

### Etude des mécanismes centraux par lesquels l'étonogestrel, un progestatif de la famille des gonanes, renforce la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Investigations réalisées dans le cadre des hypoventilations centrales

Camille Loiseau

### ▶ To cite this version:

Camille Loiseau. Etude des mécanismes centraux par lesquels l'étonogestrel, un progestatif de la famille des gonanes, renforce la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Investigations réalisées dans le cadre des hypoventilations centrales. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066174 . tel-02164308

### HAL Id: tel-02164308 https://theses.hal.science/tel-02164308

Submitted on 25 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.



### THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED 394)

réalisée au sein de l'UMR\_S1158 Inserm/UPMC Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique Physiologie et Plasticité du Contrôle Respiratoire

### ETUDE DES MECANISMES CENTRAUX PAR LESQUELS L'ETONOGESTREL, UN PROGESTATIF DE LA

FAMILLE DES GONANES, RENFORCE LA REPONSE RESPIRATOIRE A L'HYPERCAPNIE.

**INVESTIGATIONS REALISEES DANS LE CADRE DES HYPOVENTILATIONS CENTRALES** 

présentée par

### **Camille LOISEAU**

dirigée par

### le Professeur Laurence BODINEAU

soutenue publiquement le 23 juin 2017

JURY COMPOSE DE

M Philippe LE ROUZIC, Professeur	Président
Université Pierre et Marie Curie, Paris	
M Richard KINKEAD, Professeur	Rapporteur
Université Laval, Québec	
M Didier MORIN, Professeur	Rapporteur
Université de Bordeaux, Bordeaux	
Mme Véronique FABRE, Chargée de recherche Inserm	Examinateur
Université Pierre et Marie Curie, Paris	
M Jean-Charles VIEMARI, Chargé de recherche CNRS	Examinateur
Institut de Neurosciences de la Timone, Marseille	

### **Publications scientifiques**

### Article de recherche publiés

**Loiseau C.**, Osinski D., Joubert F., Straus C., Similowski T., Bodineau L. The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. Neurosci Lett 2014; 567:63-67.

Joubert F.\*, **Loiseau C.**\*, Perrin-Terrin A.S.\*, Cayetanot F., Frugière A., Voituron N., Bodineau L. Key brainstem structures activated during hypoxic exposure in one-day-old mice highlight characteristics for modeling breathing network in premature infants. Front Physiol. 2016; 9;7:609. \*, co-premiers auteurs

Bigot A., Duddy W.J., Ouandaogo Z.G., Negroni E., Virginie Mariot, Ghimbovschi S., Harmon B., Wielgosik A., **Loiseau C.**, Devaney J., Dumonceaux J., Butler-Browne G., Mouly V., Duguez S. Age associated methylation suppresses spry1, leading to a failure of re-quiescence and loss of the reserve stem cell pool in elderly muscle. Cell Reports 2015; 13:1172-1182.

### Revue soumise

**Loiseau C.,** Cayetanot F., Joubert F., Perrin-Terrin A.S., Cardot P., Fiamma M.N., Frugière A., Straus C., Bodineau L. Current perspectives for the use of gonane progesteronergic drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes. Soumise à Current in Neuropharmacology le 01 avril 2017

### Article de recherche à soumettre

**Loiseau C.**, Barka B., Bodineau L. Involvement of orexin in the strengthening of respiratory response to acidosis by etonogestrel. A potential issue for central hypoventilations Manuscrit à soumettre à Journal of Physiology

### Communications scientifiques dans des congrès

### Communications orales

**Loiseau C.**, Osinski D., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Potentialisation de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique chez le rat nouveau-né par un progestatif, l'étonogestrel. 8<sup>ème</sup> Journées de Recherches Respiratoires, Montpellier, octobre, 2013.

**Loiseau C.**, Osinski D., Joubert F., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel, a progestin a study made on *ex vivo* preparation of newborn rat. 11<sup>ème</sup> colloque scientifique étudiant de la Société Legallois pour l'Etude du Contrôle Respiratoire, Quebec, février 2015.

**Loiseau C.**, Osinski D., Joubert F., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin, involvement of diencephalic structures. 16<sup>ème</sup> journée de l'école doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique, Paris, mai, 2015. **Prix de la communication orale, session « from bench to clinic »** 

**Loiseau C.**, Fournier T., Straus C., Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin. Possible involvement of orexin neurons.  $10^{\text{ème}}$  Journées de Recherches Respiratoires, Dijon, octobre, 2015.

### Communications affichées

**Loiseau C.**, Osinski D., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to acidosis in newborn rat by a progestin, involvement of supramedullary areas. 9<sup>ème</sup> congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, Poitiers, avril, 2014. **Prix du meilleur poster, session «physiologie respiratoire»** 

**Loiseau C.**, Osinski D., Joubert F., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin, involvement of diencephalic structures. 15<sup>ème</sup> Journées de l'école doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique, Paris, mai, 2014.

**Loiseau C.**, Osinski D., Straus C., Similowski T. and Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin. Involvement of diencephalic areas. 9<sup>ème</sup> Journées de Recherches Respiratoires, Bordeaux, octobre, 2014.

**Loiseau C.**, Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin. Possible involvement of orexin neurons.  $17^{\text{ème}}$  journée de l'école doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique, Paris, mai, 2016.

**Loiseau C.**, Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin. Possible involvement of orexin neurons.  $10^{\text{ème}}$  congrès de la Federation of European Neurosciences Societies, Copenhague, juillet, 2016.

**Loiseau C.**, Bodineau L. Enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rat by a progestin. Possible involvement of orexin neurons. 10<sup>ème</sup> Journée de la Federation of European Physiological Society, Paris, juillet, 2016. **Prix du meilleur poster, session « neurophysiology »** 

### ABREVIATIONS

μOR : μ opioid receptor (récepteurs μ aux opioïdes)
XIIN : Noyau hypoglosse
3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde
5HT : Sérotonine
VIIN : Noyau facial

### Α

A : Adrénaline aa : Acide aminé ABC : Avidin-Biotin-Complexe (complexe avidine-biotine péroxydase) AF : Activation Function site Aica : Artère inférieure cérébelleuse antérieure ASIC1a : Acid-Sensing Ion Channels 1a ATP : Adénosine Tri-Phosphate

### В

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BS : Brainstem-Spinal cord preparation (préparation tronc cérébral-moelle épinière)

BSA : Bovine Serum Albumine (albumine de sérum bovin)

### С

C4 : 4<sup>ème</sup> racine cervicale ventrale

CamKII : Calcium/calmodulin-dependant Kinase II

CCHS : Congenital Central Hypoventilation Syndrome (syndrome d'hypoventilation centrale congénitale)

CCR : Commande Centrale Respiratoire

ChAT : Choline Acétyle Transférase

CHS : Central Hypoventilation Syndromes (syndromes d'hypoventilation centrale)

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

### D

DA : Dopamine

DAB : Diaminobenzidine

DBS : Diencephalon-Brainstem-Spinal cord preparation (préparation diencéphale-tronc cérébralmoelle épinière)

DHEA(S) : Déhydroépiandrostérone (sulfate)

DMH : Dorsomedial Hypothalamic nucleus (noyau hypothalamique dorsomédian)

DMSO : Diméthyl Sulfoxide

DOPA : L-Dihydroxyphénylalanine

DRG : Dorsal Respiratory Group (groupe respiratoire dorsal)

### Е

E : Phase Expiratoire

- E1 : Première phase de l'expiration
- E2 : Deuxième phase de l'expiration
- ETO : Etonogestrel

### F

f<sub>R</sub> : Fréquence Respiratoire

### G

GABA : Gamma-Aminobutyric Acid (acide gamma-aminobutyrique)
GABA<sub>A</sub> : Gamma-Aminobutyric Acid receptor A (Récepteur ionotropique au GABA de type A)
GAD : Glutamic Acid Decarboxylase (acide glutamique décarboxylase)
GPR4 : Guanine nucleotide-binding protein

### Н

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène HSCR : Maladie d'Hirschsprung

### I

I : Phase Inspiratoire
I<sub>CAN</sub> : Courant cationique non sélectif activé par le calcium
IEG : Immediate Early Gene
IF : Inhibition Function site
I<sub>NaP</sub> : Courant entrant sodique persistant
IntC4 : Intégration de l'amplitude des bouffées inspiratoires
IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

### К

KF : Noyau Kölliker-Fuse KI : Knock-In KO : Knock-Out

### L

L1 : Première racine lombaire IPB : Lateral Parabrachial nucleus (noyau parabrachial latéral) LC : Locus Coeruleus LCRa : Liquide Céphalo-Rachidien artificiel LH : Lateral Hypothalamic area (aire hypothalamique latérale) LO-CCHS : Late Onset-CCHS (Apparition tardive-CCHS) LO-CHS/HD : Late Onset-CHS with Hypothalamic Dysfunction (Syndrome d'hypoventilation centrale d'apparition tardive avec dysfonctionnement hypothalamique)

### Μ

mPB : Medial Parabrachial nucleus (noyau parabrachial médian) mPR : Membrane Progesterone Receptor (récepteur membranaire à la progestérone) MS : Medullary-Spinal cord preparation (préparation bulbe rachidien-moelle épinière)

### Ν

NA : Noradrénaline NK1R : Neurokinin-1 Receptor (Récepteur à la substance P) NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate NPARM : Non PolyAlanine Repeat Mutation (mutation non liée à une expansion de répétition polyalanine) NREM : Non-Rapid Eye Movement (sommeil lent) NTS (c, m, vl) : Noyau du Tractus Solitaire (partie commissurale, médiane, ventrolatérale)

### 0

O<sub>2</sub> : Dioxygène

OHS : Obesity Hypoventilation Syndrome (syndrome d'hypoventilation lié à l'obésité)

OX1R : Orexin 1 Receptor (récepteur de type 1 à l'orexine)

OX2R : Orexin 2 Receptor (récepteur de type 2 à l'orexine)

### Ρ

PA : Potentiel d'Action

PaCO<sub>2</sub> : Pression artérielle en CO<sub>2</sub>

PAG (d, dl, l, vl): Periaqueducal Gray matter (substance grise périaqueducale ; partie dorsomédiane, dorsolatérale, latérale, ventrolatérale)

PaO<sub>2</sub> : Pression artérielle en O<sub>2</sub>

PAQR : Récepteurs de la famille des adipoQ

PARM : PolyAlanine Repeat Mutation (mutation d'expansion de répétition polyalanine)

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)

PBS-T : Phosphate Buffer Saline - Triton (Tampon phosphate salin-Triton)

PeF : Perifornical area (aire hypothalamique périfornicale)

PETCO<sub>2</sub> : Pression partielle en CO<sub>2</sub>

PFA : Paraformaldéhyde

pFRG : Parafacial Respiratory Group (groupe respiratoire parafacial)

PGRMC1 : Progesterone Receptor Membrane Component 1

PH : Posterior Hypothalamic area (aire hypothalamique postérieure)

PHO2XB : Paired-like Homeobox 2B

PiCo : Post-inspiratory Complex

PMS : Ponto-Medullary-Spinal cord preparation (préparation pont-bulbe rachidien-moelle épinière)

Post-I : Phase post-Inspiratoire

PP : Parapyramidal group (groupe parapyramidal)

PR : Progesterone Receptor (récepteur nucléaire à la progestérone)

PRE : Progesterone Responsive Element

PréBotz : Complexe de Pré-Bötzinger PRG : Pontine Respiratory Group (groupe respiratoire pontique) PS : Pregnenolone Sulfate PtCO<sub>2</sub> : Pression tissulaire en CO<sub>2</sub> PtO<sub>2</sub> : Pression tissulaire en O<sub>2</sub>

### R

RAI1 : Retinoic Acid Induced 1

REM : Rapid Eye Movement (sommeil paradoxal)

RMg : Noyau Raphé Magnus

ROb : Noyau Raphé Obscurus

ROHHAD : Rapid-Onset Obesity with Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (Syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce)

RPa : Noyau Raphé Pallidus

RTN : Retrotrapezoide Nucleus (noyau rétrotrapézoïde)

### S

SEM : Standard Error of the Mean (erreur standard à a moyenne)

SHGB : Sex Hormone Binding Globuline (protéine de liaison des hormones sexuelles)

SIDS : Sudden Infant Death Syndrome (syndrome de mort subite du nourrisson)

SNC : Système Nerveux Central

SP : Substance P

SST : Somatostatine

SubC : Subcoeruleus nucleus (noyau subcoeruleus)

### Т

T : Tesla

T1 : Temps de relaxation longitudinale

T2 : Temps de relaxation transversale

TH : Tyrosine Hydroxylase

### V

V<sub>E</sub> : Ventilation minute

VGLUT2 : Vesicular Glutamate Transporter 2 (transporteur vésiculaire du glutamate de type 2) VLM : Ventrolateral Medullary reticular nucleus (noyau réticulaire bulbaire ventrolatéral) VRG (c, i, r) : Ventral Respiratory Group (groupe respiratoire ventral ; partie caudale, intermédiaire, rostrale)

V<sub>T</sub> : Volume courant

### LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Tracés représentant les potentiels d'action enregistrés au niveau de neurones respiratoires localisés dans le bulbe rachidien
fonction du cycle respiratoire <i>in vivo</i>
Figure 3 : Représentation schématique de la localisation des structures bulbaires et pontiques participant à la CCR.
Figure 4 : Découverte du préBotz la structure indispensable à la rythmogénèse respiratoire.
Figure 5 : Les neurones SST+ définissent un sous-groupe des neurones NK1R+ du préBotz15
Figure 6 : Activation spatio-temporelle des neurones du groupe respiratoire parafacial et du préBotz17
Figure 7 : L'activité enregistrée d'un neurone pré-inspiratoire localisé à la surface
ventrolatérale du bulbe rostral ainsi que des activités enregistrées en C4 et en L1
Figure 8 : Schéma représentant la tranche horizontale du tronc cérébral en vue sagittale 21
Figure 9 : PiCo : localisation et activités post-inspiratoires enregistrées sur une tranche
horizontale contenant le VRG
Figure 10 : Le modèle pacemaker et le modèle groupe-pacemaker de rythmogénèse au sein du préBotz25
Figure 11 : Représentation schématique des structures catécholaminergiques
Figure 12 : Représentation schématique des structures sérotoninergiques
Figure 13 : Propriétés des neurones du RTN/pFRG en réponse au CO <sub>2</sub> in vivo et in vitro 43
Figure 14 : Réponse respiratoire au CO <sub>2</sub> de souris KO pour GPR4 et de souris double KO pour
GPR4 et TASK-2
Figure 15 : Effets du pH sur un neurone orexinergique54
Figure 16 : Co-expression de ASIC1a et d'orexine A dans l'aire hypothalamique latérale d'un rat adulte
Figure 17 : Réponse ventilatoire d'un sujet sain et d'une patiente CCHS pendant une
expérience de réinhalation de CO <sub>2</sub> 61
Figure 18 : Représentation schématique du gène et de la protéine PHOX2B64
Figure 19 : Enregistrements pléthysmographiques de souris nouveau-nées
Figure 20 : Absence des neurones PHOX2B-positifs dans le RTN/pFRG et de la réponse
respiratoire à l'hypercapnie chez les souris mutantes Phox2b <sup>27Ala/+</sup> conditionnelles71
Figure 21 : Schéma représentant les mécanismes par lesquels l'obésité peut conduire à
hypercapnie diurne chronique76
Figure 22 : Structure de la molécule de progestérone77
Figure 23 : Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes78
Figure 24 : Structure des molécules de désogestrel et d'étonogestrel
Figure 25 : Structure du gène codant pour PR-A et PR-B et domaines fonctionnels
Figure 26 : Profil d'expression bulbaire du gène Pgrmc190
Figure 27 : Récepteur ionotropique GABA <sub>A</sub> 92

Figure 28 : Effet de l'alloprégnanolone sur la fréquence respiratoire de préparations ex vivo
de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés
Figure 29 : Effet de déhydroepiandrosterone sulfate sur la fréquence respiratoire de
préparations <i>ex vivo</i> de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés
Figure 30 : Récepteur ionotropique NMDA
Figure 31 : Effet d'une administration en intra-veineuse de doses croissantes de progestérone
chez le chat adulte
Figure 32 : Représentation de la réponse respiratoire au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> chez une femme enceinte.
Figure 33 : Réponse ventilatoire d'une patiente CCHS pendant une expérience de réinhalation
de CO <sub>2</sub> avant et pendant la prise de désogestrel103
Figure 34 : Schéma représentant une préparation <i>ex vivo</i> DBS de rat nouveau-né dans une
cuve d'enregistrement ainsi que l'activité rythmique enregistrée sur 1 min au niveau de C4. 
Figure 35 : Schéma représentant le protocole d'exposition en normopH
Figure 36 : Schéma représentant le protocole d'exposition en acidose métabolique 110
Figure 37 : Schéma représentant le protocole de co-applications almorexant 50nm - ETO 5·10 <sup>-1</sup>
Figure 28 : Schéma représentant le protocole de détection immunohistechimique des
protécions s EOS et erovine A par procédé immunohistochimique indirect en lumière freide
proteines c-ros et orexine à par procede infinunonistochimique indirect en iumere froide
avec amplification du signal grace au complexe ABC.
rigure 39 : Representation schematique des étapes de la construction de l'atlas numerique
L'Indimensionnel et deformable du tronc cerebral numain
Figure 40 : Photographie prise du troisieme tronc cerebrai (lace dorsal) après fixation 313
rigure 41 : Representation schematique de la localisation rostro-caudale des structures
Controlant la respiration de l'atlas
Figure 42 : Exemple de delimitation des structures sur une coupe de bulbe rachidien

### SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE
Chapitre I : La commande centrale respiratoire2
I- La ventilation une grande fonction physiologique2
I.1- Ventilation pulmonaire et respiration cellulaire2
I.2- L'appareil respiratoire2
<ul> <li>II- Quelques données historiques concernant l'origine supra-spinale de la commande respiratoire4</li> </ul>
III- Le réseau respiratoire bulbo-pontique4
III.1- Les neurones respiratoires4
III.2- Les structures bulbo-pontiques impliquées dans l'élaboration de la commande respiratoire
IV- Les structures encéphaliques modulant la commande centrale respiratoire26
IV.1- Les structures cathécolaminergiques26
IV.2- Les groupes sérotoninergiques29
IV.3- La substance grise périaqueducale32
IV.4- L'hypothalamus caudal32
Chapitre II : La chémosensibilité au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> 38
I- La réponse respiratoire aux variations de CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> 38
II- La chémosensibilité au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> 40
II.1- La chémosensibilité périphérique au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> 40
II.2- La chémosensibilité centrale au CO2/H+41
III- Les structures respiratoires chémoréceptrices et chémosensibles au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> ponto- bulbaires42
III.1- Le noyau retrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial
III.2- Les noyaux des Raphés46
III.3- Le groupe parapyramidal49
III.4- Noyau du tractus solitaire49
III.5- Le complexe de pré-Bötzinger50
III.6- Locus coeruleus
IV- Les structures respiratoires chémosensibles au CO <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> suprapontiques

IV.1- La substance grise périaqueducale	. 51
IV.2- Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal	. 52
IV.3- L'hypothalamus caudal	. 52
IV.4- Les neurones histaminergiques	. 56
Chapitre III : Les syndromes d'hypoventilation centrale : des pathologies associées à défaut de la commande centrale respiratoire	un . 58
I- Les syndromes d'hypoventilation centrale	. 58
I.1- Définition	. 58
I.2- Prise en charge thérapeutique	. 58
II- Le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénital ou syndrome d'Ondine	60
II.1- Épidémiologie	. 60
II.2- Etiologie	. 61
II.3. LO-CCHS	. 71
III- ROHHAD	. 72
III.1- Épidémiologie	. 72
III.2- Caractéristiques cliniques	. 72
III.3- Etiologie	. 73
IV- Autres pathologies associées à un défaut de la commande centrale respiratoire Syndrome Hypoventilation d'Obésité	: le .74
Chapitre IV – les systèmes progestéronergiques	. 77
I- La progestérone et les progestatifs de synthèse	. 77
I.1- La progestérone	. 77
I.2- Les progestatifs de synthèse	. 80
II- Récepteurs cibles de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs de synthèse sein du SNC	au . 84
II.1- Récepteurs nucléaires à la progestérone	. 84
II.2- Récepteurs membranaires à la progestérone	. 86
II.3- Récepteurs à d'autres messagers chimiques	. 90
III- Les systèmes progestéronergiques et la ventilation	. 98
III.1- Effet sur la ventilation de base	. 98
III.2- Effet de la progestérone et des progestatifs sur la réponse respiratoire l'hypercapnie1	e à 102
MATERIELS ET METHODES	105
I- Les préparations <i>ex vivo</i> de système nerveux central isolés	106

I.1- Enregistrements électrophysiologiques sur la commande centrale respiratoire 106
I.2- Protocoles expérimentaux108
I.3- Statistiques112
II- Investigations anatomiques113
II.1- Préparation et découpe des échantillons113
II.2- Protocole d'immunomarquage113
II.3- Analyse quantitative de la distribution des neurones détectés et statistiques . 115
RESULTATS116
Chapitre I : l'étonogestrel augmente la réponse respiratoire à l'acidose métabolique via l'implication de structures suprabulbaires121
I- Effet de l'étonogestrel en normopH121
II- Effet de l'étonogestrel en acidose métabolique122
Chapitre II : Revue des données de la littérature qui conduisent à souligner l'intérêt des progestatifs de la famille des gonanes pour le traitement des troubles respiratoires dans le cadre des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale
I- La progestérone, ses dérivés et les progestatifs de synthèse ont des actions variées au sein du système nerveux central128
II- La progestérone et des progestatifs de synthèse exerce une action stimulante sur la commande respiratoire dans des situations non pathologiques
III- Des données cliniques et issues de modèles animaux suggèrent que les gonanes augmentent la ventilation chez des patientes CCHS
Chapitre III : Implication de la signalisation orexinergique dans le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel. Une potentielle piste thérapeutique pour le traitement des hypoventilations centrales
I- Effet d'une exposition aigüe à l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique et en condition de normopH
II- Le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel dépend de la présence de structures diencéphaliques
III- L'étonogestrel modifie l'expression de c-fos induite par l'acidose métabolique dans des structures impliquées dans l'élaboration et/ou la régulation de la commande centrale respiratoire
IV- Implication des systèmes orexinergiques dans le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel
DISCUSSION GENERALE
I- Considérations méthodologiques240
I.1- Exposition au désogestrel et à l'étonogestrel

I.2- Préparations <i>ex vivo</i> de système nerveux central isolées de rongeurs nouveau-nés
I.3- Expression du proto-oncogène c-fos comme marqueur d'activité neuronale à court terme
II- Contexte de l'étude
II.1- Du génotype PHOX2B au phénotype CCHS
III- Effets de l'étonogestrel sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique
III.1- L'étonogestrel renforce la réponse respiratoire à l'acidose métabolique - un mécanisme qui dépend de la présence de structures diencéphaliques
III.2- L'etonogestrel modifie l'expression de c-fos induite par l'acidose métabolique dans les structures centrales impliquées dans l'élaboration et/ou la régulation de la commande central respiratoire central
III.3- Implication de la signalisation orexinergique dans l'effet de l'étonogestrel 252
III.4- Mécanisme d'action potentiel de l'etonogestrel sur les neurones orexinergiques
CONCLUSION ET PERSPECTIVES
BIBLIOGRAPHIE
ANNEXES
Construction d'un atlas numérique tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain localisant les structures respiratoires
I- Les étapes de construction de l'atlas numérique tridimensionnel et déformable 311
II- Obtention du tronc cérébral et fixation des tissus
III - Acquisition des images en IRM313
III.1 Principe de l'IRM
III.2- Acquisition des images anatomiques et de diffusions
IV- Investigations anatomiques et immunohistochimiques
IV.1- Découpe du tissu
IV.2- Coloration Nissl et Luxol
IV.3- Protocole d'immunomarquage
V- Acquisitions et traitement des données histologiques
V.1- Acquisition et traitement des images
V.2- Délimitation des structures
V.3- Importation des données histologiques

Les structures cérébrales du tronc cérébral activées par l'hypoxie chez les souris nouveau-née âgées d'un jour mettent en lumière des caractéristiques modélisant le réseau respiratoire du nouveau-né humain prématuré
I- Contexte scientifique
II- Description brève des procédures expérimentales et des résultats
II.1- La réponse respiratoire à l'hypoxie
II.2- Induction de c-FOS et procédures d'immunohistochimiques et d'immunohistofluorescence
III- Discussion
III.1- Les neurones du noyau subcoeruleus, une aire encéphalique impliquée dans la dépression ventilatoire sous hypoxie chez le fœtus sont activés par l'hypoxie chez la souris de 1 jour
III.2- L'hypoxie induit une élévation du nombre de neurones c-FOS positifs dans le NTS et la VLM, deux structures qui participent à l'hyperventilation hypoxique mais il n'y a pas voire très peu de cellules catécholaminergiques activées
III.3- La surface ventrale du bulbe rachidien présente une augmentation du nombre de neurones c-FOS-positifs au sein de neurones sérotoninergiques mais pas PHOX2B- positifs
IV- Conclusion

INTRODUCTION GENERALE

### Chapitre I : La commande centrale respiratoire

### I- La ventilation une grande fonction physiologique

### I.1- Ventilation pulmonaire et respiration cellulaire

Le maintien de l'homéostasie, indispensable à la survie d'un organisme, nécessite la régulation harmonieuse des grandes fonctions physiologiques. L'appareil ventilatoire a pour principal rôle d'assurer l'une de ces grandes fonctions, la ventilation. Cette dernière contribue à répondre aux besoins impérieux et continus d'un apport en dioxygène ( $O_2$ ) et d'une clairance du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) (Fitting, 2015). Parmi les constituants de l'appareil ventilatoire le poumon est l'organe où s'opère l'échange entre l'O<sub>2</sub> contenu dans l'air environnant et le CO<sub>2</sub> provenant du métabolisme des cellules de l'organisme. On distingue la respiration cellulaire de la ventilation pulmonaire. La respiration cellulaire désigne l'ensemble des réactions biochimiques du métabolisme cellulaire nécessitant de l'O<sub>2</sub> qui interviennent dans la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), nécessaire au fonctionnement de la cellule. Ce mécanisme consomme de l'O<sub>2</sub> et produit du CO<sub>2</sub>. L'apport en O<sub>2</sub> au niveau des cellules et l'élimination du CO<sub>2</sub> se font par voie sanguine couplée à la ventilation pulmonaire qui s'effectue de manière cyclique et ininterrompue. La ventilation pulmonaire constitue un acte moteur mettant en jeu différents muscles de l'appareil ventilatoire qui permet les échanges gazeux. Ces échanges s'opèrent grâce à un mécanisme de diffusion et dépendent de facto des pressions partielles des gaz dans les différents compartiments, alvéolaire et plasmatique. L'activation rythmique des muscles de l'appareil ventilatoire entraine une alternance d'entrées d'air (inspirations) et de sorties d'air (expirations), sous-tendues par des variations rythmiques du volume thoracique, elles-mêmes sous-tendues par un contrôle nerveux d'origine centrale.

Dans la suite de ce manuscrit, le terme de respiration sera utilisé en tant que synonyme de ventilation par analogie avec la littérature du domaine concerné.

