neurons of retrotrapezoid nucleus in cats. *Brain Res*. **635**, 353-356 (1994).
11. Teppema, L. J. *et al.* Expression of *c-fos* in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol*. **388**, 169-190 (1997).
12. Larnicol, N., Wallois, F., Berquin, P., Gros, F., & Rose, D. *c-fos*-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *J Physiol Paris*. **88**, 81-88 (1994).
13. Bodineau, L., & Larnicol, N. Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience*. **108**, 643-653 (2001).
14. Erickson, J. T., & Millhorn, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol*. **348**, 161-182 (1994).
15. Bodineau, L. *et al.* Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pediatr Res*. **53**, 266-273 (2003).
16. Voituron, N., Frugiere, A., Gros, F., Macron, J. M., & Bodineau, L. Diencephalic and mesencephalic influences on ponto-medullary respiratory control in normoxic and hypoxic conditions: an in vitro study on central nervous system preparations from newborn rat. *Neuroscience*. **132**, 843-854 (2005).
17. Voituron, N., Frugiere, A., Champagnat, J., & Bodineau, L. Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. *J Physiol*. **577**, 55-68 (2006).
18. Voituron, N. *et al.* The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience*. **194**, 95-111 (2011).
19. Suzue, T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol*. **354**, 173-183 (1984).
20. Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. (2012).

21. Rousseau, J. P., & C., C. Electrophysiology on isolated brainstem-spinal cord preparations from newborn rodents allows neural respiratory network output recording. *JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS*. **in press** (2015).
22. Start, R. D., Layton, C. M., Cross, S. S., & Smith, J. H. Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol.* **45**, 1120-1121 (1992).
23. Paxinos, G., & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th edition edn, CA: Academic Press, (1998).
24. Paxinos, G., & Franklin, K. B. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition edn, CA: Academic Press, (2001).
25. Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., & Larnicol, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.* **857**, 30-40 (2000).
26. Berquin, P., Cayetanot, F., Gros, F., & Larnicol, N. Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res.* **877**, 149-159 (2000).
27. Bodineau, L., Cayetanot, F., & Frugiere, A. Fos study of ponto-medullary areas involved in the in vitro hypoxic respiratory depression. *Neuroreport.* **12**, 3913-3916 (2001).
28. Takakura, A. C. *et al.* Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol.* **572**, 503-523 (2006).
29. Mulkey, D. K. *et al.* Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.* **7**, 1360-1369 (2004).
30. Finley, J. C., & Katz, D. M. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* **572**, 108-116 (1992).
31. Bodineau, L. *et al.* Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology.* **152**, 3492-3503 (2011).
32. Okada, Y., Chen, Z., Jiang, W., Kuwana, S., & Eldridge, F. L. Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *J Appl Physiol (1985).* **93**, 427-439 (2002).
33. Saadani-Makki, F., Frugiere, A., Gros, F., Gaytan, S., & Bodineau, L. Involvement of adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Neuroscience.* **127**, 505-518 (2004).
34. Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science.* **237**, 192-197 (1987).
35. Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* **240**, 1328-1331 (1988).
36. Herdegen, T., Kovary, K., Leah, J., & Bravo, R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol.* **313**, 178-191 (1991).
37. Marina, N., Morales, T., Diaz, N., & Mena, F. Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments. *Brain Res.* **954**, 100-114 (2002).