### I.2- L'appareil respiratoire

### I.2.1- L'inspiration

La mécanique ventilatoire est basée sur des variations de pression entre les poumons et l'atmosphère. L'inspiration résulte de la contraction des muscles inspiratoires qui vont permettre notamment d'augmenter le volume de la cavité thoracique. Ce mouvement actif provoque une dépression intra-pulmonaire suffisante pour induire un déplacement d'air dans les poumons : on parle de ventilation en pression négative. Parmi les muscles instigateurs, le diaphragme est responsable à lui seul de la majorité des déplacements d'air, on le qualifie de muscle inspiratoire principal. Chez l'Homme le diaphragme est innervé par les axones des motoneurones phréniques dont les somas sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière cervicale (segments C3, C4 et C5) (Malakhova and Davenport, 2001). En se contractant, le diaphragme s'abaisse entrainant avec lui les poumons. Il est assisté par les muscles intercostaux externes qui, en induisant une élévation des côtes, augmentent le diamètre antéropostérieur de la cavité thoracique (Sant'ambrogio and Camporesi, 1973). Dans une moindre mesure le diaphragme est également assisté lors d'une inspiration forcée, pour majorer le volume inspiratoire, par les muscles dits accessoires que sont les muscles sterno-cléïdo-mastoïdiens et scalènes (Sant'ambrogio and Camporesi, 1973). L'étirement des poumons a pour effet l'expansion de l'espace intra-pulmonaire et par conséquent la réduction de la pression alvéolaire. Selon un principe physique l'air rentre alors dans les poumons jusqu'aux alvéoles. Les alvéoles pulmonaires constituent le compartiment où s'effectuent les échanges gazeux. Plus particulièrement les échanges s'effectuent au niveau de la paroi alvéolo-capillaire, grâce à un phénomène de diffusion passive des gaz. Un gaz diffuse d'une zone de pression partielle élevée vers une zone de pression partielle plus basse. Dans le cas de l'O<sub>2</sub>, la pression partielle étant nettement supérieure dans l'air alvéolaire (14 kPa) qu'elle ne l'est dans le sang présent au niveau des capillaires pulmonaires (5 kPa), la diffusion de l' $O_2$ se fait dans le sens air alvéolaire vers le sang. Il est alors transporté par le sang aux cellules de l'organisme. Réciproquement, la pression partielle de CO<sub>2</sub> dans l'air alvéolaire est inférieure à celle du sang veineux, ce gaz diffuse vers l'air alvéolaire et sera expiré (Guenard, 1987). Il est également important de noter le rôle primordial que jouent les muscles dilatateurs des voies aériennes supérieures. Ces dernières constituent la voie de conduction de l'air et s'étendent du nez à la trachée extra-thoracique. En l'absence de l'action des muscles dilatateurs, qui permettent de maintenir la stabilité des voies aériennes supérieures, le gradient de pression généré par la contraction du diaphragme lors de l'inspiration entraine un collapsus du pharynx (Series et al., 1999). En effet, contrairement aux structures rigides que sont le nez et le larynx, la paroi du pharynx qui ne présente pas de cadre osseux est d'avantage sujette au collapsus. L'inspiration nécessite donc une coordination étroite entre les différents muscles inspiratoires, avec une activation des muscles dilatateurs des voies aériennes supérieures qui précède celle du diaphragme (Strohl et al., 1980). Les muscles dilatateurs sont notamment innervés par les axones des motoneurones de l'hypoglosse dont les corps cellulaires sont localisés dans le bulbe rachidien (Barnard, 1940, Dobbins and Feldman, 1995).

### I.2.2- L'expiration

À la fin de l'inspiration, les muscles inspiratoires se relâchent, entrainant la cavité thoracique à revenir spontanément à sa position initiale. Ce repositionnement induit une diminution de l'espace intra-pulmonaire et *de facto* une augmentation de la pression intraalvéolaire, entrainant l'expulsion des gaz présents dans les alvéoles. En ce sens, l'expiration au repos, chez l'Homme constitue un acte passif. A noter qu'en cas d'effort ou dans des situations d'hypercapnie ou d'hypoxie, des muscles expiratoires peuvent être recrutés, on parle alors d'expiration active. La contraction des muscles abdominaux entraine une compression des viscères permettant de pousser le diaphragme vers le thorax. À ceci s'ajoute la contraction des muscles intercostaux internes, qui entraine une diminution de la cavité thoracique. Les effets combinés de ces muscles contribuent à augmenter la pression intrapulmonaire et ainsi à évacuer le contenu en gaz hors des poumons.

## II- Quelques données historiques concernant l'origine supra-spinale de la commande respiratoire

Claude Galien, célèbre médecin grec de l'Antiquité est l'un des premiers à avoir soupçonné et démontré l'origine supra-spinale de la commande respiratoire en constatant qu'une section réalisée entre le bulbe rachidien et la moelle épinière entrainait la mort par arrêt respiratoire. Albrecht Von Haller, en partant de la constatation que le cervelet semble être la région la mieux protégée de l'encéphale, proposa que ce dernier soit le siège de la commande respiratoire. Les expériences d'ablation du cervelet et des hémisphères cérébraux réalisées chez le lapin par Lorry en 1760 ont permis d'écarter l'hypothèse de Von Haller et de restreindre cette origine supra-spinale à une origine sous corticale (Lorry, 1760). Presque 1 siècle plus tard, les travaux de Legallois et de Flourens, conforteront ces résultats en démontrant que le rythme respiratoire est généré dans le tronc cérébral, plus particulièrement au niveau du pont et du bulbe rachidien, par ce que Flourens nommera le « nœud vital » (Legallois, 1812, Flourens, 1842, 1851). Par la suite, Lumsden en réalisant des sections étagées et des stimulations électriques sur le tronc cérébral du chat anesthésié, a précisé la localisation des centres respiratoires tout en faisant émerger la notion de réseau respiratoire interconnecté (Lumsden, 1923b, a). Ces études ont fait office de préambule à de nombreuses publications qui, en multipliant les approches (lésions, stimulations électriques, enregistrements unitaires de neurones) ont décrit sur différents modèles (chat, chien, lapin, rat) dans différentes conditions expérimentales (animaux anesthésiés, décérébrés ou bivagotomisés), le rôle fonctionnel et la localisation des acteurs du réseau de neurones à l'origine de la commande centrale respiratoire (CCR) (Gesell et al., 1936, Stella, 1938, Pitts et al., 1939, Gesell et al., 1940, Pitts, 1941, Pitts, 1946, Hoff and Breckenridge, 1949, Coglianese et al., 1977, Suzue, 1984, Smith et al., 1991).

Après avoir expliqué comment s'organise temporellement la CCR ainsi que différentes notions inhérentes au réseau respiratoire, ce premier chapitre introductif reviendra en détail sur l'organisation anatomique, le rôle et les caractéristiques associés aux neurones de la CCR.

### III- Le réseau respiratoire bulbo-pontique

#### III.1- Les neurones respiratoires

En enregistrant *in vivo* l'activité de nerfs innervant des muscles respiratoires (nerf phrénique, nerfs intercostaux internes, nerf hypoglosse) en parallèle de celle de neurones du tronc cérébral, il a été montré que le *pattern* de décharge de ces derniers pouvait être corrélé aux différentes phases du rythme respiratoire telles que définie par Richter en 1982 (Richter, 1982). Tout d'abord l'enregistrement des activités du nerf phrénique a révélé un rythme respiratoire en trois phases à savoir : 1/ la phase inspiratoire (I) qui se traduit par une augmentation brusque de l'activité du nerf phrénique formant progressivement une « rampe inspiratoire » croissante ; 2/ la phase post-inspiratoire (post-I, ou phase du premier stade de

l'expiration dénommée E1) au cours de laquelle une activité résiduelle est enregistrée au niveau du nerf phrénique ; 3/ la phase expiratoire (E, ou deuxième stade de l'expiration E2) durant laquelle il n'y a plus d'activité au niveau du nerf phrénique (Richter, 1982, Bianchi et al., 1995).

De nombreux travaux se sont attachés à caractériser les neurones respiratoires en fonction de la phase du cycle respiratoire au cours de laquelle leur fréquence de décharge est accrue ou au contraire minimale (Figure 1). De ces études a découlé la notion de neurones respiratoires définis comme étant les neurones qui présentent une activité électrique en phase avec celle des nerfs innervant les muscles respiratoires.



## Figure 1 : Tracés représentant les potentiels d'action enregistrés au niveau de neurones respiratoires localisés dans le bulbe rachidien.

Les phases respiratoires sont définies en fonction de l'activité des motoneurones phréniques et les neurones sont classés en fonction de la phase respiratoire pendant laquelle ils déchargent, le tracé du haut représente les activées électriques du nerf phrénique, le tracé du bas les potentiels d'actions des neurones respiratoires : (A) neurones inspiratoires, (B) neurones post-inspiratoires, (C) neurones expiratoires. D'après Richter et al 1982.

### III.1.1- Classement selon leurs modalités de décharges

Ainsi, les neurones respiratoires peuvent être regroupés en fonction de la phase du cycle respiratoire pendant laquelle ils déchargent (I, PI, E). A l'intérieur de ces 3 groupes, il est possible de les catégoriser en sous-groupes en tenant compte de l'évolution de leur fréquence de décharge, croissante ou décroissante, ainsi que du moment pendant lequel leur fréquence de décharge est maximale, précocement ou au contraire tardivement dans la phase du cycle respiratoire (Figure 2) (Feldman, 1986, Von Euler, 1986, Richter et al., 1987, Bianchi et al., 1995, Bellingham, 1998). Cette procédure de classement a donné lieu à six groupes. On distingue les neurones inspiratoires : précoces à activité décroissante et les tardifs à activité croissante. Ensuite il a été défini des neurones inspiratoires tardifs qui déchargent pendant la transition inspiration-expiratoires à activité croissante et enfin on qualifie des neurones de pré-inspiratoire dans la mesure où ils déchargent à la transition expiration-inspiration (St-John, 1998).



## Figure 2 : Représentation schématique de six types de neurones respiratoires bulbaires en fonction du cycle respiratoire *in vivo*.

I : inspiratoire, PI : post-inspiratoire, E : expiratoire. D'après Richter et al., 1986

### III.1.2- Classement selon leur site de projection axonale

Les neurones respiratoires sont également caractérisés au sein du réseau en fonction de leur connectivité (Bianchi et al., 1995). Ainsi la mise en évidence de leur site de projection axonale, notamment *via* l'injection de traceurs rétrogrades ou antérogrades, a permis de différencier trois types de projection dont découlent trois rôles fonctionnels distincts (Merrill, 1970, Bianchi, 1971, Portillo et al., 1994, Gaytan and Pasaro, 1998). Les neurones innervant les muscles des voies aériennes supérieures, par exemple ceux dont l'axone se trouve dans le nerf laryngé, sont qualifiés de motoneurones crâniens (Bianchi, 1971, 1974) ; ceux projetant du bulbe vers les centres moteurs spinaux, par exemple ceux qui innervent le diaphragme ou les muscles intercostaux, sont appelés interneurones bulbo-spinaux ou neurones pré-moteurs (Merrill, 1970, Bianchi, 1971) ; et enfin ceux qui créent des connexions à l'intérieur du bulbe sont décrits comme des interneurones proprio-bulbaires (Richter, 1982). Ces derniers revêtent une importance toute particulière dans la compréhension des mécanismes qui soustendent l'activité rythmique du réseau respiratoire.

## III.2- Les structures bulbo-pontiques impliquées dans l'élaboration de la commande respiratoire

#### III.2.1- Une organisation articulée autour de 3 groupes respiratoires

#### III.2.1.1- Le groupe respiratoire ventral

Le groupe respiratoire ventral (Ventral Respiratory Group, VRG), a été décrit pour la première fois chez le chat par Bianchi en 1971 (Bianchi, 1971). C'est un groupe bilatéral qui s'étend longitudinalement dans la région ventrolatérale du bulbe rachidien, de la jonction bulbo-spinale à l'extrémité caudale du noyau facial (Figure 3). Il forme ce que l'on appelle une colonne de neurones respiratoires qui est subdivisée en trois régions : caudale, intermédiaire, et rostrale.

La région caudale (cVRG) est définie comme s'étendant de la jonction bulbo-spinale à l'obex (Figure 3) (Feldman, 1986). Elle renferme le noyau rétro-ambigu qui contient en majorité des neurones antidromiquement activés par une stimulation de la racine motrice lombaire L1 (Miller et al., 1985). L1 est une racine lombaire décrite comme innervant des muscles ayant des fonctions expiratoires notamment les muscles abdominaux transverses et obliques externes et internes (Fregosi et al., 1992, Janczewski et al., 2002). Les neurones du noyau rétro-ambigu sont donc qualifiés de neurones expiratoires bulbo-spinaux (Arita et al., 1987, Zheng et al., 1991).

La région intermédiaire (VRGi) s'étend de l'obex jusqu'à l'extrémité rostrale du noyau du tractus solitaire (NTS). Cette région comprend d'une part le noyau ambigu, qui contient les motoneurones laryngés et pharyngés actifs à la fois pendant l'inspiration et l'expiration (Merrill, 1974, Bieger and Hopkins, 1987). D'autre part cette région renferme le noyau paraambigu contenant des neurones pré-moteurs bulbo-spinaux projetant sur les motoneurones spinaux qui innervent les muscles respiratoires thoraciques, ainsi que des neurones propriobulbaires chargés de coordonner l'activité des muscles de la cage thoracique et la résistance des voies aériennes supérieures. Les noyaux ambigu et para-ambigu apparaissent donc essentiels pour générer et synchroniser la commande des muscles des voies aériennes supérieures (Bianchi, 1971, Ellenberger and Feldman, 1990, Dobbins and Feldman, 1994, Bianchi et al., 1995, Bellingham, 1998).

La région rostrale (VRGr) s'étend de l'extrémité rostrale du NTS jusqu'à l'extrémité caudale du noyau facial (Figure 3). Cette région renferme d'une part le noyau rétro-facial correspondant à la portion rostrale du noyau ambigu, qui contient un ensemble de motoneurones pharyngés aux décharges inspiratoires et expiratoires (Bianchi et al., 1988). D'autre part cette région renferme le complexe de Bötzinger, composé de neurones expiratoires proprio-bulbaires projetant notamment vers le NTS ventrolatéral (Fedorko and Merrill, 1984, Jiang and Lipski, 1990, Ezure et al., 2003). Enfin situé juste caudalement au complexe de Bötzinger, le VRGr contient une structure clé de la rythmogénèse, le complexe de pré-Bötzinger (préBotz, structure qui fera l'objet de la sous-partie III.2.2.1).



## Figure 3 : Représentation schématique de la localisation des structures bulbaires et pontiques participant à la CCR.

A gauche vue sagittale, à droite vue dorsale; mPB : noyau parabrachial médian ; K-F : noyau de Kölliker-Fuse ; VII : noyau facial ; RTN/pFRG : noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial ; BötC : complexe de Bötzinger ; NA : noyau ambigu ; preBötC : complexe de pré-Bötzinger ; NTSvI : subdivision ventrolatérale du noyau du tractus solitaire ; rVRG : région rostrale du groupe respiratoire ventral ; cVRG : région caudal du groupe respiratoire ventral ; VRC : groupe respiratoire ventral ; DRG : groupe respiratoire dorsal. *D'après Lindsay et al 2012* 

### III.2.1.2- Le groupe respiratoire dorsal

Le groupe respiratoire dorsal (ou dorsal respiratory group, DRG) est une structure bilatérale qui s'étend dans la partie dorso-médiane du bulbe rachidien. Il correspond à la subdivision ventrolatérale du NTS (vINTS) et a été décrit initialement chez le chat par Bianchi (Bianchi, 1971). Les neurones qui le composent sont principalement bulbo-spinaux en majorité inspiratoires et projettent ipsilatéralement sur les motoneurones spinaux laryngés et controlatéralement sur les motoneurones phréniques (Bianchi, 1971, von Euler et al., 1973, Berger, 1977). Des neurones proprio-bulbaires y ont également été décrits, ils envoient des afférences vers le bulbe ventrolatéral aux structures vraisemblablement impliquées dans la rythmogénèse respiratoire (Norgren, 1978, Ross et al., 1985, Otake et al., 1989). Chez le rat, l'existence du DRG reste controversée. Des auteurs ont pu mettre en évidence des activités respiratoires en réalisant des enregistrements extracellulaires (Saether et al., 1987, De Castro et al., 1994, Takeda and Matsumoto, 1997), mais aucune activité respiratoire n'a pu être obtenue par des enregistrements intracellulaires (Zheng et al., 1991), suggérant que les activités recueillies en extracellulaire proviendraient d'axones et non de corps cellulaires. D'autre part, il a été montré in vitro, sur des préparations de système nerveux central (SNC) isolé de rats nouveau-nés, que la lésion de la région supposée comme étant le DRG n'a aucun effet sur la CCR (Hilaire et al., 1990). Cependant, sur la base de critères électrophysiologiques selon lesquels une application d'acide DL-homocystéique (un acide aminé non protéinogène) a un effet excitateur sur la région soma dendritique, et aucun effet sur les axones, une étude a réalisée des enregistrements extracellulaires en s'assurant qu'ils étaient issues de corps cellulaires et ont enregistré des activités respiratoires au niveau du vINTS (De Castro et al., 1994). Si cette étude semblait confirmer l'existence d'un DRG chez le rat, il semble que la proportion de neurones bulbo-spinaux à destinée phrénique soit faible, voire nulle (Onai et al., 1987, Saether et al., 1987, Tian and Duffin, 1998). Plus récemment, par l'intermédiaire de techniques d'imageries par fluorescence voltage-sensible, des neurones ayant une activité inspiratoire ont été détectés chez le rat nouveau-né dans la région du DRG (Onimaru and Homma, 2005) supportant l'hypothèse de l'existence d'un DRG chez le rat, du moins chez le nouveau-né.

#### *III.2.1.3- Le groupe respiratoire pontique*

Marckwald en 1887 est le premier à avoir présumé du rôle du pont dans la fonction respiratoire en réalisant des expériences de transsection. Ensuite des études de stimulation électrique ont montré que des zones pontiques avaient une influence sur les transitions entre les phases respiratoires (Cohen, 1979). Feldman dénommera cette zone le groupe respiratoire pontique (ou pontine respiratory group, PRG) (Feldman, 1986). Le PRG regroupe le noyau parabrachial médian (mPB) et le noyau de Kölliker-Fuse (KF) tous deux situés dans la partie dorsolatérale du pont (Bianchi et al., 1995). Des enregistrements unitaires réalisés sur ces neurones ont montré qu'ils déchargent de façon tonique avec une fréquence accrue pendant l'inspiration, l'expiration ou pendant la transition entre l'inspiration et l'expiration (Bertrand and Hugelin, 1971, Cohen, 1979, Dick et al., 1994). De façon générale, la stimulation électrique ou chimique du mPB facilite l'inspiration (Cohen, 1979, Chamberlin and Saper, 1994, Lara et al., 1994). Décrit chez le chat, le rat et la souris, le PRG entretient une relation privilégiée avec les autres acteurs de la CCR (Gaytan et al., 1997, Gang et al., 1998, Gaytan et al., 2002). En effet des connexions ont été décrites entre le PRG et différentes structures bulbaires : le NTS, les noyaux des raphés, la surface ventrale du bulbe rachidien (Loewy and Burton, 1978, Ricardo and Koh, 1978, Loewy et al., 1981, Gang et al., 1991). Par ailleurs, le PRG est connecté avec une structure pontique (A5) et des structures diencéphaliques (noyaux paraventriculaires et noyau dorsomédian de l'hypothalamus) (Saper et al., 1976, Vibert et al., 1979, Moga et al., 1990, Bester et al., 1997, Dawid-Milner et al., 2003). Les données fonctionnelles collectées sur le PRG suggèrent qu'il influencerait la terminaison de l'inspiration, la durée des différentes phases du cycle respiratoire et qu'il constituerait un relais entre les structures supra-pontiques et les structures respiratoires bulbaires (Saper et al., 1976, Vibert et al., 1979, Moga et al., 1990, Oku and Dick, 1992, Dick et al., 1994, Bianchi et al., 1995, Bester et al., 1997). Pour autant, bien que son rôle paraisse essentiel sa présence ne semble pas indispensable à la rythmogenèse, dans la mesure où il a été mis en évidence en réalisant des enregistrements sur des tranches de bulbe rachidien isolées qu'un rythme respiratoire est conservé malgré l'absence du PRG (Smith et al., 1991, Gray et al., 1999, Lieske et al., 2000).

#### III.2.2- Les générateurs du rythme respiratoire

III.2.2.1- Le complexe de pré-Bötzinger : le générateur de l'inspiration

#### <u>Découverte</u>

Mis en évidence en 1991 par Smith et collaborateurs le préBotz est localisé dans la formation réticulée bulbaire du VRGr, ventro-latéralement au noyau ambigu (Smith et al., 1991). Il est composé en grande majorité de neurones proprio-bulbaires et de quelques neurones bulbo-spinaux et formerait un des générateurs centraux du rythme respiratoire : le générateur de l'inspiration (les deux autres générateurs du rythme respiratoire le noyau retrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial et le postinspiratory complexe, respectivement générateur de l'expiration et de la post-inspiration feront tous deux l'objet d'une sous partie dans ce chapitre : III.2.2.2- Le groupe respiratoire para-facial, le générateur de l'expiration III.2.2.- Le générateur de la post-inspiration). L'étude princeps publiée dans Science en 1991 par Smith et collaborateurs a utilisé la technique mise au point par Suzue en 1984, qui a montré que l'activité électrophysiologique enregistrée sur des préparations de SNC isolé contenant le bulbe rachidien et le pont pouvait être interprétée comme le reflet de la CCR (Suzue, 1984). Ainsi, l'étude avait pour but de déterminer la ou les structures responsables de la persistance de l'activité rythmique respiratoire ex vivo. Pour cela, ils ont réalisé des enregistrements extra et intracellulaires sur des préparations de tronc cérébral isolé de rat nouveau-né sur lesquels ils ont effectué des sections étagées ainsi que sur des tranches de bulbe rachidien et ont montré qu'une région limitée du bulbe ventrolatéral contenait des neurones essentiels pour la rythmogénèse (Figure 4). De fait, une activité rythmique respiratoire a été enregistrée et préservée, tant que les sections transverses du tronc cérébral étaient effectuées rostralement au préBotz puis a été abolie par le seul retrait de cette région. Ensuite, afin d'être en mesure d'établir si cette région isolée pouvaient générer un rythme respiratoire, les auteurs ont réalisé des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches transversales de bulbe rachidien contenant l'intégralité du préBotz, ainsi que les motoneurones de hypoglosse. Il est apparu, en enregistrant l'activité transitant par les axones des motoneurones de l'hypoglosse, que la tranche de bulbe rachidien générait un rythme, et que ce rythme coïncidait avec celui enregistré sur les neurones localisés au niveau du préBotz. La fréquence et la durée des décharges de ces neurones étant synchrones à celles enregistrées sur les préparations ex vivo de tronc cérébral, les auteurs ont assimilé l'activité des neurones du préBotz à un reflet de l'activité respiratoire. Par ailleurs, des expériences de perturbations locales de l'excitabilité neuronale ont été réalisées et ont montré que ces neurones possèdent des propriétés oscillatoires voltage-dépendantes et donc de pacemakers conditionnels (Pena et al., 2004, Del Negro et al., 2005). Le terme de pacemaker conditionnel provient du fait que le déclenchement de leur activité autorythmique, implique l'existence d'entrées excitatrices toniques pour induire une légère dépolarisation qui pourra alors se traduire en une slave de potentiels d'action (PA). Par la suite, des expériences ont mis en évidence, chez le rat adulte et nouveau-né et le chat adulte, que la perturbation de la fonction neuronale des neurones du préBotz entrainait une altération profonde voir un arrêt de la CCR, des résultats

compatibles avec l'hypothèse que cette région contiendrait les neurones responsables de la génération du rythme respiratoire (Feldman and Smith, 1989, Hsieh et al., 1998, Ramirez et al., 1998, Koshiya and Smith, 1999, Monnier et al., 2003). La mise en perspective de ces données avec le fait que cette activité rythmique indépendante de toute stimulation périphérique, centrale ou chimique peut être maintenue sur des préparations encore plus réduites d'isolats (Johnson et al., 2001) lui vaut la réputation d'être l'oscillateur de l'activité rythmique respiratoire.



## Figure 4 : Découverte du préBotz la structure indispensable à la rythmogénèse respiratoire.

A gauche : représentation schématique sagittale du tronc cérébral illustrant la position du préBotz et des structures adjacentes. Le rectangle hachuré indique la région nécessaire à la rythmogénèse. Le préBotz s'étend depuis la face caudale du noyau rétro-facial (RFN) jusqu'à environ 200 μm de l'obex. Des sections transversales successives sont effectuées aux positions indiquées par les lignes verticales numérotées au-dessus du schéma. A droite : graphique illustrant les variations de la fréquence de décharge de la racine cervicale centrale C4, dont l'activité est enregistrée sur une préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolé, lors des expériences de sections du tronc cérébral réalisées dans le sens rostro-caudal et séparées de 75 µm (1 vers 11 sur l'image de gauche). Les sections au niveau du préBotz (section 8 à 10) éliminent l'activité rythmique, démontrant le caractère nécessaire de structures présentes dans l'épaisseur de cette tranche. Abréviations SO : olives supérieures ; 7 : noyau moteur facial; LRN : noyau latéral réticulé; RFN : noyau retro-facial; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral; cNA : division caudale (semi-compacte) du noyau ambigu. B : illustration de l'enregistrement réalisée sur une tranche transversale de 500 µm d'épaisseur contenant le préBotz positionné ventralement au noyau ambigu (NA), ainsi que les motoneurones (XII) et les racines motrices des motoneurones (XIIN) du XII. L'enregistrement de ces dernières par des électrodes de succion révèle la persistance d'une activité rythmique motrice spontanée, entretenue, et bilatéralement synchronisée (droite, deux traces du bas). La présence au sein du préBotz de neurones dont l'activité est en phase avec celles des sorties motrices est détectée par la technique du patch-clamp (droite, tracé du haut). Ces neurones respiratoires seraient la source de l'activité rythmique. Abréviations : 5SP : spinal trigeminal noyau LRN : noyau réticulaire latéral. *D'après Smith et al 1991* 

#### Marqueurs phénotypiques et propriétés anatomo-fonctionnelles

Une fois que c'était dégagé un consensus selon lequel les neurones constituant le préBotz étaient essentiel à la rythmogenèse respiratoire, de nombreuses équipes se sont intéressées à comprendre son fonctionnement et à le caractériser neurochimiquement. Tout d'abord des expériences réalisées avec des traceurs trans-synaptiques ou des vecteurs viraux ont montré que le préBotz était très pauvre en neurones bulbo-spinaux et était composé essentiellement de neurones proprio-bulbaires (Ellenberger and Feldman, 1990, Smith et al., 1991, Dobbins and Feldman, 1994, Gaytan et al., 2002). Les expériences effectuées par Connelly et collaborateurs ont montré que l'on retrouve au sein du préBotz, différentes classes de neurones respiratoires tels que décrits plus haut à savoir une majorité de neurones inspiratoires précoces à activité décroissante et tardifs à activité croissante, mais aussi des pré-inspiratoires, expiratoires croissants et quelques neurones post-inspiratoires (Connelly et al., 1992, Wang et al., 2001a). La réalisation d'enregistrements extracellulaires des neurones du préBotz sur des tranches de bulbe rachidien de rat nouveau-né a montré que parmi les neurones inspiratoires certains conservent une activité rythmique qui persiste en l'absence de la transmission synaptique (Johnson et al., 1994). De nombreuses études convergent vers un rôle crucial du neurotransmetteur glutamate dans ce phénomène. En effet, l'activité du générateur disparaît après application d'antagonistes des récepteurs au glutamate activés par le alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA) et le Kaïnate (Feldman and Smith, 1989, Onimaru et al., 1989, Funk et al., 1995). De plus, les animaux chez qui la libération de glutamate est génétiquement invalidée présentent une absence d'activité rythmique au sein du préBotz et meurent à la naissance soulignant le rôle essentiel de la neurotransmission glutamatergique (Wallen-Mackenzie et al., 2006). Ces observations corroborées par d'autres approches soutiennent l'hypothèse selon laquelle le rythme respiratoire serait généré par les neurones du préBotz qui présentent la propriété d'être des pacemakers conditionnels (Smith et al., 1991, Johnson et al., 1994, Koshiya and Smith, 1999). Cette propriété, dépendante de la signalisation glutamatergique, serait le reflet des conductances ioniques et de leurs changements de potentiel d'équilibre. La communauté scientifique s'est donc appliquée à identifier les conductances membranaires conférant à certains neurones leurs propriétés pacemakers ce qui a permis de faire des grandes avancées dans la compréhension des mécanismes. Il a notamment été démontré l'importance des courants entrants sodiques persistants (I<sub>NaP</sub>) et du courant cationique non sélectif activé par le calcium (ou calcium activated non selective cation current I<sub>CAN</sub>) (Del Negro et al., 2002, Pena et al., 2004, Del Negro et al., 2005).

Les courants  $I_{NaP}$  se caractérisent par leurs inactivations lentes. Ainsi après la dépolarisation initiale, la persistance de ce courant sodique maintient le potentiel de membrane dans un état dépolarisé. En résulte que le neurone reste dans un état hyperexcitable. Une autre caractéristique de ce courant est d'être bloquée de manière

sélective par de faible dose de riluzole, un benzothiazole. Il a été montré qu'une application de riluzole ne permettait pas d'abolir les propriétés pacemakers de tous les neurones du préBotz, et que certains continuaient à décharger (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001). Cela a conduit dans un second temps à l'identification d'un deuxième courant essentiel, le courant ICAN qui est lui bloqué par l'acide flufénamique. Ce courant n'est pas voltage dépendant et s'active en réponse à une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire pouvant résulter de l'activation des canaux calciques, principalement de type L ou de la libération des réserves calciques intracellulaires (Partridge et al., 1994). Une fois activé il entraine la dépolarisation du neurone, état qui une fois encore sera maintenu car ces canaux ne connaissent d'inactivation ni calcique ni voltage dépendante (Partridge et al., 1994). Sous la dépendance de l'un ou l'autre de ces courants, un neurone ainsi maintenu dans un état dépolarisé peut servir de support à une activité autorythmique. L'action combinée du riluzole et de l'acide flufénamique abolit l'activité rythmique de tous les neurones du préBotz. A noter que dans cette configuration l'ajout de substance P, permet de récupérer une activité rythmique (cf : III.2.3.2- Le modèle pacemaker) (Del Negro et al., 2005). Ainsi, même si un neurone peut abriter les deux types de courants, deux classes de neurones pacemarkers ont été définis au sein du préBotz (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001) : ceux (5-15%) qui dépendent préférentiellement d'un courant I<sub>NaP</sub> et ceux (7-10%) qui requièrent préférentiellement des courants ICAN (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001, Del Negro et al., 2002, Pena et al., 2004, Del Negro et al., 2005).

Bien qu'il n'existe pas de marqueur exclusif du préBotz les populations neuronales qui le composent, parfois chevauchantes (Figure 5), peuvent être caractérisées sur la base de l'expression de neurotransmetteur ou de neuromodulateurs et de récepteurs à différents neuromodulateurs respiratoires, sur lesquels reposent également les propriétés des neurones du préBotz.

Sera détaillé ici le récepteur NK1R à la substance P, le récepteur  $\mu$  aux opioïdes et la somatostatine, décrits dans la littérature comme étant des marqueurs au fort impact fonctionnel sur les neurones du préBotz.

La détection du récepteur NK1R à la substance P (SP) est couramment utilisée pour identifier les neurones du préBotz (Gray et al., 1999, Wang et al., 2001a, Schwarzacher et al., 2011). A l'exception des motoneurones du noyau ambigu, les structures immédiatement adjacentes en sont dépourvues (Nakaya et al., 1994, Wang et al., 2001a. A noter que la détection de la tyrosine hydroxylase (TH, une des enzymes de synthèse des cathécolamines) et de la choline acétyle transférase (ChAT une enzyme permettant la synthèse d'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel au fonctionnement des jonctions neuro-musculaires des muscles striés squelettiques) est nécessaire pour discriminer respectivement les neurones du préBotz des neurones adrénergiques C1 et des motoneurones du noyau ambigu (Schwarzacher et al., 2011). Le phénotype glutamatergique de ces neurones a été mis en évidence par l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (vGLUT2) (Stornetta et al., 2003). Très tôt l'effet d'une exposition au ligand endogène des récepteurs NK1R, la SP, sur l'activité respiratoire a été observé, cet effet est excitateur (Von Euler and Pernow, 1956) et induit une accélération de la fréquence respiratoire. Par la suite, des études *in vitro* ont montré que cet effet excitateur sur la CCR pouvait être imputé directement aux

neurones du préBotz ce qui a d'ailleurs été confirmé par des approches immunohistochimiques montrant que ces derniers expriment le récepteur NK1R (Chen et al., 1990a, Chen et al., 1990b, Johnson et al., 1996, Gray et al., 1999, Wang et al., 2001a). L'application de SP exogène entraîne une dépolarisation lente du potentiel membranaire de certains neurones inspiratoires du préBotz, qu'ils soient pacemakers ou non-pacemakers (Pena and Ramirez, 2004). L'effet excitateur de la SP étant préservé après blocage de toute transmission synaptique, l'activité de l'oscillateur serait donc sous-tendue par une modulation de l'excitabilité des neurones exprimant ce récepteur et notamment par l'activation de courants cationiques. Chez le rat adulte, la destruction quasi-totale des neurones du préBotz exprimant NK1R entraine une irrégularité importante du rythme respiratoire, un défaut de maintien des gaz du sang et du pH sanguin, sans pour autant induire un arrêt respiratoire (Gray et al., 2001, McKay et al., 2005). De plus l'invalidation génétique du récepteur n'entraîne pas de perturbation de la genèse de l'activité rythmique (Ptak et al., 2000, Ptak et al., 2002). Ainsi en dépit d'exercer un puissant rôle modulateur, la signalisation dépendante des récepteurs NK1R ne semble pas indispensable à la rythmogenèse proprement dite. Il faut également noter que tous les neurones inspiratoires n'expriment pas NK1R au sein du préBotz, ce marqueur n'identifierait donc qu'un contingent limité de neurones (Guyenet and Wang, 2001, Hayes and Del Negro, 2007).

Les neurones responsables de l'initiation du rythme dans le préBotz sont caractérisés en plus de l'expression de NK1R, par leur co-expression des récepteurs opioïdes  $\mu$  (Gray et al., 1999, Guyenet and Wang, 2001, Feldman et al., 2003), dont les ligands endogènes sont regroupés sous l'appellation d'enképhalines. Une exposition aux agonistes de ces récepteurs, couramment utilisés en clinique comme analgésiques, entraine une forte dépression de l'activité respiratoire. Un lien a notamment été établi entre des taux anormalement élevés d'opioïdes endogènes au niveau du SNC de nouveau-nés et l'incidence de désordre respiratoire à la naissance, incluant la mort subite du nourrisson (Coquerel et al., 1992). Ex vivo il a été mis en évidence qu'une exposition à un agoniste des récepteurs aux opioïdes µ  $(\mu OR)$  induisait une forte diminution de la fréquence de décharge en C4. In vivo, une administration en intrapéritonéale de ce même agoniste résulte en une diminution de la fréquence respiratoire et de l'amplitude (Greer et al., 1995). Des études in vitro ont montré que cet effet pouvait être imputable aux neurones du préBotz directement sensibles à ces mêmes agonistes opiacés en particulier à ceux présentant une forte affinité pour les µOR (Greer et al., 1995, Gray et al., 1999). Cet effet peut être modéré voire reversé par l'administration de naloxone, un antagoniste des récepteurs µ (Greer et al., 1995). A l'échelle cellulaire, l'activation des µOR entraînerait vraisemblablement l'ouverture de canaux potassiques qui résulterait en une hyperpolarisation du potentiel membranaire (Gray et al., 1999), à savoir donc l'inverse de ce qu'induit une activation du récepteur NK1R. Le fait que les neurones pacemakers du préBotz soient NK1R+/µOR+, et donc sujet à des effets opposés tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle du réseau neuronal, semble être d'une importance capitale pour être en mesure de moduler l'activité du réseau en modulant la genèse de l'activité rythmique et en contrôlant la fréquence des décharges.

La présence du neuropeptide somatostatine (SST) et de l'ARNm de son précurseur la prépro-somatostatine, a été décrite au niveau du VRG (Johansson et al., 1984, Kiyama and

Emson, 1990). Dès lors que des études ont montré qu'une administration de SST au niveau du VRG inhibait les neurones respiratoires, le rôle de ce neuropeptide dans le contrôle de la CCR a été soupçonné. Depuis l'étude de Stornetta et collaborateurs en 2003 a fait date en mettant en évidence chez le rat adulte notamment *via* des approches d'immunohistochimies et d'hybridation *in situ* que parmi les neurones glutamatergiques NK1R+, un contingent de neurones expriment la SST (Stornetta et al., 2003). Par la suite le rôle fonctionnel de ces neurones a été mis en évidence dans un travail de l'équipe de Feldman. Des rats adultes ont été inoculés avec un vecteur destiné à induire, sous le contrôle du promoteur de la somatostatine, l'expression du récepteur à l'allatostatine. Le récepteur en question est un canal potassique qui sous l'action de son ligand s'ouvre et entraîne l'hyperpolarisation du neurone infecté. Ainsi cet article montre *in vivo* que le fait de mettre au silence les neurones SST+ entraine un arrêt de toute activité respiratoire, suggérant un rôle clé de ces neurones (Figure 5) (Tan et al., 2008).

С



## Figure 5 : Les neurones SST+ définissent un sous-groupe des neurones NK1R+ du préBotz.

Un vecteur permettant l'expression de la protéine fluorescente verte (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) sous le contrôle du promoteur de la somatostatine (SST) est injecté dans le préBotz de rats adultes. (A). L'expression de l'EGFP (vert) reproduit fidèlement l'expression de SST révélée par immunohistochimie (rouge). (B). Certains neurones EGFP+ (en vert), donc exprimant SST, représentent un sous-groupe de neurones NK1R+ (rouge). La barre d'échelle représente 50  $\mu$ m. (C) L'administration d'allatostatine (courbe  $\Delta$ ) sur des animaux anesthésiés induit une diminution progressive de la fréquence respiratoire jusqu'à l'apnée complète nécessitant une ventilation artificielle (Vent). *D'après Tan et al 2008* 

D'autres marqueurs plus ou moins discriminants sont également décrits comme étant présents dans les neurones du préBotz, c'est le cas du récepteur progesterone receptor membrane component 1 et de la glycoprotéine Reelin (Tan et al., 2012) qui aurait un rôle dans la médiation de la réponse à l'hypoxie, les récepteurs à la neurotrophine, le récepteur tropomyosine kinase B au Brain-Derived Neurotrophic Factor (Thoby-Brisson et al., 2003), les récepteurs à l'adénosine triphosphate et à ses métabolites (Huxtable et al., 2009), ainsi que la Thyrotropin-releasing hormone TRH (Rekling et al., 1996).

#### <u>Découverte</u>

La première étude quant à l'existence de neurones pré-inspiratoires au niveau de la surface ventrolatérale du bulbe rachidien rostral, a été publiée dans Brain Research par Onimaru et Homma en 1987 (Onimaru and Homma, 1987). En travaillant sur une préparation ex vivo de SNC isolé de rat nouveau-né contenant le pont et le bulbe rachidien, ils ont identifié des neurones qui présentaient un pattern de décharge précédant l'activité inspiratoire enregistrée en C4 et ont qualifié cette activité de pré-inspiratoire. Pour cela ils ont confronté le pattern de décharge enregistré au niveau de la racine C4 avec celui enregistré en extracellulaire grâce à une électrode insérée (de 50 à 300 µm de profondeur) d'un côté ou de l'autre de la surface ventrolatérale du bulbe rachidien rostral. Suite à cette première étude, une deuxième vient s'ajouter peu de temps après pour compléter et confirmer ce qui avait été observé dans l'article princeps. Ainsi bien que ces neurones ne soient pas à cette époque référencés sous l'appellation qu'on leur attribue aujourd'hui, ils ont été décrits comme étant localisés à la surface du bulbe rostral ventrolatéral légèrement médian à la partie caudale du noyau facial près de la surface ventrale (Onimaru et al., 1987). Les expériences de stimulation et de destruction électrolytiques réalisées ont apporté de nouveaux arguments en faveur de l'existence de neurones qui s'activent avant la décharge inspiratoire. Un nom : le groupe respiratoire parafacial (pFRG) sera attribué à la structure qui contient ces neurones en 2003 dans un article publié par les mêmes auteurs qui ont une fois encore travaillé sur des préparation ex vivo de SNC isolé de rat nouveau-né (Onimaru and Homma, 2003). Dans cet article, devenu l'article de référence, une élégante approche utilisant un indicateur fluorescent sensible au voltage membranaire, a permis de mettre en évidence l'activation d'une population de neurones en position para-faciale qui précède d'environ 200 ms la décharge de la racine C4 et l'activité des neurones du préBotz (Figure 6). Cette étude a mis en évidence le rôle fonctionnel de cette structure dont la lésion partielle et bilatérale perturbe la rythmogénèse respiratoire en diminuant significativement la fréquence des décharges inspiratoires. Des expériences de patch-clamp ont montré que ces neurones pré-inspiratoires, au même titre que les neurones du préBotz, possèdent des propriétés de pacemakers dès lors qu'ils ont la capacité intrinsèque de générer des salves de PA et qu'environ 50% d'entre eux conservent cette propriété après le blocage de la transmission synaptique (Onimaru et al., 1989, 1995).



## Figure 6 : Activation spatio-temporelle des neurones du groupe respiratoire parafacial et du préBotz.

Observations faites à l'aide d'un indicateur sensible au voltage membranaire sur une préparation de tronc cérébral isolé. Les photographies représentent la surface ventrale de la partie gauche du tronc cérébrale, située entre la sortie du nerf facial et la première racine cervicale. Chaque image est prise à un temps précis, indiqué en bas à droite par la barre verticale rouge, par rapport à la décharge de la racine C4 (illustrée sous forme intégrée). Les signaux optiques reflétant l'activité des neurones apparaissent en premier lieu au niveau de la partie ventrolatérale du tronc cérébral, à la limite entre le pont et le bulbe. Cette région correspond au groupe respiratoire parafacial. Cette activité, qualifiée de pré-inspiratoire, survient environ 200 ms avant la décharge du préBotz synchrone de l'activité enregistrée en C4 observée plus caudalement. Barre verticale rouge : moment auquel a été pris la photographie, barre horizontale bleue : représentation de la phase inspiratoire. *D'après Onimaru and Homma, 2003* 

Des études ont ensuite émis l'hypothèse que le couplage fonctionnel de ces deux structures est indispensable à la rythmogénèse et *de facto* évincent l'idée selon laquelle le préBotz participe de façon exclusive à la rythmogénèse respiratoire (Feldman et al., 2003, Mellen et al., 2003, Janczewski and Feldman, 2006, Pagliardini et al., 2011). En effet à partir des constatations effectuées les travaux de Mellen et collaborateurs ont abouti au concept selon lequel le pFRG fait figure de second générateur, tenant un rôle essentiel dans l'initiation de la décharge inspiratoire, notamment en participant à l'entraînement du préBotz du moins pendant la période périnatale et dans l'organisation temporelle du cycle respiratoire (Mellen et al., 2003). Un argument en faveur de cette hypothèse est l'étude publiée en 2003 (Mellen et al., 2003) qui a mis en évidence pharmacologiquement un couplage entre les neurones du pFRG et du préBotz. Cette étude se base sur le fait que les neurones du pFRG n'expriment pas les récepteurs  $\mu$  aux opioïdes et donc que contrairement aux neurones du préBotz ces neurones sont insensibles aux opioïdes (Gray et al., 2001, Takeda et al., 2001). En exposant une préparation *ex vivo* de tronc cérébral isolé, au DAMGO (agoniste des  $\mu$ OR), les auteurs pouvaient s'attendre à observer le même phénomène que quand ils exposent une tranche

transversale contenant uniquement le préBotz, à savoir un ralentissement continu et linéaire de la fréquence des décharges. Or ils ont observé une diminution non continue mais graduelle de la fréquence des décharges, dans le sens où la période séparant deux décharges successives augmentait par paliers correspondants à des multiples de la période initiale (avant le traitement pharmacologique). Ce phénomène, qualifié de « *quantal slowing* » suggère que ni le préBotz ni le pFRG n'est responsable à lui seul de la rythmogénèse respiratoire, mais que cette dernière dépendrait vraisemblablement d'un couplage entre les deux.

L'équipe de Feldman a montré en 2002 chez le rat nouveau-né *in vivo* qu'après une administration d'opioïdes les muscles abdominaux sollicités en cas d'expiration forcée chez l'Homme continuent à se contracter à une fréquence similaire à celle observée avant l'administration alors que les mouvements inspiratoires sont eux abolis (Janczewski et al., 2002). En travaillant sur des préparations *ex vivo* il a ensuite été mis en évidence que les décharges enregistrées sur la première racine lombaire L1 (qui innerve les muscles abdominaux transverses et obliques externes et internes (Fregosi et al., 1992, (Janczewski et al., 2002) était composées de deux salves distinctes encadrant l'activité enregistrée sur C4. Et que l'activité enregistré en L1 persiste en cas d'application d'un agoniste du µOR alors que l'activité en C4 est abolie.



# Figure 7 : L'activité enregistrée d'un neurone pré-inspiratoire localisé à la surface ventrolatérale du bulbe rostral ainsi que des activités enregistrées en C4 et en L1.

Tracé de l'activité enregistrée sur un neurone pré-inspiratoire qui projette vers des neurones bulbospinaux caudal à l'obex au voisinage du noyau rétro-ambigu ainsi que des activités enregistrées simultanément sur C4 et L1. *D'après Janczewski et al., 2002* 

Les auteurs ont montré en réalisant des stimulations électriques au niveau des axones des motoneurones de la racine L1 que des neurones bulbospinaux caudaux à l'obex localisés au voisinage du noyau rétro-ambigu étaient antidromiquement activés. Ils ont ensuite établi en appliquant des stimulations électriques au niveau de ces neurones bulbospinaux caudaux à l'obex d'une part que des neurones pré-inspiratoires localisés à la surface ventrolatérale du bulbe rostral (vraisemblablement les neurones du RTN/pFRG) étaient antidromiquement

activés et d'autre part que cela induisait une activation orthodromique des motoneurones L1. Enfin les auteurs ont montré en enregistrant l'activité des neurones pré-inspiratoires que le pattern de décharges de ces derniers est en phase avec celle enregistrée simultanément en L1, suggérant que l'activité enregistrée en L1 est au moins en partie le reflet de l'activité des neurones pré-inspiratoires (Figure 7).

Par la suite, des expériences entreprises par Janczewski et Feldman visaient à tester l'hypothèse selon laquelle l'inspiration et l'expiration sont générées par deux générateurs de rythme couplés mais anatomiquement distincts respectivement le préBotz et le RTN/pFRG. Ainsi les expériences entreprises sur le rat juvénile décérébré visaient à évaluer l'effet d'un découplage de l'activité motrice expiratoire et inspiratoire sur la ventilation in vivo (Janczewski and Feldman, 2006). Pour cela ils ont engagé des procédures expérimentales visant à perturber différentiellement l'inspiration et l'expiration (i) en administrant un agoniste opiacé, le fentanyl qui déprime largement l'activité inspiratoire et faiblement l'activité expiratoire et (ii) en déclenchant le réflexe de Hering-Breuer via une augmentation artificielle du volume pulmonaire qui favorise l'activité expiratoire et diminue l'activité inspiratoire. Ces approches ont permis de montrer que l'administration de fentanyl entrainait une forte réduction de la fréquence de contraction du génioglosse (témoin de l'activité inspiratoire) sans modifier la fréquence de contraction d'un muscle abdominal (témoin de l'activité expiratoire). La deuxième approche a elle montré, que l'inflation du volume pulmonaire induit une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des contractions des muscles expiratoires et abolit les contractions inspiratoires. Enfin, cet article montre qu'une transsection caudale au noyau facial, entraîne la disparition des décharges expiratoires tout en préservant l'activité inspiratoire. Enfin des investigations ont montré chez des rats anesthésiés adultes qu'une levée d'inhibition pharmacologique du RTN/pFRG par injection de bicuculline et de strychnine (respectivement des antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycinergique) et par optogénétique induit une expiration active. Des résultats cohérents avec l'hypothèse des auteurs que le RTN/pFRG contient des neurones jouant le rôle d'oscillateur conditionnel qui entraîne une activité motrice expiratoire, même à l'âge adulte (Pagliardini et al., 2011). Étant donné que chez l'Homme l'expiration active est seulement présente dans certains états ces résultats suggèrent que le RTN/pFRG est activé dans des situations où l'expiration active est nécessaire permettant d'augmenter efficacement la ventilation, comme cela se produit au cours de l'exercice (Pagliardini et al., 2011).

Le rôle et l'importance du RTN/pFRG, sujet controversé, fait l'objet de nombreux débats au sein de la communauté scientifique, notamment quant à son importance fonctionnelle en tant que générateur chez l'Homme adulte.

Pour conclure cette partie il est important de noter que des auteurs avancent l'idée selon laquelle tant d'un point de vue biochimique qu'anatomique le pFRG ne peut être distingué du noyau retrotrapézoïde (RTN) (Onimaru and Homma, 2003, Weston et al., 2004, Guyenet et al., 2005a, Onimaru et al., 2008), ou encore que le pFRG du nouveau-né correspondrait chez l'adulte au RTN (Smith et al., 1989, Cream et al., 2002, Feldman et al., 2003, Guyenet et al., 2005a). Le RTN est une structure neuronale impliquée dans la chémosensibilité centrale au  $CO_2/H^+$  dont la contribution dans le fonctionnement du pFRG comme structure rythmogénique est loin d'être négligeable et fera l'objet d'une sous-partie dans le chapitre II (Bodineau et al., 2000a, Nattie et al., 2001, Mulkey et al., 2004, Guyenet et al., 2008). Ainsi l'appellation de RTN/pFRG a été et sera utilisée dans le reste de ce travail de thèse car elle permet d'englober et de définir des structures identiques ou chevauchantes qui possèdent des caractéristiques fonctionnelles propres à des âges différents.

### <u>Marqueurs</u>

Comme dit précédemment les neurones du RTN/pFRG n'expriment pas le  $\mu$ OR, ils sont en revanche caractérisés tout comme les neurones du préBotz par l'expression de NK1R et de vGLUT2 (Nattie and Li, 2002b, Mulkey et al., 2004, Weston et al., 2004, Dubreuil et al., 2008, Onimaru et al., 2008, Thoby-Brisson et al., 2009, Guyenet and Mulkey, 2010). Parmi ces neurones le contingent qui semble être d'une importance capitale, car impliqué dans la rythmogénèse et dans la chémoréception centrale au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>, sont les neurones positifs pour la protéine PHOX2B (Stornetta et al., 2006, Dubreuil et al., 2008, Onimaru et al., 2008, Dubreuil et al., 2009b, Goridis and Brunet, 2010, Guyenet and Mulkey, 2010). PHOX2B est le produit de l'expression du gène homéotique *PHOX2B* codant un facteur de transcription essentiel au développement du système nerveux végétatif central et périphérique (Pattyn et al., 1997, Amiel et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2003). Ce gène revêt un intérêt tout particulier dans ce travail de thèse dans le sens où sa mutation conduit au syndrome d'hypoventilation alvéolaire central congénital dont il sera question dans le chapitre III.

Par ailleurs la présence du neuropeptide galanine et l'expression de ATOH1 (gène intervenant dans la mise en place du RTN/pFRG) sont également utilisés comme des marqueurs de cette structure (Dubreuil et al., 2009a, Stornetta et al., 2009). Enfin on notera que comme les neurones du préBotz ces neurones sont négatifs pour la TH (Stornetta et al., 2006, Onimaru et al., 2008).

### III.2.2.3- Le générateur de la post-inspiration

Récemment un nouveau générateur a été décrit. Les auteurs à l'origine de la découverte l'ont baptisé PiCo pour postinspiratory complex (Anderson et al., 2016, Anderson and Ramirez, 2017). En effet dans l'article publié en août 2016 les auteurs décrivent une structure neuronale caractérisée neurochimiquement comme cholinergique et glutamatergique qui génère une slave de PA juste après l'activité inspiratoire (enregistrée au niveau des neurones du préBotz). Des neurones actifs pendant la phase post-inspiratoire ont déjà été décrits au niveau du complexe de Bötzinger qui contient des neurones inhibiteurs qui contribueraient à la terminaison de l'inspiration (Smith et al., 2009), cependant la source d'activité excitatrice n'était pas encore caractérisée (Fedorko and Merrill, 1984, Jiang and Lipski, 1990, Ezure et al., 2003). La structure PiCo est localisée dorsalement par rapport au préBotz, elle est caudale au noyau facial et dorsomédiane par rapport au noyau ambigu (Figure 8).

Les auteurs ont travaillé sur une tranche horizontale contenant la partie ventrale du bulbe rachidien et de la moelle épinière jusqu'à la racine C4. Ces tranches qui incluent le VGR

ont été utilisées pour enregistrer en simultané l'activité des neurones du préBotz et celle des neurones de PiCo. La décharge des neurones de PiCo est qualifiée de post-inspiratoire dès lors qu'elle intervient immédiatement après mais jamais pendant la décharge des neurones du préBotz (Figure 9). Les salves de PA enregistrées spontanément arrivent en moyenne 1 fois tous les 12 salves inspiratoires. Cette activité post-inspiratoire diminuée peut s'expliquer par le fait que les structures pontiques catécholaminergiques sont absentes de la tranche sur laquelle les auteurs réalisent leurs expériences. En effet l'activité post-inspiratoire est extrêmement sensible à une application de noradrénaline auquel cas l'activité post-inspiratoire des neurones du préBotz.



Figure 8 : Schéma représentant la tranche horizontale du tronc cérébral en vue sagittale

Les lignes pointillées représentent les limites approximatives de la tranche horizontale. La tranche conserve une partie de l'olive supérieure (SO), l'ensemble du noyau retrotrapézoïde / groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG), le noyau facial (VII N), le complexe Bötzinger (BötC), le complexe post-inspiratoire (PiCo), le noyau ambigu (NA), le complexe de pré-Bötzinger (preBötC), le noyau latéral réticulaire (LRT) et les régions caudale et rostrale du groupe respiratoire ventral (rVRG et CVRG, respectivement). La tranche conserve également une partie de la moelle épinière et comprend une partie du noyau moteur phrénique (segments cervicaux environ 3 et 4). La tranche ne contient pas la partie dorsale de la moelle épinière comprenant le groupe respiratoire dorsal (DRG). Dorsal (D), ventral (V) rostral (R), caudal (C). *D'après Anderson et al., 2016* 

En utilisant ce modèle les auteurs ont montré que l'inhibition des neurones du PiCo suite à l'activation du préBotz n'est pas supprimé par ajout de strychnine (antagoniste des récepteurs glycinergiques) mais qu'en présence de gabazine (antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub>) les décharges de ces neurones augmentent en même temps qu'elles se synchronisent avec celles des neurones du préBotz suggérant que l'activité des neurones de PiCo est modulée mais pas générée par des mécanismes dits inhibiteurs. Par ailleurs les auteurs ont montré que l'activité de ces neurones est abolie en présence de CNQX (antagoniste des récepteurs non-NMDA) ce qui sous-entend un rôle essentiel de la signalisation glutamatergique dans la génération de ces salves de PA, au même titre que pour les neurones du préBotz (Wallen-Mackenzie et al., 2006). De plus comme le préBotz les neurones PiCo possèdent le  $\mu$ OR, leur activité est en effet inhibée par une application de DAMGO. Une exposition de ces neurones à la SST conduit à une forte inhibition de leur activité, des résultats en accord avec les effets inhibiteur de la SST sur l'activité post-inspiratoire *in vivo* (Burke et al., 2010).
Ensuite des expériences d'optogénétiques ont permis de montrer que l'activation de ces neurones, sur des tranches horizontales entraîne la génération d'une activité postinspiratoire sans évoquer de décharges inspiratoires. La stimulation par optogénétique *in vivo*, entraîne également la génération d'une activité post-inspiratoire enregistrée au niveau du nerf vague. Au cours de ces expériences les auteurs ont remarqué que l'induction d'une décharge post-inspiratoire conduisait à retarder l'apparition de l'activité inspiratoire. Ce délai est aboli si du DAMGO est injecté dans le PiCo, suggérant que ces deux générateurs pourraient être couplés. De plus l'injection de DAMGO a pour effet de réduire les décharges enregistrées sur le nerf vague. Ces résultats pris ensemble suggèrent, d'après les auteurs que PiCo est nécessaire et suffisant pour générer l'activité post-inspiratoire.

Enfin les auteurs avancent que les neurones de PiCo possèdent des propriétés rythmogéniques. En effet afin de séparer physiquement PiCo du préBotz l'activité de l'un et l'autre a été enregistré sur des tranches transverses du bulbe rachidien, une contenant PiCo et une autre contenant le préBotz. Il est apparu que comme les neurones du préBotz les neurones PiCo en présence de noradrénaline sont capables de générer avec la même fréquence des salves de PA et que ces dernières sont abolies en présence de CNQX.



# Figure 9 : PiCo : localisation et activités post-inspiratoires enregistrées sur une tranche horizontale contenant le VRG.

PiCo : localisation et activités post-inspiratoires enregistrées sur une tranche horizontale contenant le VRG. A gauche, tracés représentatifs de l'activité enregistrée au niveau des neurones de PiCo (en noir) en comparaison de celle enregistrée simultanément au niveau du préBotz (en violet). En absence ou en présence de NE (Noradrénaline). A droite, partie gauche représentation schématique de la localisation de PiCo et du préBotz par rapport au noyau facial (VII N) et au noyau ambigu (NA), partie droite carte thermique qui représente l'amplitude des décharges enregistrées sur les neurones. *D'après Anderson et al., 2016* 

#### III.2.3- Les modèles explicatifs sous-jacents à la rythmogénèse respiratoire

Les bases cellulaires des mécanismes qui permettent la génération d'un rythme respiratoire à la fois cyclique, robuste et modulable, ont donné lieu à un grand nombre de

publications défendant différents modèles qui sont expliqués brièvement dans les lignes qui suivent.

### III.2.3.1- Le modèle réseau

Pendant longtemps, la rythmogénèse respiratoire a été considérée comme exclusivement le produit de propriétés du réseau respiratoire. Selon ce concept, l'établissement des phases du cycle respiratoire repose sur des interactions entre les neurones composant le réseau neuronal respiratoire. On parle du modèle d'inhibition réciproque. Le concept de ce modèle fait intervenir des neurones connectés entre eux par des synapses inhibitrices. Un neurone de ce réseau rendu inactif, conduit à une levée d'inhibition des neurones auxquels il est connecté. En résulte une activation de ces neurones qui inhibent en retour le neurone qui les a activés et ainsi de suite. En replaçant ce concept de fonctionnement dans le contexte des neurones respiratoires tel que décrit plus haut, on peut imaginer que l'activation des neurones inspiratoires dépendrait de la levée d'inhibition fournie par les neurones post-inspiratoires, qui eux-mêmes seraient sous la dépendance des neurones expiratoires. Ainsi un tel réseau serait capable d'assurer la production d'un rythme stable mais également sujet à la modulation. Pour autant des approches pharmacologiques permettant de bloquer les inhibitions postsynaptiques, réalisées notamment sur des préparations ex vivo de SNC isolé ont révélé une activité rythmique persistante, rendant peu probable l'hypothèse que le modèle d'inhibition réciproque entre neurones soit la base cellulaire de la rythmogénèse respiratoire (Feldman and Smith, 1989, Onimaru et al., 1989, Shao and Feldman, 1997, Brockhaus and Ballanyi, 1998, Gray et al., 1999).

# III.2.3.2- Le modèle pacemaker

La persistance du rythme respiratoire après blocage des inhibitions postsynaptiques a conduit à l'idée selon laquelle la rythmogénèse respiratoire repose sur des neurones dits pacemakers. Ce modèle pacemaker se base sur des études qui ont montré que des neurones sont capables de maintenir un profil de décharge rythmique indépendamment d'afférences excitatrices ou inhibitrices. D'une part, sur des préparations ex vivo Onimaru et collaborateurs ont mis en évidence que des neurones localisés à la surface ventrolatérale du bulbe rachidien continuaient à décharger après blocage des transmissions synaptiques (Onimaru et al., 1989). On peut raisonnablement penser aujourd'hui que les neurones enregistrés dans cet article correspondent aux neurones du RTN/pFRG (Onimaru and Homma, 2003). D'autre part, en enregistrant l'activité de neurones du préBotz contenus sur des tranches de bulbe rachidien des auteurs ont montré que le profil de décharge résiste à l'isolement et ce en absence d'afférences excitatrices ou inhibitrices (Feldman and Smith, 1989, Onimaru et al., 1989, Smith et al., 1991, Thoby-Brisson and Ramirez, 2001). Les neurones en question ont été qualifiés de neurones pacemakers conditionnels dans le sens où le déclenchement de leur activité autorythmique et donc l'activation du réseau, implique l'existence d'entrées excitatrices toniques pour induire une légère dépolarisation qui pourra alors se traduire en une slave de PA (Figure 10). Les propriétés de ces neurones pacemarkers seraient sous-tendues par la présence des courant I<sub>NAP</sub> et I<sub>CAN</sub> (comme expliqué dans la partie III.2.2.1). Des interconnexions

excitatrices locales seraient alors nécessaires à la synchronisation du rythme (Butera et al., 1999). Ainsi selon ce modèle, les neurones pacemakers du préBotz imposeraient ensuite leur rythme au reste des neurones du réseau qui seraient alors qualifiés de « suiveurs » (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001). Le rôle crucial du préBotz dans la rythmogénèse respiratoire fait consensus, pour autant l'origine des excitations toniques et la connectivité entre les différentes populations cellulaires en son sein ne sont pas complètement déterminées. De plus des constatations ont questionné la validité de ce modèle. Il a été montré que le blocage de INAP avec du Riluzole aboutit à l'élimination de l'activité rythmique d'une proportion des neurones pacemakers mais que la respiration fictive persiste suggérant soit que (i) les neurones exprimant I<sub>CAN</sub> (moins de 1% des neurones du préBotz à PO-P5) suffisent seuls à maintenir une activité rythmique, soit que (ii) les neurones pacemakers ne soient pas essentiels à la rythmogénèse (Del Negro et al., 2002). En faveur de la première hypothèse, des enregistrements réalisés sur des tranches de bulbe rachidien montrent que quand, en plus du blocage des courant I<sub>NAP</sub> les courant I<sub>CAN</sub> sont bloqués par l'acide flufénamique on abolit le rythme respiratoire (Pena et al., 2004, Del Negro et al., 2005). Néanmoins, il a été montré que cet effet est reversé par l'ajout de SP ou d'AMPA (un agoniste des récepteurs glutamatergiques AMPA) suggérant que l'activation des I<sub>CAN</sub> serait due à des propriétés de réseau, notamment des synapses glutamatergiques, ce qui tend à infirmer la première hypothèse (Pena et al., 2004). Ainsi bien qu'essentiels les propriétés pacemakers des neurones du préBotz n'expliqueraient pas à eux seuls l'élaboration de la rythmogénèse respiratoire.

#### III.2.3.3- Modèle de propriété émergente du réseau ou "groupe-pacemaker"

De nombreux débats opposent encore les spécialistes et ont conduit à l'émergence d'un troisième modèle, dit modèle hybride, qui repose sur le couplage du modèle pacemaker et le concept de propriétés des neurones du réseau. Les neurones pacemakers du préBotz permettraient de piloter les populations neuronales, aux propriétés membranaires propres, nécessaires à l'élaboration du rythme selon le modèle des propriétés de réseau (Ballanyi et al., 1999). Pour autant un autre concept est maintenant de plus en plus admis, il s'agit du modèle de propriété émergente du réseau ou « groupe-pacemaker » (Figure 10) (Rekling and Feldman, 1998, Feldman and Del Negro, 2006, Del Negro et al., 2010). On parle de propriété émergente dans le sens où le rythme qui résulte de l'activité du réseau, est le fruit de l'interaction entre les neurones qui le composent et non pas d'un neurone pris individuellement. De fait, les neurones qui composent ce réseau sont couplés entre eux chimiquement et électriquement. Ainsi l'activation de conductances intrinsèques dépolarisantes sous-tendent des couplages excitateurs récurrents entre neurones possédant des propriétés similaires et conduisent à la genèse de décharges rythmiques qui s'autoentretiendraient à l'échelle du réseau sans invoquer de propriétés pacemakers (Feldman and Del Negro, 2006, Del Negro and Hayes, 2008). Ces conductances dépolarisantes participeraient également à l'amplification de l'activité rythmique tandis que les hyperpolarisantes seraient impliquées dans la terminaison de l'inspiration, le tout permettant la redistribution de l'information et le maintien un certain degré d'excitabilité au sein du réseau respiratoire (Rekling and Feldman, 1998, Haji et al., 2000, Feldman and Del Negro,

2006, Rybak et al., 2007, Del Negro et al., 2010). L'ensemble neuronal se comporte donc comme un « groupe- *pacemaker* » du rythme respiratoire.



# Figure 10 : Le modèle pacemaker et le modèle groupe-pacemaker de rythmogénèse au sein du préBotz.

(A). Modèle pacemaker conditionnel. En haut : En réponse à une excitation tonique (TI), un neurone pacemaker conditionnel, même isolé des autres neurones, émet des décharges de potentiels d'action. Deux traces du milieu : deux neurones pacemaker couplés synchronisent leurs activités *via* des connexions excitatrices réciproques. Trois traces du bas : plusieurs neurones pacemaker couplés synchronisent leurs activités, bien qu'il puisse exister une dispersion temporelle de l'initiation et de la terminaison des décharges en raison de variabilités dans l'intensité des entrées excitatrices toniques. (B). Modèle de groupe-pacemaker. Les neurones individuels (trace du haut) ne sont pas capables d'émettre des décharges de potentiels d'action, même en réponse à des stimulations synaptiques ou des injections de courant intracellulaires (\$). Deux neurones couplés par des excitations réciproques (traces du milieu) s'excitent mutuellement mais les dépolarisations associées sont de trop faible amplitude pour initier une décharge. La stimulation de plusieurs neurones couplés (traces du bas) entraîne la genèse auto-entretenue de décharges, en réponse à l'activation de conductances intrinsèques dépolarisantes et hyperpolarisantes. *D'après Rekling and Feldman, 1998* 

# IV- Les structures encéphaliques modulant la commande centrale respiratoire

La CCR doit constamment s'adapter afin de contribuer au respect des principes d'homéostasie en maintenant à des valeurs physiologiques le pH sanguin, les valeurs de pressions partielles artérielle et tissulaire en dioxyde de carbone (PaCO<sub>2</sub> et PtCO<sub>2</sub>) et en dioxygène (PaO<sub>2</sub> et PtO<sub>2</sub>). Tout phénomène qui induit un glissement hors des valeurs de consignes enclenche des mécanismes qui influencent le réseau à l'origine de la CCR, permettant de maintenir les valeurs de ces grandeurs dans la gamme physiologique.

# IV.1- Les structures cathécolaminergiques

Les catécholamines tiennent une place importante dans la modulation de la CCR, elles sont issues du même précurseur la tyrosine, elle-même synthétisée à partir d'un autre acide aminé (aa) : la phénylalanine (Gargaglioni et al., 2008, Viemari, 2008). C'est sous l'action de la TH, la première enzyme de biosynthèse que la première réaction sera catalysée, produisant la L-dihydroxyphénylalanine (DOPA) d'où pourra découler ensuite la dopamine (DA), la noradrénaline (NA) ou norépinephrine, ainsi que l'adrénaline (A) ou épinephrine. Une fois synthétisées les catécholamines sont stockées au niveau des terminaisons synaptiques dans des vésicules jusqu'à leur libération par exocytose. Sa place de première enzyme intervenant dans leur biosynthèse, vaut à la TH d'être souvent utilisée pour le marquage des cellules catécholaminergiques (Levitt et al., 1965). Les catécholamines jouent un rôle important dans la maturation et la modulation des comportements rythmiques tels que la ventilation (Guyenet et al., 1993, Viemari et al., 2004a, Viemari and Ramirez, 2006). Sera listée ici la contribution apportée par les principaux groupements cellulaires catécholaminergiques impliqués dans la modulation de la CCR (Gargaglioni et al., 2008, Viemari, 2008). Le long du tronc cérébral ces derniers ont été numérotés selon l'axe caudo-rostral, et vont des groupes A1 à A7 pour les neurones noradrénergiques et de C1 à C3 pour les neurones adrénergiques (Figure 11). Les catécholamines peuvent moduler l'activité du réseau respiratoire en exerçant un effet excitateur ou inhibiteur selon qu'elles se fixent sur des récepteurs  $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$ respectivement (Hilaire et al., 2004).



# Figure 11 : Représentation schématique des structures catécholaminergiques.

Vue sagittale d'un encéphale de souris avec l'emplacement schématique des neurones catécholaminergiques bulbaires et pontiques. Les groupes A1/C1 et A2/C2 sont localisés au niveau du bulbe rachidien. Les groupes A5 et A6 sont localisés au niveau pontique. *D'après Johnson et al 2005* 

#### IV.1.1- Noyau réticulaire bulbaire ventrolatéral – A1/C1

Situé dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien, ce groupement catécholaminergique est composé dans sa partie la plus caudale et la plus rostrale respectivement d'une majorité de neurones noradrénergiques (A1, principalement propriobulbaires (McKellar and Loewy, 1982)) et de neurones adrénergiques (C1, propriobulbaires et bulbospinaux dont certains sont localisés au niveau du VRG (Ross et al., 1984, Guyenet and Young, 1987, Ellenberger and Feldman, 1990, Ellenberger et al., 1990). Ces neurones ont un rapport privilégié avec les neurones du préBotz. En effet les expériences de traçage rétrograde couplées à de l'immunohistochimie entreprises par Ellenberger et collaborateurs, ont montré que les neurones C1 sont entremêlés avec ceux du rVRG (Ellenberger and Feldman, 1990, Ellenberger et al., 1990) et notamment avec ceux du préBotz (Schwarzacher et al., 2011), suggérant une interaction fonctionnelle. Cette interaction a trouvé ses arguments, en premier lieu génétiques, des auteurs ont émis l'hypothèse que les déficits respiratoires observés in vivo chez les souris mutantes Mecp2 (un gène impliqué dans le syndrome de Rett, pathologie associée à une diminution massive des neurones catécholaminergiques), pouvaient être imputables au dysfonctionnement des groupements A1/C1 (Erickson et al., 1996, Balkowiec and Katz, 1998, Viemari et al., 2005, Viemari, 2008). D'autre part, cette interaction fonctionnelle a trouvé ses arguments avec des études réalisées ex vivo et in vitro. En effet, l'application d'un antagoniste des récepteurs  $\alpha^2$  induit sur des préparations bulbe rachidien-moelle épinière comme sur des tranches de bulbe rachidien une diminution de la fréquence des décharges inspiratoires (Zanella et al., 2005). De plus sur des préparations ex vivo pont-bulbe rachidien moelle épinière, l'application de tyrosine, accélère le rythme de décharge. Ainsi, les auteurs ont proposé que A1/C1 module le générateur du rythme respiratoire notamment au moyen d'une synthèse endogène de NA et que son action serait médiée par les récepteurs α2 (Viemari et al., 2005, Zanella et al., 2005). Enfin les expériences in vivo réalisées par différentes équipes couplant la pléthysmographie à l'immunohistochimie ont montré, à l'instar de précédentes études, que les neurones A1/C1 étaient activés en cas de stimulation hypoxique et suggèrent que ces derniers participent alors à l'adaptation de la CCR (Erickson and Millhorn, 1994, Wakai et al., 2015).

#### IV.1.2- NTS commissural et médian - A2/C2

Principalement cités pour son implication dans la médiation de stimuli hypoxiques on retrouve au niveau du NTS commissural (cNTS) et médian (mNTS) des neurones catécholaminergiques. Sa composition en neurones noradrénergiques (A2) et adrénergiques (C2) suit une distribution précise sur le plan rostro-caudal (Kalia et al., 1985). Au même titre que le groupement A1/C1 ils seraient impliqués dans les déficits respiratoires observés chez les souris mutantes Mecp2 (Erickson et al., 1996, Balkowiec and Katz, 1998, Viemari et al., 2005, Viemari, 2008). De plus il a été montré *ex vivo* et sur des tranches de bulbe rachidien de souris wild-type qu'en cas de lésions électrolytiques bilatérales d'A2/C2, le rythme respiratoire n'est pas affecté mais que cela entraine son instabilité (Zanella et al., 2005), suggérant que les neurones A2/C2 jouent un rôle dans la stabilisation de ce rythme (Viemari et al., 2005, Zanella

et al., 2005). A2/C2 et A1/C1 agiraient de concert en contribuant respectivement à stabiliser et à faciliter la CCR via les récepteurs  $\alpha 2$  (Viemari, 2008). Par ailleurs cette structure a été décrite pour son rôle en tant que centre d'intégration de nombreuses afférences périphériques, afférences qui véhiculent notamment l'activité des récepteurs bronchopulmonaires sensibles à l'étirement (Kalia and Mesulam, 1980b, a), ainsi que des informations provenant des chémorécepteurs périphériques situés sur les corps carotidiens (Davies and Edwards, 1973, Jordan and Spyer, 1977, Lipski et al., 1977).

#### IV.1.3- La région A5

Les neurones noradrénergiques de la région A5 sont localisés dans le pont caudal ventro-latéral. Cette structure est composée de neurones pré-moteurs et d'interneurones. Des connections avec le NTS, le PRG ainsi qu'avec l'aire périfornicale et la région périventriculaire de l'hypothalamus ont été mises en évidence (Byrum et al., 1984, Woodruff et al., 1986, Byrum and Guyenet, 1987, Dawid-Milner et al., 2003). In vivo il a été montré que la stimulation chimique d'A5, entraine une diminution de la fréquence respiratoire, tandis que la lésion chimique du pont ventro-latéral montre qu'elle est impliquée dans les mécanismes de dépression de la fréquence respiratoire induite par l'hypoxie suggérant que les neurones contenus dans cette zone sont impliqués dans les mécanismes de dépression de la fréquence respiratoire induite par l'hypoxie (Coles and Dick, 1996, Dawid-Milner et al., 2001). Ces observations suggèrent que le groupe A5 exerce un effet inhibiteur sur la CCR. Les mêmes conclusions ont été déduites du travail réalisé sur des préparations ex vivo (Hilaire et al., 1989, Errchidi et al., 1990). Cet effet inhibiteur, reversé par la transsection du pont, serait imputable à une libération de NA dont les effets seraient médiés par les récepteurs α2 (Hilaire et al., 1989, Errchidi et al., 1991, Hilaire et al., 2004). En effet l'exposition à un antagoniste de ces récepteurs entraine ce qui semble être une levée d'inhibition et induit une augmentation de la fréquence respiratoire (Errchidi et al., 1990, Errchidi et al., 1991, Hilaire, 2006).

#### IV.1.4- Locus coeruleus - A6

Le locus coeruleus (A6) est une structure pontique bilatérale adjacente au quatrième ventricule qui s'étend tout le long du pont. Les interneurones qui composent cette structure sont considérés comme la source majeure d'innervation noradrénergique dans le SNC (Viemari, 2008). En enregistrant en plus des décharges en C4, l'activité des neurones A6 directement sur des préparations *ex vivo*, Oyamada et collaborateurs ont montré que ces derniers sont chémosensibles aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et proposent que les neurones du locus coeruleus modulent la CCR en recevant et envoyant des projections aux neurones respiratoires (Oyamada et al., 1998). Guyenet et collaborateurs *via* l'enregistrement *in vivo* de l'activité des neurones A6 en plus de celle du nerf phrénique, ont décrit que les neurones A6 sont stimulés par une hypoxie et que cela entraine une augmentation de l'activité de ce dernier (Guyenet et al., 1993). Cette observation a été validée par une équipe qui en réalisant des enregistrements intracellulaires de l'activité des neurones A6 contenus sur des tranches

de pont, ont révélé que ces neurones ont la propriété intrinsèque de répondre à une hypoxie (Yang et al., 1997). On notera que les auteurs distinguent deux sous populations de neurones selon leur réponse à l'hypoxie, certains s'hyperpolarisent tandis que d'autres se dépolarisent. En outre, les souris mutantes pour le gène *Phox2a* (induisant la non-formation de la région A6 tout en préservant la formation des autres neurones noradrénergiques) succombent au cours des 24H suivant la naissance, révélant ainsi l'importance fondamentale des neurones A6 dans le contrôle respiratoire, du moins pendant la période post-natale (Viemari et al., 2004a). Enfin les expériences d'inactivations pharmacologiques et de stimulations électriques, mises en perspective avec les données provenant de souris mutantes suggèrent que les neurones A6 fournissent des afférences excitatrices sur les structures responsables du rythme respiratoire. Ces effets seraient médiés par les récepteurs noradrénergiques  $\alpha$ 1, dans la mesure où l'exposition de préparations *ex vivo* contenant le groupe A6 à un antagoniste de ces récepteurs entraine une diminution de la fréquence respiratoire (Viemari et al., 2004a, Viemari, 2008). A noter que ces récepteurs ont été décrits comme présents sur les neurones inspiratoires du préBotz (Hakuno et al., 2004, Viemari et al., 2004a, Viemari et al., 2006).

### IV.2- Les groupes sérotoninergiques

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est un neurotransmetteur synthétisé à partir du tryptophane. La première enzyme de synthèse, la tryptophane hydroxylase le converti en 5-hydroxytryptophane lui-même converti par la 5-hydroxytryptophane décarboxylase en sérotonine (Hilaire et al., 2010). Ce neurotransmetteur est produit par de nombreux groupes de neurones localisés au niveau du tronc cérébral qui projettent dans tout le SNC (Steinbusch and Nieuwenhuys, 1981). La première enzyme de synthèse n'étant présente que dans les neurones sérotoninergiques, elle permet une identification immunohistochimique de ces derniers, même si la détection de la 5-HT elle-même, est couramment utilisée. Comme les catécholamines, cette dernière est principalement stockée dans des vésicules présynaptiques avant d'être libérée sous l'effet un influx calcique. Une fois libérée la molécule de sérotonine peut alors se fixer sur ses nombreux récepteurs répartis conventionnellement en 7 groupes, notés 5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>. Ces derniers distribués tout le long du tronc cérébral ainsi que dans la moelle épinière, le diencéphale et le télencéphale, enclenchent différentes voies de signalisation qui sous-tendent les divers rôles physiologiques de la sérotonine.

Les neurones contenant de la sérotonine au même titre que les catécholaminergiques permettraient de coordonner la CCR en modulant la ventilation basale, ainsi que la réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie. En 1964 Dahlstrom et Fuxe ont proposé une classification des structures sérotoninergiques du tronc cérébral (Dahlstrom and Fuxe, 1964). Chaque structure est désignée par la lettre B à laquelle on accole un chiffre en fonction de leur organisation dans l'axe caudo-rostral, on distingue alors les structures allant de B1 à B4 qui désignent les structures sérotoninergiques caudales (qui s'étendent du bulbe rachidien au pont caudal) et celles allant de B5 à B9 qui correspondent aux structures rostrales (qui s'étendent de la fin du pont caudal au mésencéphale) (Figure 12).



# Figure 12 : Représentation schématique des structures sérotoninergiques.

Vue sagittale d'un encéphale de souris avec l'emplacement schématique des noyaux des raphés médullaires et pontiques. Les noyaux des raphés Pallidus, Obscurus et Magnus sont localisés au niveau du bulbe rachidien et les noyaux des raphés pontique, médian et dorsal sont localisés au niveau du pont et du mésencéphale

IV.2.1- Raphé Pallidus – B1

Le raphé Pallidus (RPa) constitue une structure très dense de neurones 5-HT. Il est localisé au niveau de la région ventro-médiane et s'étend tout le long du bulbe rachidien jusque dans le pont caudal (Jacobs and Azmitia, 1992). Sur le chat anesthésié et décérébré Lalley suggère une interaction fonctionnelle entre cette structure et le contrôle de la respiration en montrant que la dépolarisation des neurones contenus dans le RPa induite par stimulation électrique entraine une augmentation de la fréquence des PA au niveau des motoneurones phréniques, proportionnellement à l'intensité du stimulus (Lalley, 1986). Par la suite un lien anatomique direct entre les motoneurones phréniques spinaux et les neurones du RPa a été mis en évidence grâce à des études de traçage neuronal révélant les projections axonales (Dobbins and Feldman, 1994, Hosogai et al., 1998). Il a par ailleurs été suggéré que parmi les neurones du RPa certains sont des neurones proprio-bulbaires projetant notamment sur le préBotz (Yu et al., 2011). Enfin d'autres études ont ensuite confirmé l'effet facilitateur qu'exerce le RPa sur la CCR en combinant des approches d'immunohistochimie et d'électrophysiologie (Cao et al., 2006, Kobayashi et al., 2010, Yu et al., 2011).

IV.2.2- Raphé Obscurus – B2

On retrouve les neurones du raphé Obscurus (ROb) dans la région ventro-médiane du bulbe rachidien, ils sont situés dorsalement au RPa et s'étendent comme ce dernier tout le long du bulbe rachidien (Jacobs and Azmitia, 1992). A la différence du RPa les études de Lalley avaient montré que la stimulation électrique des neurones du ROb entrainait une diminution proportionnelle de la fréquence de décharge des motoneurones phréniques (Lalley, 1986). Pour autant cette observation a été contredite par différents papiers qui ont montré que, même si moins prononcé que celui exercé par le RPa, les neurones contenus dans le ROb exerçaient également un effet facilitateur sur la CCR (Cao et al., 2006, Ptak et al., 2009, Kobayashi et al., 2010, Depuy et al., 2011).

#### IV.2.3- Raphé Magnus – B3

Les neurones du Raphé Magnus (RMg) sont dans la région ventro-médiane du bulbe rachidien latéralement par rapport au RPa et au ROb (Jacobs and Azmitia, 1992). De la même manière, les expériences de Lalley démontrent que la stimulation électrique du RMg entraine une diminution proportionnelle de la fréquence de décharge des motoneurones phréniques (Lalley, 1986). Pour autant des résultats contradictoires obtenus par pléthysmographie ont avancé le fait que chez le rat la lésion spécifique des neurones sérotoninergiques du RMg (obtenue grâce à une immunotoxine dirigé par un anticorps monoclonal spécifique du transporteur de réabsorption de la sérotonine) ne modifiait pas la ventilation (Dias et al., 2007). Les travaux de Cao et collaborateurs ont montré que la stimulation électrique du RMg entraine une inhibition de l'activité respiratoire chez le rat anesthésié (Cao et al., 2006), donc à priori en accord avec les travaux de Lalley et collaborateurs. Pour autant dans ce même article les auteurs montrent que l'administration intraveineuse de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, réduit significativement l'inhibition induite par une stimulation électrique du RMg. Ainsi ces effets contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que les stimulations électriques auraient pu recruter des neurones GABAergiques inhibitrices et non sérotoninergiques (Cao et al., 2006, Gargaglioni et al., 2008). En 2007 Dias et collaborateurs enregistraient chez le rat la ventilation de base et la réponse respiratoire à une hypercapnie avec ou sans lésion spécifique des neurones sérotoninergiques du RMg et montraient que cette lésion ne modifie pas la ventilation de base mais diminue la réponse à l'hypercapnie (Dias et al., 2007).

#### V.2.4- Le groupe parapyramidal

Le groupe parapramidal (PP), n'appartient pas aux structures décrites initialement par Dahlström et Fuxe. Le PP est localisé de part et d'autre de la ligne médiane à la surface ventrale du bulbe rachidien en bordure des pyramides (Connelly et al., 1989). Il est composé d'une part de neurones bulbo-spinaux projetant sur la colonne intermediolatérale (Helke et al., 1989, Sasek et al., 1990) avec comme fonction végétative notamment la régulation de la pression artérielle (Helke et al., 1989) ; d'autre part de neurones proprio-bulbaires qui projettent vers le NTS et le VRG, des liens anatomiques qui pourrait justifier son rôle dans la modulation de la CCR (Stornetta and Guyenet, 1999, Ribas-Salgueiro et al., 2006). En effet, des approches ex vivo et par immunohistochimie ont montré que ces neurones sont impliqués dans la réponse respiratoire à l'hypoxie (Erickson and Millhorn, 1994, Bodineau et al., 2000a, Voituron et al., 2005, Voituron et al., 2011). Par ailleurs ils ont été décrits comme sensibles à l'hypercapnie (Bradley et al., 2002, Richerson, 2004) dans la mesure où des enregistrements électrophysiologiques ont montré qu'ils augmentent leur fréquence de décharges en réponse à une augmentation de la concentration en ions H<sup>+</sup> (Ribas-Salgueiro et al., 2005). Nous reviendrons sur ces propriétés chémosensibles dans la partie correspondante (Chapitre II, III.3- Le groupe parapyramidal). Chez l'Homme l'homologue structural de cette structure, le noyau arqué du bulbe rachidien, a été mis en cause dans des cas de mort subite du nourrisson (Kinney et al., 2007).

#### IV.2.5- Le Raphé dorsal

Le raphé dorsal est localisé ventralement par rapport à la substance grise périaqueducale (PAG), dans l'axe médian du mésencéphale. C'est une structure dense en neurones sérotoninergiques qui projettent entre autre vers l'amygdale et le locus coeruleus (Ma et al., 1991, Schober and Fischer, 1991, Rampon et al., 1999). Cette structure serait impliquée dans les états de vigilance (Trulson and Jacobs, 1979, Ferraro et al., 2013, Li et al., 2015), ainsi que dans le contrôle moteur (Fornal et al., 1996, Su et al., 2014). On lui soupçonne un rôle dans le phénomène de cataplexie (perte brutale du tonus musculaire) associée à la narcolepsie (Wu et al., 2004). Le rôle des neurones qui composent cette structure dans la modulation de la CCR serait sous-tendu par leurs propriétés chémosensibles à l'hypercapnie et aux variations de pH, le détail de cette contribution sera détaillé dans le Chapitre II (*Chapitre II, IV.2- Le noyau du raphé dorsal*)(Washburn et al., 2002, Buchanan and Richerson, 2010, Baccini et al., 2012).

# IV.3- La substance grise périaqueducale

La PAG est localisée tout autour de l'aqueduc de Sylvius et s'étend comme lui tout le long du mésencéphale. Kabat est le premier en 1936 à avoir montré chez le chat anesthésié que la stimulation électrique de la PAG exerce un effet facilitateur sur la respiration (Kabat, 1936). Ces résultats ont été confirmés depuis chez le rat (Zhang et al., 2005b). Les enregistrements réalisés par Orem et Netick ont ensuite montré qu'une faible proportion (15%) des neurones de la PAG présentaient des patterns de décharges temporellement liés au phase du cycle respiratoire (Orem and Netick, 1982). Chez le rat, la PAG reçoit de nombreuses afférences provenant de l'hypothalamus et en retour envoie des efférences vers différentes structures /subdivisions bulbaires et pontigues, comme le KF, le bulbe rachidien ventrolatéral et le NTS (Cameron et al., 1995a, Cameron et al., 1995b). Un lien plus formel entre les neurones de la PAG et les neurones respiratoires bulbaires localisés au niveau du VRGc a été établi en enregistrant l'activité de ces derniers en cas de stimulation électrique de la PAG (Duffin and Hockman, 1972). Cette stimulation a eu comme effet de modifier le pattern de décharges des neurones bulbaires d'expiratoire à inspiratoire démontrant le fort contrôle qu'est en mesure d'exercer cette structure sur les neurones respiratoires bulbaires. Depuis la PAG a principalement été décrite pour son rôle dans l'adaptation de la CCR à des stimuli hypercapniques et notamment de par le fait qu'elle pourrait servir de relais entre les structures hypothalamiques chémosensibles aux CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et le réseau respiratoire bulbopontique (Ryan and Waldrop, 1995, Horn and Waldrop, 1998).

# IV.4- L'hypothalamus caudal

L'hypothalamus caudal est situé dans la partie ventrale du diencéphale et renferme le noyau dorsomédian ainsi que les aires hypothalamiques postérieure et latérale (Waldrop and Porter, 1995). Kabat est le premier a montré que la stimulation électrique de l'hypothalamus caudal entraine un effet facilitateur sur la respiration (Kabat, 1936). En 1996 des injections de traceur antérograde ont permis aux auteurs de montrer que l'hypothalamus caudal envoie des afférences au mésencéphale, aux neurones du bulbe rachidien ventrolatéral ainsi qu'au mNTS (Ricardo and Koh, 1978, Vertes and Crane, 1996). Par ailleurs il a également été montré que l'hypothalamus caudal renferme des neurones pré-moteurs qui envoient des projections aux motoneurones phréniques (Yeh et al., 1997). Le rôle que joue l'hypothalamus caudal dans la CCR basale a été étudié dans le cadre de plusieurs études qui ont bloqué ou aboli l'activité de ces neurones par injection de barbituriques ou via des lésions électrolytiques (Redgate and Gellhorn, 1958, Keller, 1960, Waldrop et al., 1986, Waldrop and Porter, 1995). Il a ainsi été démontré que leur inactivation diminue l'activité de la CCR, en particulier la fréquence respiratoire indiquant que les neurones de l'hypothalamus caudal fournissent une influence excitatrice sur la CCR de base. Par la suite, des enregistrements unitaires réalisés sur ces neurones ont montré qu'ils présentent des décharges toniques modulées par le cycle respiratoire et que ces derniers sont stimulés par l'hypoxie et l'hypercapnie chez le chat anesthésié (Dillon and Waldrop, 1993). Il a été observé qu'en cas de stimulus hypoxique les neurones de l'hypothalamus caudal augmentent leur fréquence de décharge et que cette réponse n'est pas altérée en cas de blocage des transmissions synaptiques, suggérant une propriété intrinsèque de ces neurones (Dillon and Waldrop, 1993). A noter qu'il est apparu dans cette étude que les neurones répondant à l'hypoxie ne sont pas les mêmes que ceux qui répondent à l'hypercapnie. Enfin l'hypothalamus caudal semble être un relais entre l'influence des structures rostrales au diencéphale et le réseau respiratoire bulbo-pontigue. Des études ont révélé qu'en cas de section de l'encéphale rostrale au diencéphale la ventilation augmentait tandis qu'une section au niveau des colliculi n'a aucun effet sur la ventilation, suggérant que les zones rostrales au diencéphale exercent un effet inhibiteur sur la respiration qui est équilibré/contrebalancé par une influence facilitatrice provenant du diencéphale (Fink et al., 1962, Tenney and Ou, 1977).

#### IV.4.1- Les neurones orexinergiques

#### IV.4.1.1- Découverte

En 1998, deux groupes indépendants ont découvert chez le rat, en employant deux approches différentes, l'existence d'un neurotransmetteur. L'équipe de De Lecea était à la recherche d'un ARNm spécifique à l'hypothalamus tandis que l'équipe de Sakurai était elle, à la recherche du ligand d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998). De par le fait que la séquence ADN découverte par l'équipe de De Lecea était spécifique à l'hypothalamus et qu'elle présentait de nombreuses similitudes avec la séquence codant une sécrétine opérant dans l'intestin, les auteurs la baptisèrent hypocrétine (de Lecea et al., 1998). L'équipe de Sakurai ayant montré que son administration intracérébroventriculaire stimule l'appétit, l'ont nommé orexine (Sakurai et al., 1998). A l'heure actuelle la communauté scientifique n'a pas encore tranché quant au nom de référence de ce neuropeptide. Dans ce manuscrit le terme orexine sera

employé à l'instar des articles scientifiques qui semblent d'avantage employer cette appellation.

#### IV.4.1.2- Aspects généraux

Les corps cellulaires des neurones orexinergiques sont exclusivement localisés au niveau de l'hypothalamus caudal et en particulier, au niveau du noyau dorsomédian, de l'aire perifornicale, et des aires hypothalamiques postérieures et latérales (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998, Sunanaga et al., 2009). A partir d'un précurseur, la prépro-orexine deux peptides sont générés par clivage, l'orexine A 33 aa et l'orexine B 28 aa (Ohno and Sakurai, 2008). Leurs effets sont médiés par deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, nommés OX1R et OX2R. Des expériences ont établi que l'orexine A se fixe avec la même affinité sur OX1R et OX2R tandis que l'orexine B a une faible affinité pour OX1R mais fixe avec la même affinité que l'orexine A OX2R. OX1R est couplé à une protéine Gq et OX2R avec des protéines Gq et Gi/Go (Ohno and Sakurai, 2008). Le profil de distribution de ces deux récepteurs varie le long du SNC, il apparaît par exemple que le locus coeruleus n'exprime que OX1R tandis que le noyau tubéromammilaire de l'hypothalamus n'exprime que OX2R (Ohno and Sakurai, 2008). Cette observation mise en lien avec le fait que les récepteurs sont couplés avec différentes protéines G, entrainant l'activation des voies de signalisation distinctes suggère que ces différences peuvent contribuer aux divers rôles physiologiques de l'orexine (Ohno and Sakurai, 2008). Il a été décrit que la fixation de l'orexine A et B sur OX1R entraine l'activation de la phospholipase C ce qui induit un influx de Ca<sup>2+</sup> (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998, Lund et al., 2000, Ohno and Sakurai, 2008). Le rôle de l'orexine a donné lieu à de nombreuses études qui retracent les effets pléiotropes qu'elle exerce dans le SNC. Ainsi la signalisation orexinergique serait impliquée : dans la régulation de la prise alimentaire, qu'elle favorise (Sakurai et al., 1998, Baumann and Bassetti, 2005, Adamantidis and de Lecea, 2009, Burdakov et al., 2013), dans les mécanismes de la réponse physiologique au stress (qui se traduit concernant la respiration par une hyperventilation) (DiMicco et al., 2002, Dampney et al., 2008, Kinkead et al., 2014), dans la régulation circadienne des états de vigilance, en consolidant l'éveil (Estabrooke et al., 2001, Baumann and Bassetti, 2005, Nakamura et al., 2007, Li and Nattie, 2010) ; dans la locomotion, comme un stimulant de l'activité motrice et du tonus musculaire (Hagan et al., 1999, Ida et al., 1999, Kiyashchenko et al., 2002, Martins et al., 2004) ; et dans des fonctions neuroendocrines (par exemple en diminuant les niveaux de prolactine et d'hormone de croissance et en augmentant ceux de corticostéroïdes et d'ACTH une hormone corticotrope) (van den Pol et al., 1998, Jones et al., 2001) et sympathiques, par exemple en augmentant la pression artérielle (Samson et al., 1999, Shirasaka et al., 1999, Matsumura et al., 2001, Monda et al., 2001, Ciriello and de Oliveira, 2003, Geerling et al., 2003). A noter que les résultats obtenus quant à l'influence de l'orexine sur le sommeil paradoxal (ou rapid eye mouvement, REM) sont contradictoires (Baumann and Bassetti, 2005).

La description de tous ces effets serait ici hors propos nous nous concentrerons sur ces effets sur la CCR.

Les neurones orexinergiques envoient des projections dans de nombreuses structures impliquées dans la modulation et la génération de la CCR (Peyron et al., 1998, Shahid et al., 2012). Au niveau du diencéphale ces neurones entretiennent un lien privilégié avec les neurones histaminergiques du noyau tubéromammilaire décrits pour leurs propriétés chémosensibles (Eriksson et al., 2004, Johnson et al., 2005b). Au niveau du mésencéphale des projections orexinergiques sont retrouvées au niveau de la PAG (Date et al., 1999, Nambu et al., 1999) et du noyau du raphé dorsal (Brown et al., 2001). Dans le pont, le locus coeruleus (Date et al., 1999, Hagan et al., 1999) et le PRG (Peyron et al., 1998) reçoivent également des afférences. Enfin dans le bulbe rachidien, le NTS commissural et médian (Date et al., 1999), les motoneurones de l'hypoglosse (Fung et al., 2001), le noyau RPa (Zheng et al., 2005, Tupone et al., 2011), le RTN/pFRG (Rosin et al., 2006, Lazarenko et al., 2011) reçoivent des afférences. Pour finir des récepteurs à l'orexine ont été décrits sur les neurones du préBotz, le NTS commissural et médian, les noyaux des raphés RPa, ROb et RMg, les neurones noradrénergique du LC et de la région A5, et au niveau des motoneurones phréniques de la moelle épinière (Young et al., 2005, Ohno and Sakurai, 2008, Darwinkel et al., 2014).

Fort de ce constat de nombreuses équipes ont cherché à apprécier l'effet de l'orexine sur la CCR, sur des modèles in vivo, ex vivo et in situ. Ainsi chez le rat, en microinjectant dans le préBotz des concentrations croissantes d'orexine tout en enregistrant l'activité du diaphragme, Young et collaborateurs ont montré que cela induisait une augmentation dose dépendante de l'activité du diaphragme (Young et al., 2005, Shahid et al., 2012). Un effet similaire a été obtenu lors d'une injection d'orexine A dans les ventricules latéraux de souris (Zhang et al., 2005a) et lors de microinjection d'orexine B dans le KF sur une préparation in situ de rat juvénile perfusé artificiellement (Dutschmann et al., 2007). Une autre étude qui a pratiqué des microinjections d'orexine dans le ventricule latéral a montré que cela induisait l'expression de c-fos (un marqueur d'activité neuronale) notamment dans le locus coeruleus, les noyaux raphés bulbaires et le NTS commissural et médian (Date et al., 1999). Par ailleurs des enregistrements de la racine C4 réalisés sur des préparations ex vivo de SNC isolé concomitants avec l'enregistrement des neurones respiratoires du bulbe ventrolatéral ont montré qu'une exposition à l'orexine B dépolarise les neurones inspiratoires et préinspiratoires tout en augmentant la fréquence de décharges en C4. D'autre part en travaillant sur des tranches de bulbe rachidien, un lien fonctionnel semblerait être établi entre l'orexine et les noyaux du raphé bulbaire médian et ventrolatéral (Corcoran et al., 2015) dans le sens où l'effet facilitateur de l'orexine A sur l'activité des motoneurones de l'hypoglosse est diminué sur un modèle de souris déficientes en 5-HT. Enfin l'enregistrement unitaire de l'activité des neurones du RTN/pFRG de souris nouveau-nées en réponse à des quantités croissantes d'orexine A révèle que ces derniers augmentent leur fréquence de décharge de façon dose dépendante (Lazarenko et al., 2011).

A noter que de nombreuses études ont corrélé l'effet sur la CCR et/ou les neurones du réseau respiratoire de l'orexine à l'état de vigilance, il en ressort que l'orexine exercerait ses

effets principalement pendant la phase d'éveil (Deng et al., 2007, Nakamura et al., 2007, Ohno and Sakurai, 2008, Dias et al., 2009, Dias et al., 2010, Li and Nattie, 2010).

#### IV.4.1.4- Pathologies en lien avec la signalisation orexinergique

La narcolepsie est une pathologie rare entrainant une somnolence diurne excessive, qui se manifeste notamment par des épisodes d'endormissements qui prennent la forme « d'attaque de sommeil » incontrôlables et pouvant survenir à des moments inappropriés. Des électroencéphalogrammes effectués sur des souris modèles de narcolepsie pendant une de ces attaques de sommeil ont révélé que ces derniers sont équivalents à ceux obtenus pendant le sommeil REM (Baumann and Bassetti, 2005). De par le rôle qu'exerce l'orexine sur les états de vigilance, ce neuropeptide a été soupçonné d'être impliqué dans la narcolepsie associée à la cataplexie.

En clinique, parmi les moyens actuels de diagnostiquer la narcolepsie il y a la recherche du polymorphisme DQB1\*0602 au niveau du gène HLA-DQB1 codant la chaine beta 1 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Nishino et al., 2000, Okun et al., 2002). De fait, dans la population caucasienne jusqu'à 95% des patients atteints de narcolepsie présentent ce polymorphisme (Okun et al., 2002). La narcolepsie peut également se diagnostiquer par le dosage de l'orexine dans le LCR (Kanbayashi et al., 2002, Krahn et al., 2002, Dauvilliers et al., 2003). En effet chez l'Homme, atteint de narcolepsie l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) révèle que pour 95% des patients testés, il ne contient aucune trace détectable d'orexine (Nishino et al., 2000, Mayo et al., 2015). Par ailleurs des autopsies post-mortem ont révélé une chute considérable (85-100%) de la quantité d'ARNm de la prépro-orexine et l'absence du neuropeptide dans l'hypothalamus (Peyron et al., 2000, Thannickal et al., 2003). Pour autant les études entreprises à grandes échelles pour détecter des mutations et des polymorphismes dans les gènes de la signalisation orexinergiques n'ont pas permis d'établir un lien entre la pathologie et les gènes codants le peptide ou ses récepteurs (Peyron et al., 2000, Olafsdottir et al., 2001). Par ailleurs le cas de jumeaux monozygotes porteurs du polymorphisme DQB1\*0602, atteints de narcolepsie mais sans anormalités de la concentration d'orexine dans le LCR et sans mutation dans les gènes de la signalisation orexinergique a été rapporté dans The Lancet (Khatami et al., 2004). Ces observations suggèrent que le phénotype narcoleptique pourrait se développer indépendamment de la signalisation orexinergique ou alors qu'il n'est pas encore possible à l'heure actuelle d'identifier un potentiel partenaire moléculaire en aval des récepteurs orexinergiques (Hungs et al., 2001, Baumann and Bassetti, 2005).

Différents modèles animaux ont conforté l'hypothèse d'un lien entre la signalisation orexinergique et la narcolepsie. Chez le chien un phénotype narcoleptique a été observé et corrélé à des mutations congénitales ou sporadiques dans le gène codant pour OX2R auquel peut s'ajouter un défaut de production d'orexine (Lin et al., 1999, Nishino et al., 2001, Ripley et al., 2001). Ce même phénotype peut être induit chez la souris génétiquement modifiée chez qui on bloque l'expression du gène codant la prépro-orexine ou de OX1R et OX2R (Chemelli et al., 1999, Yamanaka et al., 2003a). Chez le rat également la déplétion des neurones orexinergiques entraine un phénotype narcoleptique (Haynes et al., 1999, Beuckmann et al., 2004). Il a été montré sur des souris déficientes en orexine qu'une administration d'orexine A ou de prépro orexine reverse le phénotype narcoleptique (Mieda et al., 2004).

A noter qu'un défaut de la signalisation orexinergique a été soupçonné dans le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce (Dhondt et al., 2013). Ce syndrome et l'implication potentielle de l'orexine feront l'objet d'une partie dans le chapitre III.

Ainsi l'ensemble de ces résultats suggère que les neurones orexinergiques ont un lien fonctionnel leur permettant d'intervenir dans la modulation de la CCR en modulant directement ou indirectement l'activité des neurones appartenant à des structures impliquées dans la genèse et dans l'adaptation de la CCR. Cette contribution de la signalisation orexinergique serait essentiellement sous tendue par ses propriétés chémosensibles. En effet des études ont montré qu'antagoniser cette signalisation pendant la ventilation de base n'entrainait aucune modification (Dias et al., 2009, Dias et al., 2010, Li and Nattie, 2010). Les propriétés chémosensibles de ces neurones seront argumentées dans le chapitre II. La mise en perspective de ces observations avec les effets pléiotropes de l'orexine évoqués plus haut met en lumière l'importance que revêt ce neuropeptide à l'interface entre différentes fonctions physiologiques et l'impact qu'a eu sa découverte sur la communauté scientifique.

# Chapitre II : La chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>

Comme indiqué dans le chapitre 1, la CCR s'adapte constamment contribuant ainsi à l'homéostasie en maintenant à des valeurs physiologiques le pH sanguin, les valeurs de pressions partielles artérielle et tissulaire en dioxyde de carbone (PaCO<sub>2</sub> et PtCO<sub>2</sub>) et en dioxygène (PaO<sub>2</sub> et PtO<sub>2</sub>). Tout phénomène qui induit un glissement hors des valeurs de consignes enclenche des mécanismes qui influencent le réseau l'origine de la CCR, permettant de maintenir les valeurs de ces grandeurs dans la gamme physiologique. Ce travail doctoral a été axé sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie, il serait hors propos ici de relater tous les mécanismes et structures inhérentes à la réponse respiratoire à l'hypoxie, dans ce chapitre, seront détaillés les mécanismes et les structures responsables de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  ainsi que leur interaction avec l'ensemble des autres composantes du réseau respiratoire.

#### I- La réponse respiratoire aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>

Chez les Mammifères la PaCO<sub>2</sub> est aux alentours de 40 mmHg ou 5,3 kPa (Nattie, 1999). Cette valeur est le reflet de l'équilibre entre la production métabolique de CO<sub>2</sub> par les cellules et l'efficacité de la clairance du CO<sub>2</sub> par la ventilation alvéolaire. Par exemple, une diminution de la ventilation alvéolaire avec un débit constant de production de CO<sub>2</sub> induit une augmentation de la PaCO<sub>2</sub>. Une valeur de PaCO<sub>2</sub> supérieure à la normale est détectée par les chémorécepteurs aux CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> qui vont contribuer à un retour aux valeurs physiologiques en modulant la CCR. Une variation de 0,5 kPa de la PaCO<sub>2</sub> suffit à induire une augmentation notable de la ventilation, concernant la réponse à l'hypoxie elle ne s'observe que lorsque la PaO<sub>2</sub> chute fortement (par exemple de 14 kPa à environ 8 kPa) (Nattie, 1999). Cette observation suggère que la PaCO<sub>2</sub> est avant la PaO<sub>2</sub>, la variable la plus contrôlée dans la régulation de la ventilation. La réponse respiratoire au CO<sub>2</sub> peut s'exprimer en L·min<sup>-1</sup>/mmHg, ce qui représente la ventilation (en L·min<sup>-1</sup>) pour une valeur de PaCO<sub>2</sub> (en mmHg). Cette réponse peut être évaluée selon deux critères : la valeur seuil de PaCO<sub>2</sub> à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation et; le coefficient directeur de la droite représentant la ventilation en fonction de la PaCO<sub>2</sub> qui traduit la sensibilité du chémoréflexe ventilatoire. Ce chémoreflexe est réputé très sensible dans la mesure où pour 2mmHg de plus de PaCO<sub>2</sub> la ventilation s'en retrouve doublée (Nattie, 1999). Pendant le sommeil la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez l'Homme adulte est diminuée par rapport à l'éveil, la valeur seuil de déclenchement de la réponse est décalée vers des valeurs plus hautes de PaCO<sub>2</sub> tandis que le chémoréflexe ventilatoire chute de 72% pendant le sommeil REM et d'un peu plus de la moitié pendant le sommeil non-REM (Douglas et al., 1982). Ce phénomène suggère que les mécanismes qui sous-tendent la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (la nature, la sensibilité, le nombre des chémorécepteurs centraux et périphériques au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> recrutés ou encore les sites d'intégration des messages issus de ces chémorécepteurs) sont directement ou indirectement corrélés aux états de vigilance et qu'ils sont moins actifs et/ou efficaces pendant le sommeil que pendant l'éveil. Cette diminution de la réponse respiratoire à l'hypercapnie pendant le sommeil ne présente pas de danger particulier chez l'Homme sain en revanche dans un contexte pathologique elle peut être plus lourde de conséquences. Cette diminution de la réponse a été associée la survenue d'épisodes apnéiques et hypoxémiques avec désaturations sévères notamment chez des patients atteints de broncho pneumopathie chronique obstructive chez qui s'ajoute une ventilation moins efficace (Flick and Block, 1977, Douglas, 1984).

Les premières études réalisées chez l'Homme ont indiqué que la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  était réduite chez les nourrissons prématurés. Les enfants avaient une réponse à l'augmentation du  $CO_2$  en termes de volume courant mais avec une augmentation de la fréquence respiratoire limitée. Ensuite cette réponse augmente chez les nourrissons au fur et à mesure du développement jusqu'à se stabiliser aux alentours de 8 semaines de vie (Krauss, 1975, Rigatto et al., 1975, Frantz et al., 1976, Sovik and Lossius, 2004).

Chez les rats nouveau-nés, le contrôle respiratoire est soumis à un développement postnatal au cours duquel il mature et est caractérisé par des périodes dites sensibles pendant lesquelles le contrôle respiratoire répond aux stimulations hypercapniques (Carroll, 2003, Wong-Riley and Liu, 2005, Liu et al., 2006, Holley et al., 2012). Les premiers rapports sur des rats nouveau-nés ont indiqué que la réponse à l'hypercaphie était très modeste dans les 2 premières semaines après la naissance (Bamford et al., 1996). Comme chez l'Homme les auteurs ont noté qu'il y avait peu d'effet de l'augmentation du CO<sub>2</sub> sur la fréquence respiratoire durant les premiers jours de vie alors que le volume courant augmentait. La réponse en termes de fréquence était observée à partir de P18 (Bamford et al., 1996, Abu-Shaweesh et al., 1999). Stunden et collaborateurs ont décrit les changements de la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez les rats nouveau-nés âgés de P1 à P21 (Stunden et al., 2001). Dans un premier temps, ils ont décrit que la réponse au CO<sub>2</sub> de P1 à P5 était vigoureuse avec une augmentation importante du volume courant et modeste de la fréquence respiratoire. Par la suite, la réponse diminuait jusqu'à atteindre son point le plus bas à P8. À P21 la réponse avait augmenté jusqu'à atteindre un plateau. Ainsi il semblerait que la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub> pendant la période néonatale précoce soit dominée par des augmentations de volume courant et dans une moindre mesure de la fréquence respiratoire (Saiki and Mortola, 1996, Stunden et al., 2001). Pour autant les résultats obtenus sur le fait que l'augmentation de la fréquence respiratoire soit modérée par rapport à celle du volume courant varient selon les études (Putnam et al., 2005). Serra et collaborateurs ont rapporté qu'il y avait une réponse respiratoire pendant la période postnatale immédiate (P1-P3), avec une augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant (Serra et al., 2001). Environ 1 semaine après la naissance (P6-P7) les auteurs n'observent pratiquement aucune réponse, tandis qu'après 3-4 semaines la réponse approche celle obtenue chez les adultes (Serra et al., 2001). De plus cette augmentation de la fréquence respiratoire en réponse à une augmentation du CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> est observable sur des préparations ex vivo, un modèle réalisé sur des rongeurs nouveau-nés âgés de PO à P4 (Harada et al., 1985, Gestreau et al., 2010).

#### II- La chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>

Pour répondre à l'appellation de chemorécepteurs centraux au  $CO_2/H^+$ , la cellule en question doit présenter les caractéristiques suivantes (*i*) posséder des propriétés intrinsèques leurs conférant une sensibilité directe aux variations de  $CO_2/H^+$  se traduisant par une augmentation ou une diminution de leur fréquence de décharge, (*ii*) être en mesure de répercuter cet effet de façon appropriée en termes d'activité respiratoire, c'est-à-dire d'induire une modification mesurable de la respiration sous-tendus par des connexions synaptiques directes ou indirectes avec les générateurs (Richerson et al., 2005, Hodges and Richerson, 2010). Dans ce manuscrit le terme chémosensibles sera utilisé pour définir les cellules capables de réagir aux variations de  $CO_2/H^+$  sans pour autant répondre à l'appellation de chémorécepteur.

Deux hypothèses coexistent concernant le mécanisme qui permet aux chémorécepteurs de détecter les variations de PaCO<sub>2</sub>. Soit les chémorécepteurs ont une sensibilité directe au CO<sub>2</sub> dissous. En effet le CO<sub>2</sub> a la propriété d'être soluble dans le sang ce qui lui donne une haute capacité de diffusion (Nattie, 1999). De plus de nombreuses structures aux propriétés chémosensibles semblent être localisées à proximité de la circulation sanguine leur conférant un accès rapide à la PaCO<sub>2</sub> (Nattie, 1999, Okada et al., 2002). Soit les chémorécepteurs sont sensibles aux variations de H<sup>+</sup> qui sous-tendent le pH. En effet d'après l'équation : CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>, une augmentation du CO<sub>2</sub> se traduit en une augmentation de la concentration en H<sup>+</sup> et donc en une diminution du pH extracellulaire. Au vu des données de la littérature cette dernière hypothèse semble être la plus privilégiée (Nattie, 1999, Lahiri and Forster, 2003, Chernov et al., 2010, Guyenet et al., 2010a, Guyenet et al., 2010b, Guyenet et al., 2013, Guyenet, 2014, Guyenet and Bayliss, 2015), néanmoins il sera écrit tout le long de ce manuscrit chémorécepteur au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>.

#### II.1- La chémosensibilité périphérique au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>

Des chémorécepteurs périphériques capables de détecter des variations de  $CO_2/H^+$ seraient localisés au niveau des corps carotidiens et des corps aortiques. Des enregistrements réalisés par Lahiri et Delaney sur les fibres nerveuses du nerf carotidien de chat ont montré que les corps cellulaires dont étaient issus ces fibres augmentaient leur activité en réponse à une élévation de la PaCO<sub>2</sub> (Lahiri and DeLaney, 1975b). Ils ont la même année corrélé cette augmentation d'activité en réponse à une élévation de la PaCO<sub>2</sub> à une augmentation de la ventilation (Lahiri and DeLaney, 1975a). En comparant la réponse respiratoire à l'hypercapnie hyperoxique chez le chat avant et après transsection des fibres nerveuses provenant des corps carotidiens, des auteurs ont pu évaluer la contribution relative des chémorécepteurs périphériques et ont conclu que cette contribution s'élevait à hauteur de 20 à 50 % (Heeringa et al., 1979). Pour autant il semblerait que la contribution des afférences périphériques dans la réponse respiratoire à l'hypercapnie soit débattue. En effet, de nombreuses études affirment que la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  est essentiellement imputable aux chémorécepteurs centraux (Schlaefke et al., 1979a, Schlaefke et al., 1979b, Nattie et al., 1988, Panisello and Donnelly, 1998). Par ailleurs Pan et collaborateurs ont entrepris sur la chèvre adulte d'apprécier l'effet au cours du temps d'une dénervation des corps carotidiens sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Pan et al., 1998). Cette étude a révélé que la dénervation de ces derniers diminuait la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> de façon transitoire dans la mesure où, après 15 jours la réponse respiratoire à l'hypercapnie revenait aux valeurs basales. Ce résultat sous-entend qu'un mécanisme compensatoire a été mis en jeu et mets en lumière la plasticité du contrôle nerveux de la respiration.

#### II.2- La chémosensibilité centrale au CO2/H+

En montrant que des injections de solutions acides dans le 4<sup>ème</sup> ventricule de chats anesthésiés stimulaient la ventilation, Loeschke et collaborateurs ont suggéré les premiers l'existence de chémorécepteurs sensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> au niveau du tronc cérébral caudal (Loeschcke et al., 1958). Au début des années 60 Mitchell et collaborateurs ont suggéré que les chémorécepteurs en question étaient localisés à la surface ventrale du bulbe rachidien. Les expériences réalisées dans cet article sur le chat anesthésié consistaient à appliquer des plumasseaux imbibés de solution acide à divers endroits de la surface du bulbe rachidien, en cas d'augmentation de la ventilation les auteurs présumaient que des neurones chémorécepteurs résidaient dans le tissu sous-jacent immédiat (Mitchell et al., 1963). Des expériences ultérieures réalisées chez le rat ont confirmé que l'augmentation de la ventilation était observée en cas de superfusion avec une solution enrichie en CO<sub>2</sub> sur la surface ventrale mais pas dorsale du bulbe rachidien (Hori et al., 1970). L'interprétation des résultats issus de ces méthodes, à la résolution anatomique limitée, est sujette à la controverse notamment de par le fait que les résultats obtenus peuvent être imputables à une acidification de structures plus profondes qui reçoivent leur approvisionnement en sang via les artérioles de la surface ventrale (Fencl et al., 1966, Loeschcke, 1982, Guyenet, 2014). C'est ensuite avec l'essor et la sophistication des enregistrements électrophysiologiques in vivo que la communauté scientifique va être en mesure d'explorer le réseau respiratoire du bulbe rachidien. Les enregistrements d'activités de neurones effectués in vivo en cas de microinjection de l'inhibiteur de l'anhydrase carbonique acétazolamide qui produit une acidose tissulaire focale a permis d'avancer dans la compréhension des neurones respiratoires qui composent le réseau respiratoire (Severinghaus, 1998). Cette approche a permis d'identifier des structures chémosensibles dans différentes régions du tronc cérébral notamment sur la surface ventrale du bulbe rachidien (Coates et al., 1993) des résultats qui étaient en accord avec les premiers obtenus (Mitchell et al., 1963, Schlaefke et al., 1970), dans le locus coeruleus et le NTS (Coates et al., 1993), dans les noyaux des raphé (Bernard et al., 1996) ainsi qu'au niveau du VRGr (Nattie and Li, 1996). D'autres part les enregistrements réalisés sur des tranches issues de différents niveaux du bulbe rachidien et du pont caudal ont conduit caractériser ces structures. Ainsi des cellules de ces structures, capables de modifier leur pattern de décharges en réponse à une fluctuation physiologique du pH, ont été proposées comme chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Dean et al., 1989, Dillon and Waldrop, 1992, Richerson, 1995, Pineda and Aghajanian, 1997). Une des limites du modèle de tranche d'encéphale est qu'il ne permet pas toujours d'établir un lien entre les modifications de la fréquence de décharge d'un neurone et un potentiel effet en aval sur l'activité de la CCR. L'enregistrement de l'activité des axones des motoneurones phréniques directement sur des préparations *ex vivo* qui contiennent le plus souvent le bulbe rachidien et la moelle épinière permet lui d'établir un lien fonctionnel. Ainsi les résultats découlant de cette approche avec les enregistrements de neurones obtenus *in vivo* appuyés par des résultats d'immunohistochimie ont abouti à l'identification d'un nombre relativement réduit de structures répondant à l'appellation de chémorécepteurs centraux au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Coates et al., 1991, Issa and Remmers, 1992, Larnicol et al., 1994, Kawai et al., 1996, Teppema et al., 1997). A l'heure actuelle on considère que trois structures répondent à cette appellation : les neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG (Mulkey et al., 2004, Stornetta et al., 2006, Guyenet and Bayliss, 2015), les neurones sérotoninergiques des noyaux des raphés RPa et Rob (Wang et al., 2001b, Hodges et al., 2004) et les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Pineda and Aghajanian, 1997, Biancardi et al., 2008). En marge de ces structures, de nombreuses autres ont été décrites comme étant chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et peuvent de façon non négligeable contribuer en fonction de différents paramètres physiologiques, au développement d'une réponse respiratoire adaptée aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>.

III- Les structures respiratoires chémoréceptrices et chémosensibles au  $CO_2/H^+$  ponto-bulbaires

### III.1- Le noyau retrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial

Comme dis dans le Chapitre I le RTN est anatomiquement assimilé au moins en partie au pFRG (Onimaru and Homma, 2003, Feldman and Del Negro, 2006). Cette structure fait référence à un ensemble de neurones situés à proximité de la surface ventrale du bulbe rachidien qui sont par rapport au noyau facial ventromédian et ventrolatéral en ce qui concerne respectivement le RTN et le pFRG. Voilà maintenant environ 50 ans, que des travaux ont suggéré que des neurones chémorécepteurs aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> étaient localisés au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien (Mitchell et al., 1963, Loeschcke, 1982). La cartographie des structures activées par une exposition à une hypercapnie in vivo et ex vivo, grâce la détection de la protéine c-FOS a effectivement identifié des neurones activés situés dans cette région (Sato et al., 1992, Teppema et al., 1994, Teppema et al., 1997, Belegu et al., 1999, Okada et al., 2002). Au vu des données actuelles une partie au moins des neurones identifiés dans les années 60 à 80 devrait correspondre aux neurones du RTN/pFRG. En effet, bien que sans identification formelle les études entreprises par Li et Nattie, ont montré que dans cette région du bulbe rachidien des neurones étaient, en réponse à une acidification locale et à des concentrations croissantes de CO<sub>2</sub>, capables d'augmenter la réponse du nerf phrénique chez le rat d'autant plus que la concentration en CO<sub>2</sub> est élevée (Li and Nattie, 1997, Li and Nattie, 2002). Ces neurones seraient donc aptes à répondre de manière spécifique et réversible à des variations de la concentration physiologique de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et de surcroit d'influencer de façon proportionnelle la CCR. Un autre argument en faveur du fait que les neurones de la surface ventrale du bulbe rachidien soient des bons candidats pour l'appellation de chémorécepteurs centraux aux CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> est qu'ils sont connectés anatomiquement avec les structures bulbaires et pontigues responsables de la rythmogénèse (Pearce et al., 1989, Smith et al., 1989, Ellenberger and Feldman, 1990, Feldman et al., 2003,

Weston et al., 2004). Depuis l'article publié dans Nature Neuroscience par Mulkey et collaborateurs en 2004, a fait date en identifiant aussi bien d'un point de vue fonctionnel que phénotypique les neurones de la surface ventrale du bulbe rachidien. Dans cet article les auteurs ont montré in vivo que les neurones du RTN présentent une augmentation de leur fréquence de décharge en hypercapnie (Figure 13). Cette réponse reste présente chez l'animal chémodénervé suggérant qu'elle est indépendante des chémorécepteurs périphériques. En réalisant un blocage pharmacologique du préBotz tout en enregistrant l'activité des neurones du RTN, les auteurs ont montré que ces derniers continuent à augmenter leur fréquence de décharge en hypercapnie tant et si bien que cela ne serait pas secondaire à l'activation de ce dernier. De plus les auteurs ont confirmé in vitro par des enregistrements intracellulaires que les neurones du RTN sont intrinsèquement chémosensibles au  $CO_2/H^+$  (Figure 13) et ont été en mesure de caractériser une partie des courants ioniques qui sous-tendent cette propriété. Ainsi ces neurones chémorécepteurs au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> localisés à la surface ventrale du bulbe rachidien longtemps recherchés seraient les neurones glutamatergiques du RTN tenant en partie leurs propriétés chémosensibles d'un courant de fuite potassigue, à ce jour identifié comme étant sous-tendu par les canaux TASK-2 (Gestreau et al., 2010). La mise en perspective des études ultérieures à la publication de cet article a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes inhérents au RTN.





A gauche : tracés du haut, fréquence de décharge des neurones du RTN/pFRG en réponse à une augmentation du CO<sub>2</sub> ; tracés du bas, fréquence et intensité de décharge enregistrée au niveau du nerf phrénique. A droite : les variations de pH induisent des changements de la fréquence de décharge d'un neurone du RTN/pFRG enregistré sur tranche en patch-clamp, configuration cellule-attachée. *D'après Mulkey et al., 2004* 

D'un point de vue phénotypique et mécanistique le fonctionnement des neurones du RTN a été source de nombreuses publications. La persistance de l'augmentation de leur fréquence de décharge après l'ajout de tétrodotoxine dans le milieu de superfusion de préparation *ex vivo* de SNC isolé laisse supposer que les neurones pré-inspiratoires localisés à la surface ventrale du bulbe rachidien (au vu des données actuelles vraisemblablement ceux du RTN) ont la propriété intrinsèque d'être chémosensibles (Okada et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que l'application d'un antagoniste de la SP au niveau du RTN réduisait la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, suggérant que les neurones contribuant à la mise en place de cette réponse, en plus d'être glutamatergiques, exprimeraient NK1R (Nattie and Li, 2002b, Nattie and Li, 2006). Par ailleurs, d'autres expériences ont établi que ces mêmes neurones exprimeraient également *Phox2b* (Mulkey et al., 2004, Mulkey et al., 2007a). En effet les expériences d'optogénétique ont révélé que l'activation par lumière pulsée des neurones PHOX2B à qui on fait exprimer des canaux cationiques activés par la lumière (canaux rhodopsine-2) induit une augmentation de la CCR (Guyenet et al., 2009, Pagliardini et al., 2011). La sensibilité au H<sup>+</sup> des neurones du RTN étant inchangée après le blocage des récepteurs ionotropiques au glutamate, à la glycine et au GABA, il semblerait que les mécanismes inhérents à ces récepteurs ne soient pas impliqués (Mulkey et al., 2004). Les canaux TASK-2 (canaux de fuite potassique) semblent quant à eux contribuer à la chémosensibilité des neurones du RTN contrairement aux canaux TASK-1 et TASK-3 (Mulkey et al., 2007b, Gestreau et al., 2010, Wang et al., 2013a). Une étude publiée dans Science en 2015 a dévoilé le rôle prépondérant dans la chémosensibilité des neurones du RTN, d'un autre récepteur jusqu'alors non identifié, le récepteur GPR4 pour guanine nucleotide-binding protein (Kumar et al., 2015). Dans cette étude les auteurs ont établi que l'invalidation du gène codant GPR4 perturbait l'activation des neurones RTN en réponse à une acidification et *de facto* émoussait la réponse ventilatoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Figure 14).

La réintroduction de l'expression de GPR4 permet ensuite de restaurer le phénotype ventilatoire. Les auteurs ont également montré qu'en invalidant de surcroit l'expression de TASK-2, la réponse ventilatoire au  $CO_2$  était abolie. Ils avancent alors l'idée selon laquelle GPR4 et le canal potassique TASK-2 sous-tendent à eux deux la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  des



# Figure 14 : Réponse respiratoire au CO₂ de souris KO pour GPR4 et de souris double KO pour GPR4 et TASK-2.

(A) A gauche tracés représentatifs des enregistrements réalisés en pléthysmographie sur des souris KO pour GPR4 (Jx-GPR4<sup>-/-</sup>) et sur les souris témoins (Jx-GPR4<sup>+/+</sup>) en fonction de différents stimuli hypercapniques. A droite graphique illustrant la ventilation minute des deux lignées de souris testées en fonction des stimuli hypercapniques. \*\*\*\* : p<0,0001 intragroupe † : p<0.0001 intergroupe. (B) Tracés obtenus à partir des enregistrements en patch clamp montrant la fréquence de décharge en fonction du pH de neurones du RTN/pFRG de souris Jx-GPR4<sup>-/-</sup> et de souris témoin. (C) Graphique illustrant la ventilation minute enregistrée en pléthysmographie en réponse à des stimuli hypercapniques. †, différence significative (p<0,0001) entre les témoins et les autres lignées ; \*, différence significative (p<0,05) entre les KO simples et les doubles KO. TASK-2<sup>+/+</sup> lignée témoins pour TASK-2, TASK-2<sup>-/-</sup> souris KO pour TASK-2, TASK<sup>+/+</sup> :GPR4<sup>-/-</sup> lignée témoins pour TASK-2 et GPR4 ; TASK-2<sup>-/-</sup> : GPR4<sup>-/-</sup> souris double KO pour TASK-2 et GPR4. *D'après Kumar et al., 2015*.

neurones du RTN. En résumé les neurones du RTN intrinsèquement chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> possèdent les caractéristiques phénotypiques d'exprimer PHOX2B, NK1R, vGLUT2, TASK-2 et GPR4 (Mulkey et al., 2004, Weston et al., 2004, Li and Nattie, 2006, Stornetta et al., 2006, Gestreau et al., 2010, Kumar et al., 2015).

Cette structure semble par ailleurs être un site d'intégration d'informations d'origines périphériques et centrales. En effet dans la mesure où elle reçoit des afférences issues des neurones PHOX2B du NTSc (Bodineau et al., 2000b, Rosin et al., 2006, Takakura et al., 2006b), il est raisonnable d'envisager que cette structure reçoit indirectement des informations provenant des corps carotidiens. De plus des afférences provenant de la VLM, de l'hypothalamus (aire hypothalamique latérale et noyau hypothalamique paraventriculaire), du KF ou encore du noyau parabrachial (Cream et al., 2002, Rosin et al., 2006, Guyenet et al., 2009) ont été décrites. Ces neurones constitueraient donc un centre d'intégration ce qui leur permettrait d'être en mesure de répondre aux variations de PCO<sub>2</sub>. L'ensemble des données compilées sur le RTN lui vaut la réputation d'être la structure clé de la chémoréception à l'acidification et à l'hypercapnie du tronc cérébral (Putnam et al., 2004, Guyenet, 2014, Guyenet and Bayliss, 2015).

Par ailleurs, des études soulignent le rôle primordial et jusqu'à peu sous-estimé des astrocytes, dans les mécanismes de chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Gourine et al., 2005, Mulkey et al., 2006, Gourine et al., 2010, Huckstepp et al., 2010, Wenker et al., 2010, Guyenet and Bayliss, 2015). Ces cellules gliales auraient la capacité de détecter les variations de pH et de libérer en conséquence des gliotransmetteurs (Gourine, 2005, Gourine et al., 2010, Mulkey and Wenker, 2011). En effet, longtemps considéré comme des éléments de soutien structurel et métabolique aux neurones, on prête maintenant aux astrocytes des fonctions nouvelles. Les astrocytes, étroitement associés aux vaisseaux sanguins de l'encéphale, sont capables de provoquer une vasodilatation ou une vasoconstriction contribuant ainsi à ajuster l'apport sanguin en réponse aux besoins métaboliques locaux (Gordon et al., 2008). De plus un seul astrocyte peut envelopper plusieurs somas neuronaux (Halassa et al., 2007) et être en contact avec des milliers de synapses (Bushong et al., 2002), participant au renforcement du traitement des informations synaptiques (Haydon and Carmignoto, 2006). Ainsi les astrocytes en jouant le rôle d'interface entre les systèmes vasculaires et neuronaux seraient en mesure de relayer rapidement des stimuli systémiques aux réseaux neuronaux. Une étude publiée dans Science par Gourine et collaborateurs a cherché à déterminer la contribution fonctionnelle des astrocytes dans la détection du pH et dans la transmission de ces informations aux structures neuronales qui contrôlent ces paramètres (Gourine et al., 2010). Dans cette étude les auteurs ont apprécié l'effet d'une diminution du pH sur l'activité des astrocytes. Ils ont ainsi montré in vitro que les astrocytes localisés au voisinage du RTN à la surface ventrale du bulbe rachidien répondent à l'acidification en présentant une forte augmentation de leur concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> qui s'accompagne d'une libération d'ATP. Les mêmes expériences ont été réalisées en présence de muscimol (un agoniste GABA<sub>A</sub>) ce qui a pour effet de mettre au silence les neurones du RTN afin de s'assurer que la libération d'ATP n'était pas secondaire à une activation de ces neurones. De plus la stimulation des

neurones du RTN n'entraine pas de modification de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> dans les astrocytes. L'ATP libéré entraine in vitro l'augmentation de l'activité des neurones du RTN. Les auteurs ont ensuite démontré in vivo en activant spécifiquement ces astrocytes grâce à l'optogénétique que cela se traduisait en une augmentation de l'activité du nerf phrénique. La mise en perspective de ces résultats avec les données de la littérature a abouti à l'hypothèse selon laquelle les astrocytes du RTN en libérant de l'ATP en réponse aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> permet d'amplifier l'activité des neurones du RTN et contribue ainsi à élaborer une réponse respiratoire adaptée (Gourine et al., 2005, Mulkey et al., 2006, Gourine et al., 2010, Huckstepp et al., 2010, Wenker et al., 2010, Guyenet and Bayliss, 2015). Une étude a montré par la suite que l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> qui s'accompagne d'une libération d'ATP en réponse à l'acidification n'était pas observée sur des astrocytes corticaux. Cette réponse ne semble donc pas être un mécanisme commun à tous les astrocytes (Kasymov et al., 2013). Différents mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer par quels moyens et dans quelles mesures les astrocytes participent à la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Guyenet and Bayliss, 2015). Ces recherches ouvrent la voie à de futures études sur le rôle des astrocytes dans la régulation de la commande respiratoire.

Pour clore ce paragraphe il est important de noter qu'un des arguments clé en faveur du rôle essentiel du RTN/pFRG est que le dysfonctionnement de cette structure semble être un élément décisif à l'origine d'une pathologie humaine le syndrome d'hypoventilation alvéolaire central congénital ou syndrome d'Ondine (qui fera l'objet d'une partie dans le chapitre III de cette introduction).

#### III.2- Les noyaux des Raphés

De nombreuses études ont avancé que les noyaux des raphés RPa et ROb répondent à l'appellation de chémorécepteurs centraux au  $CO_2/H^+$ .

De nombreuses terminaisons sérotoninergiques sont présentes au niveau du noyau ambigu (Holtman, 1988), du préBotz (Connelly et al., 1989, Ptak et al., 2009), du NTS (Thor and Helke, 1989), du noyau de l'hypoglosse (Henry and Manaker, 1998) ainsi qu'au niveau des motoneurones phréniques (Fuxe, 1965, Holtman et al., 1984, Holtman et al., 1990). Ces éléments suggèrent que la signalisation sérotoninergique est en mesure d'influencer l'activité du réseau à l'origine de l'élaboration de la CCR y compris celle du générateur de l'inspiration. Différentes études ont montré qu'une proportion des neurones sérotoninergiques des RPa, ROb et RMg présentent une augmentation de l'expression de c-FOS en réponse à une hypercapnie in vivo (Larnicol et al., 1994, Haxhiu et al., 1996, Haxhiu et al., 2001, Okada et al., 2002, Johnson et al., 2005a). Par ailleurs des auteurs ont avancé l'argument que la localisation anatomique des neurones du noyau du RPa leur permettraient de détecter fidèlement les variations de PaCO<sub>2</sub> dans le sang (Bradley et al., 2002). En 1995 Richerson apporta des arguments forts en montrant in vitro sur des tranches de bulbe rachidien que des neurones sérotoninergiques appartenant aux noyaux du raphé étaient intrinsèquement sensibles à une augmentation de CO<sub>2</sub> (Richerson, 1995). La poursuite de ces travaux *in vitro* et notamment sur des cultures primaires, a conduit à déterminer qu'une proportion des neurones

sérotoninergiques des noyaux des raphés ROb, RPa et RMg (environ 15%) possèdent des propriétés chémosensibles et qu'ils le seraient d'avantage en réponse aux variations de l'équilibre acido-basique qu'aux variations de CO<sub>2</sub> (Wang et al., 1998, Wang et al., 2001b, Hodges and Richerson, 2010). Des arguments émanant d'études effectuées in vivo ont également été apportés. Chez le chat, des enregistrements réalisés sur les neurones du RPa et ROb ont permis de constater que ces derniers augmentent leur fréquence de décharge en réponse à l'inhalation de CO<sub>2</sub> (Veasey et al., 1995). De plus l'acidification du milieu extracellulaire par acidification tissulaire locale grâce au CO<sub>2</sub> et par inhibition de l'anhydrase carbonique au niveau des noyaux des raphés bulbaires entrainent une augmentation de l'activité du nerf phrénique (Bernard et al., 1996, Nattie and Li, 2001). Une étude a établi par la suite que cette réponse du nerf phrénique était diminuée en cas de lésion chimique des neurones du raphé bulbaire réalisée grâce à une injection locale d'une neurotoxine excitatrice (Dreshaj et al., 1998). Par ailleurs, des expériences de perte de fonction ont montré que la lésion spécifique des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé via l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le transporteur sérotoninergique conjugué à la saporine, induisait une dépression de la réponse à l'hypercapnie chez le rat (Nattie et al., 2004, da Silva et al., 2011). Comme supputé la stimulation électrique in vivo des noyaux des raphés entraine une libération de 5HT notamment au niveau du NTS et des motoneurones phréniques (Brodin et al., 1990). Des expériences ont montré que cette libération, induite par une stimulation électrique, avait des répercussions directes sur l'activité du nerf phrénique, et que cette augmentation d'activité était abolie en présence d'un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2B/2C</sub>, le méthysergide (Lalley, 1986, Millhorn, 1986, Holtman et al., 1987). Ainsi les neurones du raphé seraient capables de répercuter leurs modifications d'activité aux acteurs de la CCR et de traduire cela en effet sur la respiration. Par ailleurs une étude employant des souris génétiquement modifiées avec disparition quasi-complète des neurones sérotoninergiques du SNC (Zhao et al., 2006) (mutation du gène lmx1b codant pour un facteur de transcription qui affecte spécifiquement les neurones 5HT) a quant à elle montré que cela s'accompagne d'une réponse à l'hypercapnie diminuée de moitié tandis que la ventilation basale ainsi que la réponse à l'hypoxie demeurent intactes (Hodges et al., 2008). Ce phénotype est restauré après administration intracérébroventriculaire de 5HT (Hodges et al., 2008). Par ailleurs il est important de noter que la signalisation sérotoninergique varie en fonction de l'état de vigilance (Heym et al., 1982, Richerson, 2004, Prasad et al., 2010). En effet il a notamment été décrit une diminution de la facilitation sérotoninergique sur les neurones moteurs des voies aériennes supérieures pendant le sommeil REM (Kubin et al., 1996, Prasad et al., 2010). Cette diminution de la signalisation sérotoninergique a été proposée comme pouvant être un des mécanismes à l'origine de la vulnérabilité au collapsus des voies aériennes supérieures dans le cadre de l'apnée obstructive du sommeil (Heym et al., 1982, Fenik et al., 2005, Prasad et al., 2010). Dans cette logique, la diminution de la réponse au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> constatée pendant le sommeil REM pourrait, au moins en partie, être due à la perte de la facilitation sérotoninergique (Richerson, 2004). Par ailleurs des études in vitro ont révélé que la contribution des neurones 5HT à la réponse respiratoire à l'hypercapnie pourrait dépendre du stade de développement. En enregistrant l'activité des neurones des raphés bulbaires, il a été montré que ces derniers commencent à présenter une réponse à l'hypercapnie 12 jours après la naissance, réponse qui devient significative après 20 jours (Wang and Richerson, 1999).

Malgré ces éléments concrets et sérieux d'autres équipes et d'autres travaux tout aussi sérieux réfutent l'appellation de chémorécepteurs centraux pour les neurones sérotoninergiques. En 2005, Guyenet et collaborateurs signent un article dans lequel ils contestent les arguments apportés par Richerson et son équipe (Guyenet, 2005, Richerson et al., 2005). Ils réfutent notamment la pertinence des résultats avancés dans l'article de Veasey et al en 1995 en soulignant le fait que le caractère sérotoninergique des neurones enregistrés n'a pas été démontré et qu'il est impossible d'écarter dans cette étude le fait que l'effet observé soit dû à une influence des chémorécepteurs périphériques ou du RTN/pFRG (Veasey et al., 1995). Ils réfutent également les résultats obtenus in vivo via des modèles expérimentaux qui visent à réaliser une acidification tissulaire locale (Bernard et al., 1996, Nattie and Li, 2001) dans la mesure où bien qu'intéressant il n'a jamais été prouvé que ces procédures miment sur les neurones en question l'effet d'une acidose respiratoire. De plus les effets provoqués par l'acidification effectuée au niveau des noyaux des raphés bulbaires pourraient tout aussi bien être sous-tendus par des neurones non-sérotoninergiques étant donné que ces régions contiennent une grande variété de types cellulaires (Guyenet, 2005). Par ailleurs compte tenu des nombreux effets des neurones sérotoninergiques sur la respiration le fait que leur destruction (Dreshaj et al., 1998, Nattie et al., 2004, da Silva et al., 2011) atténue la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  ne constituent pas à leurs yeux des preuves convaincantes pour affirmer que les neurones sérotoninergiques soient des chémorécepteurs au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Enfin Guyenet et al discutent l'hypothèse de Richerson et collaborateurs selon laquelle seule une faible proportion des neurones sérotoninergiques sont des chémorécepteurs ce qui pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus par Mulkey et collaborateurs (Mulkey et al., 2004). Selon les auteurs cette hypothèse introduit une autre contradiction à savoir : pourquoi tant de neurones sérotoninergiques, quelle que soit la localisation anatomique (noyau des raphés dorsal ou bulbaire) (Richerson et al., 2001, Washburn et al., 2002), répondent à l'acidification in vitro alors que si peu de ces neurones présentent une réponse même marginalement détectable in vivo (Veasey et al., 1995, Mulkey et al., 2004). Ainsi de façon générale Guyenet et collaborateurs objectent les arguments que Richerson et collaborateurs avancent comme des preuves et soulignent l'un des principaux problèmes qui assaille le domaine de la chémoréception centrale, à savoir la difficulté d'extrapoler les données in vitro à la situation in vivo.

Pour autant le fait que les neurones sérotoninergiques apportent une contribution à la réponse respiratoire à l'hypercapnie n'est pas pour autant à écarter, des études ont notamment soulignés le fait que la chémosensibilité des neurones sérotoninergiques pourrait dépendre de l'âge (Wang and Richerson, 1999) ainsi que du fait que les neurones du raphé puissent constituer un centre d'intégration. En effet tout comme les neurones du RTN/pFRG les neurones des raphés RPa et ROb reçoivent des afférences provenant de l'hypothalamus (incluant les aires hypothalamiques latérales et postérieures, et le noyau hypothalamique

dorsomédian), le noyau parabrachial, le KF, le NTS ou encore le LC (Aghajanian and Wang, 1977, Morrison et al., 1994, Verner et al., 2008).

# III.3- Le groupe parapyramidal

Comme dit précédemment (cf: Chapitre I, IV.2.4- Le groupe parapyramidal) les neurones sérotoninergiques du groupe parapyramidal ont été décrits comme sensibles à l'hypercapnie (Bradley et al., 2002, Richerson, 2004). Au même titre que les noyaux des raphés RPa et ROb, la localisation de ce groupe de neurones au voisinage de artère vertébrale et au contact direct du liquide céphalo-rachidien est avancée comme un argument en faveur du fait qu'ils soient capables de ressentir des variations de PaCO<sub>2</sub> et de pH respectivement (Bradley et al., 2002). Par ailleurs, des connexions ont été décrites entre ces neurones et ceux du ROb et RPa (Gaytan and Pasaro, 1998) ainsi que ceux du NTS et du VRG, des connexions pouvant justifier une possible implication dans la modulation de la CCR (Thor and Helke, 1989, Stornetta and Guyenet, 1999, Ribas-Salgueiro et al., 2006). De plus, Berquin et collaborateurs ont montré que des neurones appartenant à cette structure présentaient une augmentation de l'expression de *c-fos* induite par l'hypercapnie (Berquin et al., 2000a). Enfin des enregistrements électrophysiologiques in vivo ont montré qu'une augmentation par microiontophorèse au niveau du groupe parapyramidal de la concentration en H<sup>+</sup> entraine une augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones (Ribas-Salgueiro et al., 2005), suggérant que ces derniers soient intrinsèquement sensibles à ces variations. Pour autant au même titre que pour les neurones des noyaux du raphé la contribution de ces neurones à la réponse respiratoire à l'hypercapnie est sujette à discussion (Mulkey et al., 2004).

#### III.4- Noyau du tractus solitaire

En 1983 Richard Miles a montré en utilisant des préparations ex vivo de tranche de bulbe rachidien que des neurones du vINTS présentaient une augmentation de leur fréquence de décharge en réponse à une acidification du liquide de superfusion sans pour autant démontrer si il s'agit d'une propriété intrinsèque (Miles, 1983). Ensuite in vivo des expériences visant à acidifier le milieu extracellulaire au moyen de microinjections au niveau du NTS ont été entreprises et ont montré cela entrainait une augmentation de la ventilation suggérant la présence de chémorécepteurs sensibles aux ions H<sup>+</sup> dans cette structure (Coates et al., 1993, Ritucci et al., 1997). En employant une technique d'acidification locale plus précise par microsuperfusion, Nattie et Li en sont venus aux mêmes conclusions en démontrant en plus que l'activation des neurones de la partie caudale du NTS en réponse au stimulus était observable aussi bien pendant l'éveil que pendant le sommeil (Nattie and Li, 2002a). Par ailleurs, la destruction d'environ 75% des neurones du NTS via des injections bilatérales d'acide kaïnique ainsi que l'inhibition de ces derniers par micro-injections de muscimol (un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) entraine in vivo une importante diminution de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Berger and Cooney, 1982, Nattie and Li, 2008). Toujours in vivo il a été montré qu'une exposition à un mélange gazeux hypercapnique entrainait l'expression de *c-fos* dans les neurones du NTS (Sato et al., 1992). Cette induction de c-FOS serait proportionnelle à l'intensité du stimulus hypercapnique (Teppema et al., 1997) et ne serait pas secondaire à une influence des récepteurs périphériques dans la mesure où, la chémodénervation des corps carotidiens ne modifie en rien le profil d'activation des neurones du NTS (Jansen et al., 1996). A l'issu de doubles détections réalisées il est apparu que les neurones du NTS activés par un challenge hypercapnique exprimeraient, le GABA (Zhang et al., 2003), et l'ARNm de la préprotachykinin, le précurseur de la SP et de la neurokinine A (Pete et al., 2002). Par ailleurs Dean et collaborateurs, en travaillant sur des tranches de bulbe rachidien de rat contenant le NTS et en les exposant à une hypercapnie ont montré que cela entrainait une dépolarisation de ces neurones (Dean et al., 1989). Par la suite ils ont démontré par des enregistrements intra et extracellulaires que cette dépolarisation n'était pas secondaire à un influx provenant d'autres neurones, de fait cette réponse persiste en cas de blocage synaptique (Dean et al., 1990). Ces observations ont été confirmées et étayées par de nombreux autres travaux. Ainsi une proportion importante des neurones du NTS seraient intrinsèquement sensibles aux variations de  $CO_2/H^+$  et principalement concentrés dans la zone la plus caudale de cette région. Il est apparu également qu'une proportion plus faible de neurones du NTS étaient inhibés par une élévation de  $CO_2/H^+$  et que le reste des neurones ne répond pas (Huang et al., 1997, Mulkey et al., 2003, Conrad et al., 2009, Nichols et al., 2009).

#### III.5- Le complexe de pré-Bötzinger

L'étude de Solomon et collaborateurs publiée en 2000 a apprécié chez le chat anesthésié, ventilé et bivagotomisé, l'effet d'une acidification au sein du préBotz sur l'activité du nerf phrénique (Solomon et al., 2000). L'étude montre que cette acidification entraine une augmentation de l'amplitude et de la fréquence de décharge du nerf phrénique, suggérant que les neurones du préBotz ont la capacité de détecter et de moduler leur activité en réponse à une augmentation du pH (Solomon, 2003). Pour autant il n'y a à ma connaissance que peu d'études qui étayent ces résultats (Krause et al., 2009).

#### III.6- Locus coeruleus

Les neurones noradrénergiques du LC ont également été proposés comme étant des chémorécepteurs centraux aux CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. En 1981 Elam et collaborateurs sont les premiers à apporter un argument en faveur de cette hypothèse. En enregistrant chez le rat anesthésié avant et après chémodénervation l'activité unitaire des neurones du LC, les auteurs ont montré que ces derniers augmentaient d'autant plus leur fréquence de décharge que le stimulus hypercapnique était important, indépendamment de l'influence des afférences périphériques (Elam et al., 1981). Des travaux en sont venus aux mêmes conclusions chez le rat nouveau-né en réalisant des enregistrements conjoints de l'activité des neurones du LC et de la racine C4 sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé (Oyamada et al., 1998). Les auteurs ont montré que les neurones du LC sont chémosensibles aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et qu'ils sont en mesure de moduler l'activité de la CCR. Pour autant ces études n'excluent pas une

éventuelle participation des neurones du RTN/pFRG à cette réponse des neurones du LC. Par la suite, des propriétés intrinsèques de chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>, ont ensuite été démontrées sur des tranches de bulbe rachidien (Stunden et al., 2001, Nichols et al., 2008, Erlichman et al., 2009, Guyenet et al., 2010a). Par ailleurs, la mise en culture des neurones du LC a permis de mettre en évidence qu'après un blocage pharmacologique des transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices, ces neurones sont toujours stimulés par une élévation de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Johnson et al., 2008). Ainsi les études révèlent que 80% des neurones du LC testés semblent posséder la propriété d'être chémosensibles (Pineda and Aghajanian, 1997, Oyamada et al., 1998, Filosa et al., 2002). Par ailleurs il a été montré in vivo, que l'acidification du milieu extracellulaire au voisinage du LC entraine une augmentation de la ventilation (Coates et al., 1993). Il a également été mis en évidence une augmentation de l'expression de *c-fos* au niveau des neurones du LC après un challenge hypercapnique (Haxhiu et al., 1996, Teppema et al., 1997, Johnson et al., 2005a). In vivo toujours, la lésion des neurones catécholaminergiques et plus particulièrement noradrénergiques du LC diminue significativement la réponse ventilatoire au CO<sub>2</sub> (Li and Nattie, 2006, Biancardi et al., 2008). L'ensemble de ces résultats laisse suggérer que les neurones du LC répondent à l'appellation de chémorécepteurs centraux au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>.

Pour clôturer ce paragraphe il est important de noter que le LC pourrait être impliqué dans le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale qui se caractérise par une absence ou une réduction importante de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. En effet une récente étude a montré sur des encéphales issus de patients que ces derniers présentaient une anomalie structurelle au niveau du LC. En appuyant ces résultats avec des modèles de souris mutantes pour le gène *Phox2b* (ce modèle de souris sera de nouveau évoqué dans le Chapitre III, II.3.2.2 Expression de PHOX2B), les auteurs apportent des arguments forts en faveur d'une implication de ces neurones dans cette pathologie neuro-respiratoire (Nobuta et al., 2015).

# IV- Les structures respiratoires chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> suprapontiques

#### IV.1- La substance grise périaqueducale

Les neurones de la PAG ont principalement été décrits pour leurs rôles dans les comportements de défense et de stress et, comme évoqué précédemment, pour le fait de présenter des propriétés chémosensibles aux  $CO_2/H^+$ . Des faits soutiennent l'hypothèse que ces deux éléments, coexistant au sein de la PAG, pourraient être liés. En effet un lien fort a été établi entre la réponse physiologique au stress et le contrôle nerveux de la respiration (Klein, 1993, Gorman et al., 2000, Kinkead et al., 2014). Les personnes sujettes aux attaques de paniques présentent un seuil de détection au  $CO_2/H^+$  ainsi qu'une réponse respiratoire à l'hypercapnie augmentée (Klein, 1993). Ainsi il a été proposé que les attaques de paniques pourraient être en partie dues aux structures chémosensibles du SNC qui détectent de façon erronée une augmentation de la PCO<sub>2</sub> et enclenchent les circuits neuronaux impliqués dans la réponse physiologique au stress (Klein, 1993). La PAG, sous réserve d'être chémosensible au  $CO_2/H^+$ , pourrait être partie prenante de ce phénomène. C'est dans ce contexte que Lopes et

collaborateurs ont testé l'effet d'une destruction chimique de la PAG dorsolatérale, dorsomédiane et ventrolatérale, sur la réponse à l'hypercapnie *in vivo* chez le rat adulte (Lopes et al., 2012). Cette étude a montré que la destruction des subdivisons dorsolatérale, et dorsomédiane de la PAG entrainait une diminution entre 26 et 31% de la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Cette observation mise en perspective avec les résultats obtenus sur la ventilation basale (relatés dans le Chapitre I : IV.3) suggère que l'implication de la PAG dans la CCR pourrait être sous-tendue par le fait qu'elle pourrait contenir des neurones chémosensibles, ou tout du moins faire office de relai entre les structures hypothalamiques chémosensibles aux CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et le réseau respiratoire bulbo-pontique (Ryan and Waldrop, 1995, Horn and Waldrop, 1998). Par ailleurs d'autres études ont montré grâce à la détection de la protéine c-FOS que les neurones de la PAG étaient activés par un stimulus hypercapnique (Teppema et al., 1997, Johnson et al., 2011). Enfin des expériences réalisées *in vitro* sur les neurones de la PAG ont mis en évidence qu'une faible proportion de ces derniers augmentaient leurs fréquences de décharges en réponse à une hypercapnie (Kramer et al., 1999).

### IV.2- Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal

Les neurones sérotoninergiques localisés dans le mésencéphale seraient comme d'autres structures chémosensibles, au voisinage d'artères ici les artères paramédianes du mésencéphale (Severson et al., 2003). Des expériences réalisées sur des tranches de SNC et sur des cellules en culture ont démontré comme pour les noyaux des raphés bulbaires que ces neurones sérotoninergiques augmentaient leurs fréquences de décharges en réponse à des variations de  $CO_2/H^+$  (Severson et al., 2003). Ces observations sont cohérentes avec les résultats d'expériences in vivo qui ont montré qu'une proportion des neurones du noyau du raphé dorsal en réponse à une inhalation de CO<sub>2</sub> augmentent leur fréquence de décharge (Veasey et al., 1997). D'autre part il a été montré qu'une stimulation hypercapnique in vivo s'accompagne d'une induction de la protéine c-FOS dans les neurones sérotoninergiques de cette structure (Johnson et al., 2005a). Pour autant, le raphé dorsal envoie et reçoit très peu d'afférences des acteurs de la CCR et aucune étude ne permet, à ma connaissance, d'établir formellement un lien fonctionnel entre cette structure et le réseau respiratoire. Ainsi, bien que sa chémosensibilité soit avérée, celle-ci permettrait au raphé dorsal de médier des réponses physiologiques aux variations de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> indépendantes du contrôle stricto sensu de la CCR, comme la réponse physiologique et comportementale au stress ou encore contribuait à induire l'éveil pendant le sommeil (Klein, 1993, Berry and Gleeson, 1997, Washburn et al., 2002, Severson et al., 2003, Buchanan and Richerson, 2010, Baccini et al., 2012).

#### IV.3- L'hypothalamus caudal

Comme dit précédemment, des enregistrements unitaires réalisés sur les neurones de l'hypothalamus caudal ont montré qu'ils présentent des décharges liées aux cycles respiratoire et que ces derniers sont stimulés par l'hypoxie et l'hypercapnie chez le chat

anesthésié indépendamment de l'influence des chémorécepteurs périphériques (Dillon and Waldrop, 1993). Ces résultats corroborent ceux obtenus lors d'enregistrements unitaires lors d'un challenge hypercapnique chez le lapin (Cross and Silver, 1963). Il est donc admis qu'une sous-population des neurones de l'hypothalamus caudal est stimulée pendant une hypercapnie à la fois in vivo et in vitro (Cross and Silver, 1963, Dillon and Waldrop, 1992, 1993). Les premiers soupcons ont été apportés en 1962 par Fink et collaborateurs qui ont montré que l'ablation du diencéphale entrainait une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Fink et al., 1962). D'autres résultats soulignant également l'influence excitatrice de l'hypothalamus caudal sur la réponse ventilatoire au  $CO_2$  ont ensuite été obtenus chez le chien (Nielsen et al., 1986). Les travaux réalisés par l'équipe de Waldrop se sont appliqués à documenter ces observations. Ainsi ils ont mis en évidence chez le chat et le rat, que l'influence excitatrice qu'exerçait l'hypothalamus caudal sur la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub> était médiée par des mécanismes GABAergiques (Waldrop, 1991, Peano et al., 1992, Horn and Waldrop, 1994). En effet la micro-injection d'antagonistes GABA<sub>A</sub>ergiques ou d'un inhibiteur de la synthèse du GABA dans l'hypothalamus caudal entraine une augmentation de l'hyperventilation consécutive à l'hypercapnie (Waldrop, 1991, Peano et al., 1992, Horn and Waldrop, 1994). Ces études montrent que des afférences GABA<sub>A</sub>ergiques modèrent l'effet excitateur de l'hypothalamus caudal sur la réponse ventilatoire au CO<sub>2</sub>. Dans la mesure où plupart des afférences GABAergiques reçues par hypothalamus caudal proviendrait d'interneurones locaux, cette modulation est très probablement due à un circuit local au sein même de l'hypothalamus caudal (Tappaz and Brownstein, 1977). Li et Nattie de façon équivalente à des études antérieures ont montré qu'une acidification du milieu extracellulaire localisée au niveau de l'hypothalamus caudal entraine une augmentation de la ventilation durant l'éveil (Li et al., 2013).

A noter que les propriétés chémosensibles de l'hypothalamus caudal relatées ici pourraient tenir en partie au fait que cette région comprend les neurones orexinergiques dont les propriétés chémosensibles feront l'objet du prochain paragraphe.

#### IV.3.1- Les neurones orexinergiques

Comme dit précédemment les neurones orexinergiques envoient des projections dans de nombreuses structures impliquées dans la modulation et la génération de la CCR, leur conférant la possibilité d'influencer le réseau (Peyron et al., 1998, Shahid et al., 2012). Les études qui ont montré que l'antagonisation de la signalisation orexinergique pendant la ventilation de base n'entrainait aucune modification, suggèrent que la contribution de ce neuropeptide à la régulation de la ventilation serait essentiellement sous-tendue par ses propriétés chémosensibles (Deng et al., 2007, Dias et al., 2009, Dias et al., 2010, Li and Nattie, 2010). En effet différents travaux ont mis en avant les propriétés chémosensibles de ces neurones. Sunanaga et collaborateurs ont montré qu'un challenge hypercapnique *in vivo* induit une augmentation de l'expression de c-FOS dans les neurones contenant de l'orexine (Sunanaga et al., 2009). A noter qu'ils observent cette augmentation dans les neurones orexinergiques du noyau dorsomédian et de l'aire périfornicale, mais aucune différence dans

les neurones de l'aire hypothalamique latérale. De plus les auteurs n'écartent pas le fait que cette observation puisse être le résultat d'une activation indirecte des neurones orexinergiques médiée par d'autres neurones et non un effet direct de l'exposition au stimulus hypercapnique. En 2007, une étude publiée dans Proceedings of the National Academy of Sciences, a travaillé sur des souris exprimant le gène codant la GFP placé sous le contrôle du promoteur de la prépro-orexine (Williams et al., 2007). Grace à ce modèle les auteurs ont été en capacité, sur des tranches d'encéphale réalisées au niveau de l'hypothalamus caudal, de pouvoir enregistrer spécifiquement l'activité des neurones orexinergiques de l'aire hypothalamique latérale en réponse à des variations de CO<sub>2</sub> et à des fluctuations du pH dans la gamme physiologique. Ainsi ils ont montré que la fréquence de décharge des neurones orexinergiques était modifiée par ces paramètres, dans le sens où une acidification du milieu extracellulaire augmente la fréquence de décharge, tandis qu'une alcalinisation entraine une hyperpolarisation de la membrane (Figure 15). De plus les auteurs ont montré que l'augmentation de la fréquence de décharge serait due à un courant de fuite potassique probablement sous tendu par un canal potassique appartenant à la famille des canaux des two-pore domain potassium channel.



#### Figure 15 : Effets du pH sur un neurone orexinergique.

Tracés obtenus à partir des enregistrements en patch clamp montrant le potentiel de membrane et la fréquence de décharge en fonction du pH d'un neurone orexinergique. *D'après Williams et al., 2007* 

Il convient de noter que les résultats provenant de différentes études montrent que les neurones orexinergiques répondent différemment à une hypercapnie ou une hypoxie. En effet l'étude immunohistochimique réalisée par Yamaguchi et collaborateurs a évalué l'effet de l'exposition à une hypoxie intermittente (5x5 min) ou à une hypoxie soutenue (25 min) sur l'activité des neurones orexinergiques (Yamaguchi K, 2015). L'étude révèle que ces derniers sont activités en cas d'hypoxie intermittente et que leur niveau d'activité est équivalent à celui observé chez les souris témoins en cas d'hypoxie soutenue. Une étude antérieure de la même équipe avait montré une activation des neurones orexinergiques après une hypercapnie soutenue (Sunanaga et al., 2009). De plus dans cette étude antérieure il avait été montré que les neurones orexinergiques activés par l'hypercapnie étaient localisés au niveau du noyau dorsomédian et de l'aire périfornicale alors que ceux répondant l'hypoxie sont localisés au niveau de l'aire hypothalamique latérale (Yamaguchi K, 2015). Par ailleurs une récente étude réalisée chez le

rat a montré qu'en cas d'exposition à un stimulus hypoxique/hypercapnique les neurones orexinergiques enregistrés au niveau de l'aire hypothalamique latérale présentent une hyperpolarisation de leur potentiel de membrane accompagnée d'une diminution rapide de leur fréquence de décharge jusqu'à quasi complète cessation après seulement 4 min d'exposition (Dergacheva et al., 2016). Ces résultats contradictoires avec l'activation des neurones orexinergiques observée par Yamaguchi et collaborateurs (concernant l'hypoxie) et par Williams et collaborateurs (concernant l'hypercapnie) laissent suggérer que la réponse de ces neurones est complexe et pourrait varier en fonction de la durée de la stimulation (Williams et al., 2007, Yamaguchi K, 2015). Par ailleurs des résultats à priori contradictoires ont été obtenus concernant la réponse des neurones orexinergiques à une hypercapnie. En effet bien que l'étude de Sunanaga et collaborateurs ait montré une activation des neurones orexinergiques suite à une hypercapnie (10% de CO<sub>2</sub> pendant 3H) l'étude de Wang de collaborateurs en dosant les ARNm après une stimulation hypercapnique (10% de  $CO_2$ pendant 3H) montre que la quantité de l'ARNm de l'orexine diminue en comparaison des souris témoins suggérant en diminution de la signalisation orexinergiques en réponse à l'hypercapnie (Sunanaga et al., 2009, Wang et al., 2013b). In vivo, des expériences d'acidification au niveau de l'aire hypothalamique latérale ont révélé que cela entrainait une augmentation de l'activité du nerf phrénique, cette dernière n'était plus observable en cas de la destruction spécifique des neurones orexinergiques (Figure 16) (Song et al., 2012).



Figure 16 : Co-expression de ASIC1a et d'orexine A dans l'aire hypothalamique latérale d'un rat adulte.

Microphotographies représentatives prises en microscopie confocale montrant un neurone double positif (flèche blanche) pour l'orexine A (A, en vert) et ASIC1a (B, en rouge). C: Superposition de A et B. *D'après Song et al., 2012* 

De plus, dans cette étude les auteurs ont mis en évidence que cette augmentation de l'activité du nerf phrénique n'était plus observable en cas de blocage des canaux *Acid-sensing ion channels 1a* (ASIC1a). ASIC1a est un canal sensible aux H<sup>+</sup> et perméable au Na<sup>+</sup> et au Ca<sup>2+</sup> qui, comme le montre cette étude est exprimé par les neurones orexinergiques. Par ailleurs sur un modèle de souris KO pour la prépro-orexine il a été montré que ces dernières présentaient pendant la phase d'éveil (phase pendant laquelle les neurones orexinergiques sont actifs) et non pendant les phases de sommeil (sommeil lent et non-REM) une diminution de la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Nakamura et al., 2007). Sur ce même modèle il a ensuite été montré que l'administration d'orexine A ou d'orexine B permet de restaurer partiellement la réponse

respiratoire normale au  $CO_2/H^+$  (Deng et al., 2007). En bloquant pharmacologiquement la signalisation orexinergique grâce à un antagoniste spécifique de OX1R et OX2R, l'almorexant Li et Nattie ont également mis en évidence chez le rat que cela entrainait une diminution de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  (Li and Nattie, 2010). Des résultats analogues ont été obtenus en antagonisant le récepteur OX1R chez la souris sauvage (Deng et al., 2007). Ensuite, différents travaux ont montré que le fait d'antagoniser le récepteur OX1R au niveau des neurones du RTN, entrainait, pendant la phase d'éveil et de façon moins importante pendant le sommeil, une diminution de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  (Dias et al., 2010). Des expériences complémentaires ont été réalisées en antagonisant le récepteur OX1R au niveau des noyaux RPa et ROb ou encore du LC et ont montré qu'en présence d'antagoniste la réponse respiratoire au  $CO_2$  est diminuée et ce seulement pendant la phase d'éveil (Dias et al., 2010, Vicente et al., 2016).

En résumé les neurones orexinergiques auraient la capacité de capter une augmentation du CO<sub>2</sub>/acidification du milieu extracellulaire et de modifier en conséquence leur fréquence de décharge. L'influence qu'exerce les neurones orexinergiques dépend de l'état de vigilance dans le sens où leur contribution à la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> n'est observable que pendant l'éveil, état pendant lequel ces neurones sont actifs. Cette modification pourrait permettre à ces neurones d'être en mesure de moduler directement ou indirectement l'activité des structures impliquées dans la genèse et dans l'adaptation de la CCR et ainsi de traduire leur augmentation d'activité en une augmentation de la CCR.

#### IV.4- Les neurones histaminergiques

Les neurones histaminergiques du noyau tubéromammillaire entretiennent un lien fonctionnel et anatomique fort avec les neurones orexinergiques, ensemble ils contribuent à fournir un contrôle complémentaire et synergique en promouvant l'état d'éveil (Peyron et al., 1998, Date et al., 1999, Anaclet et al., 2009, Kernder et al., 2014). Il a notamment été montré que la stimulation par optogénétique des neurones orexinergiques se traduisait en une libération de glutamate au niveau des neurones histaminergiques induisant une modification du potentiel de membrane médié par les récepteurs AMPA (Schone et al., 2012). Par ailleurs une exposition à un challenge hypercapnique in vivo entraine une augmentation de l'expression de la protéine c-FOS dans les neurones histaminergiques. L'étude ne discrimine pas si cette activation est due à un effet direct du CO<sub>2</sub> ou si elle est secondaire à l'activation d'une autre structure (Johnson et al., 2005b). De plus il a été montré à la fois sur des tranches contenant le noyau tubéromammilaire et sur des neurones isolés, que les neurones histaminergiques augmentent leur fréquence de décharge en réponse à une acidification du milieu extracellulaire (Yanovsky et al., 2012). La signification fonctionnelle de la chémosensibilité des neurones histaminergiques reste encore inconnue. Toutefois, des études ont suggéré que l'activation des neurones histaminergiques en cas d'augmentation de CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> pourrait modifier la CCR en entrainant l'activation des neurones du NTS commissural et/ou médian, au niveau duquel on retrouve un réseau dense de fibres histaminergiques (Airaksinen and Panula, 1988, Blandina et al., 2012). Les effets de l'histamine sur la respiration de base seraient médiés par son récepteur H1 (Dutschmann et al., 2003). Pour autant une étude réalisée sur des souris KO pour le récepteur H1 à l'histamine a montré que la perte de ce récepteur n'entrainait qu'une faible modification de la réponse respiratoire à une augmentation de CO<sub>2</sub> en allongeant exclusivement et modérément la terminaison de l'inspiration, sans modifier la fréquence respiratoire (Miyamoto et al., 2004).
# Chapitre III : Les syndromes d'hypoventilation centrale : des pathologies associées à un défaut de la commande centrale respiratoire

### I- Les syndromes d'hypoventilation centrale

### I.1- Définition

On regroupe sous le terme de syndromes d'hypoventilation centrale (ou Central Hypoventilation Syndrome, CHS) des pathologies neuro-respiratoires associées à une dérégulation du fonctionnement du système nerveux végétatif acquise ou congénitale. Elles résultent de désordres neurologiques pouvant affecter les récepteurs sensoriels, les centres à l'origine de l'élaboration de la commande respiratoire ou encore les sites d'intégration des messages issus des récepteurs sensoriels (Gozal, 1998, Carroll et al., 2010, Cielo and Marcus, 2014). Les mécanismes neuronaux qui sous-tendent le contrôle nerveux de la respiration étant influencés par l'état de vigilance, l'hypoventilation alvéolaire peut être observée uniquement pendant le sommeil ou, dans des cas plus sévères, pendant l'éveil et le sommeil (Muzumdar and Arens, 2008, Cielo and Marcus, 2014).

Il sera détaillé dans ce chapitre le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS, ou syndrome d'Ondine) le plus documenté des CHS, le syndrome d'hypoventilation tardive (Late onset central hypoventilation syndrome - LO-CCHS), le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce (ou Rapid Onset with Hypothalamic dysfunction, Hypoventilation and Autonomic Dysregulation – ROHHAD), le syndrome d'hypoventilation lié à l'obésité (ou Obesity Hypoventilation Syndrome – OHS).

### I.2- Prise en charge thérapeutique

Les CHS sont des syndromes à plusieurs composantes qui nécessitent un suivi global, multidisciplinaire centré sur une prise en charge respiratoire dont l'objectif est d'assurer une dioxygénation adéquate des tissus et une clairance efficace du CO<sub>2</sub>. Aucun traitement pharmacologique n'est actuellement disponible. En effet, les études ayant testé des agents pharmacologiques utilisés classiquement comme stimulants respiratoires pour promouvoir l'eupnée ont conclu qu'ils étaient inefficaces (Hunt et al., 1979, Naeije et al., 1982, Oren et al., 1986, Weese-Mayer et al., 1992b). Les traitements disponibles se concentrent donc sur la ventilation artificielle qui permet en imposant la fréquence respiratoire et le volume courant, de maintenir ou de restaurer l'hématose en cas d'incapacité ventilatoire totale ou partielle pendant le sommeil et/ou l'éveil (Weese-Mayer et al., 2010a).

### I.2.1- Ventilation à pression positive

La ventilation à pression positive *via* une canule de trachéotomie est un mode de ventilation invasif couramment utilisé en particulier chez les nourrissons et les jeunes enfants (Healy and Marcus, 2011). Elle permet d'assurer une dioxygénation optimale lorsqu'une ventilation en continue est nécessaire. Pour autant ce mode de ventilation impose le recours à un appareillage complexe (le ventilateur) et à des dispositifs invasifs (canule de trachéotomie) qui peuvent être source de complications graves. Une surveillance adaptée du patient est requise pour être en mesure de prévenir les complications inhérentes à cette technique et d'optimiser le confort du patient.

Afin de s'affranchir ou d'éviter la trachéotomie, la ventilation non invasive ne nécessite aucune intervention chirurgicale et permet une assistance ventilatoire *via* un masque nasal ou facial. Les conditions requises sont une absence d'hypoventilation alvéolaire diurne, une absence d'obstruction des voies aériennes supérieures ainsi que la bonne tolérance au masque. Ce mode de ventilation, qui diminue notamment le risque de complications infectieuses, constitue et demeure le support de vie des patients qui ont besoin d'une ventilation nocturne en continue (Marcus et al., 1991, Gozal, 1998, Goldenberg et al., 2000) et est le mode de ventilation le plus utilisé chez l'adulte (Healy and Marcus, 2011).

### I.2.2- Stimulation diaphragmatique

La stimulation phrénique est un mode d'assistance ventilatoire permettant de rétablir une contraction diaphragmatique qui jouera son rôle de pompe aspirante. Les paramètres du stimulateur phrénique doivent être en mesure de fournir une ventilation alvéolaire adéquate aussi bien pendant le repos que pendant les activités quotidiennes. Cette technique se base sur la stimulation électrique du nerf phrénique au moyen d'électrodes implantées chirurgicalement au niveau des segments intrathoraciques intracervicaux du nerf. Ces électrodes sont connectées à des capteurs sous-cutanés commandés par un générateur d'impulsions externe qui transmet par fréquence radio les signaux destinés aux électrodes du nerf phrénique (Similowski et al., 1989, Weese-Mayer et al., 1992a, Healy and Marcus, 2011). Ces stimulateurs diurnes sont utilisés chez les patients ventilo-dépendant en complément de la ventilation nocturne par trachéotomie ou par masque et sont contre-indiqués aux patients qui présentent des dommages aux poumons liés au ventilateur. Cela permet au patient de se libérer d'un ventilateur mécanique durant la journée et donc d'améliorer la qualité de vie (Healy and Marcus, 2011, Cielo and Marcus, 2014). Les principaux inconvénients de cette technique comprennent le coût, l'inconfort associé à l'implantation chirurgicale, et le besoin potentiel de répétition d'actes chirurgicaux dû à un dysfonctionnement du stimulateur. Les innovations visant à améliorer cette technique ont pour but : une plus grande durée de soutien du stimulateur avec une diminution de la fatigue diaphragmatique et des dommages causés aux nerfs phréniques ainsi que l'optimisation des besoins de stimulation pendant l'exercice (Gozal, 1998).

# II- Le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénital ou syndrome d'Ondine

En 1962 Severinghaus et Mitchel sont les premiers à employer le terme « syndrome d'Ondine » pour décrire un syndrome contracté par 3 patients adultes après une intervention chirurgicale de la moelle épinière et du tronc cérébral (Severinghaus JW., 1962, Severinghaus et al., 1963). Les auteurs décrivent la survenue d'apnées centrales sévères pendant le sommeil imposant la mise en place d'une ventilation mécanique et l'absence de troubles respiratoires à l'éveil (Severinghaus JW., 1962). L'appellation syndrome d'Ondine choisie s'inspire de la mythologie germanique : la nymphe Ondine pour punir son mari simple mortel qui lui a été infidèle, lui ôta la possibilité de respirer automatiquement. Le malheureux mourut lorsqu'il s'endormit. En 1970, Mellins et collaborateurs rapportent le premier cas d'un enfant présentant des caractéristiques cliniques correspondant au syndrome d'Ondine (Mellins et al., 1970). L'enfant présentait une cyanose pendant le sommeil et une réponse ventilatoire atténuée lors de l'inhalation de CO<sub>2</sub> à l'éveil. C'est ensuite en 1992 qu'une première description complète d'une cohorte de 32 cas a été publiée (Weese-Mayer et al., 1992b), permettant ainsi de poser les bases dans la compréhension du tableau clinique de cette pathologie, jusqu'alors mal diagnostiquée. En 1996 un centre clinique et de recherche français consacré au CCHS a été créé et en 2005, le premier registre répertoriant l'ensemble des CCHS français a été établi (Trang et al., 2005). En 1999, la première déclaration officielle sur les CCHS a été publiée par la Société Américaine Thoracique (1999). Une étape fondamentale pour cette maladie orpheline a été franchie en 2003, avec la découverte de la mutation du gène PHOX2B comme responsable de la pathologie (Amiel et al., 2003). L'implication de ce gène dans la maladie sera détaillée dans le paragraphe II.2.2. Implication du gène PHOX2B.

Le centre de référence « maladie rare » coordonné par le Dr Ha Trang <sup>1</sup> comporte trois branches. La branche pédiatrique mobilise une équipe de pédiatres de l'hôpital Robert-Debré à Paris, et est dirigé par le Dr Trang. La deuxième branche, dévolue à la prise en charge des patients adultes, est localisée à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris où elle est coordonnée par le Pr Christian Straus. Elle s'appuie sur une équipe multidisciplinaire composée de pneumologues, de physiologistes, de cardiologues, d'hépato-gastro-entérologues, de somnologues, d'endocrinologues et de gynécologues, d'otorhinolaryngologistes, de psychiatres et de psychologues. La branche « adulte » propose à tous les patients qu'elle suit, la réalisation d'un bilan annuel afin de suivre l'évolution de la maladie. La troisième branche se consacre à la recherche et à l'analyse génétique du gène *PHOX2B* ainsi qu'au conseil génétique des patients et de leur famille coordonnée par le Pr Jeanne Amiel.

### II.1- Épidémiologie

Le CCHS a une prévalence en France d'1 naissance sur 200000 (Vanderlaan et al., 2004, Trang et al., 2005). A noter qu'aucune estimation fiable de la prévalence n'est disponible aux Etats-Unis ou dans d'autres pays (Muzumdar and Arens, 2008, Weese-Mayer et al., 2010b).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> http://www.ondinefrance.org/index.php?sid=242

Ce syndrome présent dans toutes les ethnies affecte autant les hommes que les femmes (ratio 1:1) (Vanderlaan et al., 2004, Trang et al., 2005).

### II.2- Etiologie

### II.2.1- Diagnostic par exploration fonctionnelle

Ce syndrome est présent dès la naissance, moment où dans la grande majorité des cas il est diagnostiqué et persiste à vie (Weese-Mayer et al., 2010a, Ramanantsoa and Gallego, 2013). Les principaux symptômes sont *(i)* l'hypoventilation alvéolaire pendant le sommeil et dans certains cas pendant l'éveil, pouvant conduire à un arrêt respiratoire complet *(ii)* une forte diminution de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Figure 17) et, dans une moindre mesure, à l'hypoxie prolongée (Muzumdar and Arens, 2008, Carroll et al., 2010, Ramanantsoa and Gallego, 2013).



Figure 17 : Réponse ventilatoire d'un sujet sain et d'une patiente CCHS pendant une expérience de réinhalation de CO<sub>2</sub>.

Les graphiques représentent la ventilation minute en réponse à une augmentation de la PCO<sub>2</sub> chez un sujet sain (à gauche) et chez une patiente CCHS (à droite). A droite données non publiées fournies par le Pr Christian Straus à gauche d'après Straus et al. 2010

Avant la découverte de la mutation *PHOX2B* en 2003 qui constitue aujourd'hui l'élément fondamental du diagnostic du CCHS (*cf* : *II.2.2. Implication du gène PHOX2B*), les investigations concernant l'origine de la pathologie se faisaient par diagnostique d'exclusion. Pour cela il fallait qu'aucune lésion cérébrale ni aucune cause pulmonaire, cardiaque ou neuromusculaire ne soit en mesure d'expliquer l'ensemble du phénotype (Weese-Mayer et al., 1992b). Ainsi l'échographie cardiaque, la radiographie pulmonaire, l'imagerie cérébrale et l'électromyogramme d'un patient CCHS doivent donner des résultats normaux. Enfin encore aujourd'hui l'examen polysomnographique est requis pour le diagnostic. Cet enregistrement consiste en un monitorage simultané de plusieurs variables physiologiques (rythme respiratoire, rythme cardiaque, électroencéphalogramme, électromyogramme et gaz du sang) au cours du sommeil. Les patients CCHS présentent en ventilation spontanée des épisodes d'hypoventilation alvéolaire (hypoxémie et hypercapnie) qui s'accompagnent d'une

diminution de la fréquence et de l'amplitude des mouvements respiratoires, d'apnées centrales, de cyanose et de désaturation, sans susciter d'éveil (Chen and Keens, 2004).

Ce dysfonctionnement est dépendant du niveau de vigilance, ainsi l'hypoventilation est observable : dans les cas modérés pendant les phases 3 et 4 du sommeil lent pendant lequel il n'y a pas de mouvements oculaires (sommeil non rapid eye mouvement, NREM), pour les cas dits modérément sévères pendant le sommeil paradoxal caractérisée par des mouvements oculaires (rapid eye mouvement, REM) et le sommeil NREM, et pour les cas les plus graves pendant le sommeil et pendant l'éveil (Fleming et al., 1980, Weese-Mayer et al., 1992b).

Des auteurs proposent que pour les patients CCHS modérés et modérément sévères, la mise en jeu d'afférences non chémoréceptrices sur le réseau respiratoire contribue à leur permettre de respirer de façon adéquate pendant l'éveil (Shea, 1997, Healy and Marcus, 2011). En effet il a été montré chez le sujet sain qu'en plus des chémorécepteurs périphériques et centraux, différentes influences liées à l'éveil participent à la régulation de la PO<sub>2</sub> et de la PCO<sub>2</sub>. Ces dernières seraient notamment des influences d'origine corticale (comme provenant du cortex moteur), ou des influences provenant de structures appartenant au système limbique (émotions) et sensorielles (auditives et visuelles) (Shea, 1997). Il a également été montré, chez les patients CCHS que le mouvement des membres au cours de l'exercice était un déterminant important de la ventilation entrainant une augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant (Paton et al., 1993). On notera également que des modifications respiratoires peuvent être associées à l'excitation du réseau respiratoire du tronc cérébral par l'intermédiaire de la formation réticulée, ou encore peuvent être secondaires à des altérations du métabolisme au cours de tâches mentales (Shea, 1997). Ces mécanismes fonctionnels chez les patients CCHS, favoriseraient pour une certaine proportion d'entre eux l'eupnée pendant l'éveil (Healy and Marcus, 2011) mais échoueraient pendant le sommeil, où la commande ventilatoire ne repose alors que de structures spécialisées dans l'élaboration de la CCR (Shea, 1997).

Par ailleurs une étude portant sur la respiration spontanée pendant le sommeil chez 9 enfants CCHS a mis en évidence une hypoventilation plus prononcée pendant la phase NREM que pendant la phase REM (Huang et al., 2008). Cette étude confirme de précédentes observations (Shannon et al., 1976, Fleming et al., 1980) et est corroborée depuis par des résultats obtenus sur des modèles animaux. Chez le chat l'enregistrement de l'activité de neurones respiratoires du bulbe rachidien a montré que ces derniers (neurones inspiratoires précoces à activité décroissante, tardifs à activité croissante, neurones inspiratoires tardifs, post-inspiratoires précoces à activité décroissante, expiratoires à activité croissante et préinspiratoire) avaient une fréquence de décharge augmentée pendant la phase REM comparé à la phase NREM (Orem et al., 2005). De plus, l'augmentation de l'activité neuronale respiratoire et diaphragmatique au cours du sommeil paradoxal seraient sous-tendus par des afférences excitatrices noradrénergique et sérotoninergique (Siegel, 2004, Chan et al., 2006) qui seraient responsables de la respiration rapide et irrégulière caractéristique de ce stade (Chan et al., 2006, Healy and Marcus, 2011). La mise en perspective de ces observations pourrait expliquer pourquoi l'hypoventilation des patients CCHS est plus prononcée pendant le sommeil NREM que pendant le sommeil paradoxal (Huang et al., 2008).

### II.2.2- Du génotype PHOX2B au phénotype CCHS

### II.2.2.1- Implication du gène PHOX2B

Différents arguments ont conduit la communauté scientifique à soupçonner l'origine génétique du CCHS. Premièrement des études de cas familiaux ont révélé un cas de jumelles homozygotes atteintes de CCHS (Khalifa et al., 1988) et un cas de transmission mère enfant (Sritippayawan et al., 2002). En 1993 une analyse par ségrégation a suggéré que le phénotype CCHS pouvait s'expliquer soit par un modèle multigénique soit par une transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète (Weese-Mayer et al., 1993). Par ailleurs, l'étude de cohortes de patients a révélé que le phénotype CCHS en plus des troubles ventilatoires été associé à d'autres pathologies génétiquement déterminées : la maladie de Hirschsprung, des tumeurs de la crête neurale (neuroblastomes, ganglioneuromes et ganglioneuroblastome) (Weese-Mayer et al., 1992b). Ces pathologies se retrouvent dans les cohortes de patients CCHS de façon beaucoup plus fréquente que ne le voudrait le hasard, suggérant une origine génétique du phénotype. En 2003 dans Nature Genetics, Amiel et collaborateurs (Amiel et al., 2003) publient le résultat de leurs recherches effectuées sur 29 patients CCHS. Cette étude révèle que 18 des 29 patients sont porteurs sur un des deux allèles d'une mutation dans le gène PHOX2B. Cette mutation à transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète survient dans la majorité des cas de novo (Weese-Mayer et al., 2003, Goridis et al., 2010). C'est à dire que le risque de survenue d'un second cas de CCHS dans la fratrie d'un enfant atteints est équivalent à celui de la population générale.

PHOX2B est un gène localisé sur le chromosome 4 (localisation p12), qui code une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription à homéodomaine, essentiel dans la régulation de la migration des cellules de la crête neurale et dans le développement du système nerveux végétatif central et périphérique (Pattyn et al., 1997, 1999, Amiel et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2003). L'ARNm est organisé en 3 exons, l'homéodomaine s'étend sur la quasi-totalité de l'exon 2 et sur le début de l'exon de 3. En aval de l'homéodomaine la séquence nucléotidique de l'exon 3 code deux séries de répétitions d'alanine de 9 et 20 résidus (Figure 18). Les études fonctionnelles ont montré que PHOX2B est un facteur de transcription nécessaire pour une expression correcte du gène codant la tyrosine hydroxylase et la dopamine-β-hydroxylase, tous deux impliquées dans la biosynthèse des catécholamines (Lo et al., 1999, Adachi et al., 2000). En outre, PHOX2B est également impliqué dans la régulation de la transcription du gène PHOX2A, dont le produit est nécessaire au développement du LC (Tiveron et al., 1996, Flora et al., 2001). Ainsi le dysfonctionnement de PHOX2B via la dérégulation de la transcription de PHOX2A a pour conséquence d'entrainer indirectement un défaut de développement du LC, une source majeure de signalisation noradrénergique dans le SNC. Ces éléments soulignent le fait que PHOX2B est essentiel à la mise en place et à la régulation de la signalisation catécholaminergique (Bachetti et al., 2005).



Figure 18 : Représentation schématique du gène et de la protéine PHOX2B.

En bleu l'homéodomaine qui s'étend sur l'exon 2 et le début de l'exon 3. En vert clair la répétition d'alanine de 9 résidus, en vert foncé la répétition d'alanine de 20 résidus. C'est au niveau de la répétition de 20 alanines qu'on retrouve les mutations PARM (PolyAlanine Repeat Mutation). *D'après Amiel et al., 2003* 

La mutation prédominante retrouvée dans 90% des patients CCHS consiste en expansion d'alanines (allant de 4 à 13 résidus supplémentaires) au niveau de la seconde série de répétitions d'alanine qui en contient à l'état sauvage 20. Ainsi, la dénomination PARM pour PolyAlanine Repeat Mutation est utilisée pour définir le fait que la mutation entraine une expansion de la répétition d'alanine au niveau de la série de 20 résidus. Cette expansion d'alanine respecte le cadre de lecture, l'allèle muté peut alors contenir de 24 à 33 alanines successives. La dénomination NPARM est quant à elle utilisée pour définir les mutations mises en évidence chez les patients CCHS qui sont ne sont pas des expansions d'alanine. Les mutations NPARM représentent 10% des patients CCHS. Il a été répertorié des mutations par insertion ou délétion qui conduisent à des modifications du cadre de lecture (78% des cas) ainsi qu'à des mutations faux-sens (16% des cas), non-sens (4% des cas), et faux sens avec une altération du codon stop (3%) (Amiel et al., 2009, Weese-Mayer et al., 2010a).

Chez les patients CCHS, une corrélation a été mise en évidence entre le génotype PHOX2B et le phénotype CCHS dans le sens où la longueur de l'expansion de polyalanine a été corrélée avec la gravité de la maladie (Weese-Mayer et al., 2003, Matera et al., 2004, Antic et al., 2006, Weese-Mayer et al., 2010a). Ces mutations du gène PHOX2B, PARM et NPARM, résultent en des protéines aux structures quaternaires différentes. Ce changement de conformation pourrait entrainer soit la liaison défectueuse de PHOX2B sur les régions cibles des gènes dont il doit réguler l'expression soit à une altération du recrutement des cofacteurs coopérant avec PHOX2B. En effet des études fonctionnelles ont montré en testant différentes protéines PHOX2B porteuses de mutation PARM ou NPARM que bien que certaines de ces protéines soient toujours en mesure de se lier aux bonnes cibles dans le génome, elles ne parviennent pas à exercer leurs fonctions de transactivation normale comme cela a été montré dans l'article de Bachetti et collaborateurs pour le gène de la dopamine β-hydroxylase et PHOX2A, auquel il se lie directement grâce à un site de liaison identifié au niveau de la région 5' de l'homéodomaine (Bachetti et al., 2005, Di Zanni et al., 2012). Dans leur article Bachetti et collaborateurs ont également montré que plus l'expansion d'alanine été importante moins PHOX2B été en mesure d'exercer sa fonction normale, des observations en accord avec ce qui a été observé chez les patients CCHS. De plus il a été mis en évidence que les protéines mutées porteuses d'une mutation PARM ne sont plus en mesure de pénétrer dans le noyau et peuvent former des agrégats intracytoplasmiques toxiques pour les cellules (Bachetti et al., 2005, Trochet et al., 2005, Di Zanni et al., 2012). Des auteurs ont proposé que la formation d'agrégat de la protéine PHOX2B mal repliée pourrait également compromettre le repliement d'autres protéines et influencer des fonctions cellulaires plus générales (Albrecht et al., 2004, Caburet et al., 2004). Enfin des auteurs avancent le fait que les mutations dans le gène *PHOX2B* sont responsables de l'haploinsuffisance du gène non muté, dès lors que ces protéines à la fonction altérée exercent un effet de dominant négatif en entrant en concurrence avec le produit de l'allèle de type sauvage (Albrecht et al., 2004, Caburet et al., 2005).

### II.2.2.2- Expression de PHOX2B

*PHOX2B* est exprimé dans un ensemble limité de circuits neuronaux au cours du développement embryonnaire et le reste ensuite tout au long de la vie. Ces circuits sont impliqués dans la régulation des fonctions vitales : respiratoire, digestive et cardiovasculaire (Dauger et al., 2003). La majorité des neurones exprimant *PHOX2B* sont dans les branches motrices efférentes et sensorielles afférentes de ces circuits.

### Implication de PHOX2B dans le contrôle de la respiration :

### Structures périphériques :

Le développement du corps carotidien qui contient des chémorécepteurs à l'O<sub>2</sub> et au CO<sub>2</sub> est dépendant de l'expression de *Phox2b* en l'absence duquel le corps carotidien présente un défaut de maturation, puis dégénère et par conséquent est absent à la naissance (Dauger et al., 2003). L'expression de *Phox2b* est également importante pour le développement du ganglion pétreux une structure localisée entre le corps carotidien et le NTS commissural et médian (Dauger et al., 2003, Trang et al., 2014) et pour le développement du ganglion inférieur du nerf vague, qui véhicule notamment l'activité des récepteurs broncho-pulmonaires sensibles à l'étirement (réflexe d'Hering-Breuer).

### Structures bulbaires :

*PHOX2B* est abondamment exprimé dans les neurones du NTS commissural et médian où les informations issues de la périphérie (notamment les informations en provenance du corps carotidien qui transitent au travers du ganglion rachidien pétreux) sont intégrées avant d'être transmises en continu d'une part aux ganglions exprimant *PHOX2B* (parasympathique, sympathique et entérique) (Dauger et al., 2003, Trang et al., 2014), et d'autre part à des structures du bulbe rachidien comme le RTN/pFRG (Takakura et al., 2006a). Un défaut de développement du NTS pourrait donc conduire à des anomalies dans la transmission d'informations et ainsi contribuer à réduire la réponse respiratoire à des variations de la PO<sub>2</sub> et de la PCO<sub>2</sub> (Stornetta et al., 2006).

Comme dit précédemment les propriétés de chémorécepteur au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> du RTN/pFRG serait sous-tendues par les neurones glutamatergiques, positifs pour NK1R, PHOX2B, TASK-2

et GPR4 qui le compose (*cf* : *Chapitre II, III.1- Le noyau retrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial*) (Stornetta et al., 2006, Onimaru et al., 2008, 2009). De par le rôle prépondérant que joue cette structure dans la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$ , la question s'est posée de savoir si le défaut de développement du RTN permettait d'expliquer le phénotype respiratoire des patients CCHS. Ainsi après l'identification de la mutation *PHOX2B*, un modèle de souris conditionnelles portant la mutation *Phox2b*<sup>27Ala</sup> spécifiquement dans les neurones du RTN (Ramanantsoa et al., 2011b) a été développé (ce modèle de souris sera détaillé dans le paragraphe II.2.3.3). Brièvement, ce modèle a permis de mettre en évidence que cette mutation entraine une absence de réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  jusqu'à l'âge de 3 semaines, confirmant le rôle essentiel des neurones PHOX2B-positifs du RTN dans la chémosensibilité centrale (Ramanantsoa et al., 2011b).

PHOX2B est également exprimé et nécessaire au développement et au fonctionnement de plusieurs centres noradrénergiques, tels que A5 et le LC (Onimaru et al., 2008). Les neurones du LC sont une source majeure d'innervation noradrénergique dans le SNC (Viemari, 2008) répondant à l'appellation de chémorécepteurs centraux au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Pineda and Aghajanian, 1997, Biancardi et al., 2008, de Carvalho et al., 2014) (cf : Chapitre II, III.6 Locus Coeruleus). Dans une étude de 2015 Nobuta et collaborateurs ont analysé postmortem l'encéphale de deux nouveaux-nés CCHS porteur d'une mutation PARM et NPARM dans le but d'identifier les structures du tronc cérébral dont le développement a été touché par ces mutations (Nobuta et al., 2015). Chez les deux patients les auteurs ont noté un défaut de développement du LC. En parallèle les auteurs ont développé un modèle de souris mutantes inductibles porteuses de la même mutation NPARM que le patient. Le déclenchant de la mutation au stade embryonnaire précoce (<E10,5) entraine un défaut de développement du LC et une létalité respiratoire périnatale, tandis que l'induction de la mutation à un stade plus avancé (E11,5) ne nuit pas au développement du LC ni à la survie périnatale. Ainsi au même titre que pour les neurones du RTN on peut imaginer que le défaut de développement ce cette structure participe au phénotype respiratoire des patients CCHS (Nobuta et al., 2015).

On retrouve également l'expression de *PHOX2B* dans le noyau facial et le noyau ambigu. Chez les amphibiens avec qui l'Homme partage un ancêtre commun, ces structures composées de motoneurones respiratoires ont un rôle fondamental dans la ventilation. Pour la respiration des vertébrés à ventilation aérienne pulmonaire le noyau facial et le noyau ambigu sont impliqués respectivement dans le contrôle moteur des muscles peauciers de la face et la déglutition (Onimaru et al., 2008).

Comme dit plus haut (*cf* : *II.2.2.1 Implication du gène PHOX2B*) le nombre de répétitions d'alanine est associé à la sévérité du phénotype respiratoire (Antic et al., 2006, Bachetti et al., 2006). Ainsi les patients porteurs d'une mutation PARM avec une expansion de +4 et +5 alanines ne nécessitent une ventilation artificielle que pendant la nuit. Les génotypes +6 peuvent avoir besoin en plus d'une assistance ventilatoire à l'éveil tandis que les génotypes +7 à +13 ont besoin d'un soutien ventilatoire en continu (Weese-Mayer et al., 2005, Antic et al., 2006, Repetto et al., 2009). D'autre par la plupart des patients qui présentent un génotype NPARM ont besoin d'un soutien ventilatoire en continu (Berry-Kravis et al., 2006).

### Implication de PHOX2B dans les circuits reflexes viscéraux :

Dans la voie sensorielle, *PHOX2B* est exprimé et indispensable au développement des trois ganglions crâniens sensoriels viscéraux : geniculate, pétreux et noueux, qui relayent les informations provenant des viscères tels que la pression artérielle, la composition chimique du sang et le contenu digestif, vers le bulbe rachidien (Brunet and Pattyn, 2002, Dauger et al., 2003, Goridis and Brunet, 2010). Ces informations sont intégrées par des neurones sensoriels de second ordre du NTS commissural et médian et modulent à leur tour les fibres efférentes des motoneurones viscéraux qui commandent les ganglions sympathiques et parasympathiques et le système nerveux entérique (Blessing, 1997).

La maladie de Hirschsprung (HSCR) ou aganglionose intestinale congénitale est une anomalie congénitale caractérisée par une absence totale de cellules ganglionnaires parasympathiques le long d'un segment de taille variable du tractus intestinal (Tableau 1). Le segment aganglionnaire comprend la portion du rectum distal et s'étend plus ou moins loin dans l'intestin proximal contigu, on parle de maladie à court ou à long segment. HSCR est considérée comme une neurocristopathie (un trouble des cellules et des tissus dérivés de la crête neurale) et peut être un trouble isolé ou s'inscrire dans une pathologie multisystémique. Les patients présentent des troubles de la motilité intestinale avec constipation, vomissements, douleurs abdominales ou distension (Benailly et al., 2003, Trang et al., 2005). Un lien a été établi entre cette pathologie et le gène *PHOX2B* (Benailly et al., 2003). A ce jour on estime qu'elle est retrouvée dans 20% des cas de CCHS (Trang et al., 2014). Elle est beaucoup plus répandue parmi les cas de NPARM (87-100%) que parmi les PARM (13-20%) (Trochet et al., 2005, Berry-Kravis et al., 2006).

Les tumeurs de la crête neurale, qui peuvent être des neuroblastomes, ganglioneuromes ou encore ganglioneuroblastome sont localisées au niveau thoracique ou abdomino-pelvien et sont retrouvées dans 5-6% des cas de CCHS (Trang et al., 2005). Il a été montré que cette pathologie était préférentiellement retrouvée chez patients ayant une mutation NPARM (50%) plutôt que les PARM (1%)(Trochet et al., 2005, Berry-Kravis et al., 2006), suggérant que le développement des neuroblastomes ne soit pas nécessairement lié à une mutation expansion d'alanine mais plutôt spécifique à certaines mutations NPARM. Une étude in vitro sur une lignée cellulaire de neuroblastome a montré que la surexpression de PHOX2B supprimait la prolifération cellulaire et favorisait la différentiation (Raabe et al., 2008). Sur ce même modèle les auteurs ont ensuite fait exprimer le gène muté PHOX2B porteur de différentes mutations NPARM (identiques à celles que l'on retrouve chez les patients CCHS qui développe un neuroblastome) et ont montré que ces protéines mutées conservent leur capacité à supprimer la prolifération cellulaire, mais ne sont plus en mesure de promouvoir la différenciation ou d'activer l'expression des gènes cibles de PHOX2B connue in vitro (Raabe et al., 2008) ce qui in fine empêche la différenciation des neurones immatures. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude qui suggère que certaines mutations NPARM dans PHOX2B été associées au développement d'un neuroblastome, en raison de l'incapacité de PHOX2B de se lier à des protéines clés avec lesquelles elle interagit (Wang et al., 2014). La perturbation de cette voie neurodéveloppementale conduit à prédisposer à cette affection maligne.

Différentes études réalisées chez des patients CCHS ont mis en évidence un dysfonctionnement du contrôle végétatif de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle entrainant une diminution de leur variabilité au cours du cycle jour/nuit (Woo et al., 1992, Trang et al., 2003). Des pauses sinusales et des bradycardies profondes peuvent être fréquentes (M. et al., 2000, Vanderlaan et al., 2004). De plus une corrélation existe entre les expansions d'alanine +5, +6 et +7 et la durée de l'intervalle R-R (correspondant au temps qui sépare deux ondes R successives lors d'un électrocardiogramme). Ainsi les patients présentant le génotype +5 ne sont pas sujets aux pauses sinusales tandis que respectivement 19 et 83% des génotypes +6 et +7 en présentent (Silvestri JM, 2004, Weese-Mayer and Berry-Kravis, 2004).

Une atteinte oculaire, des reflux gastro-oesophagiens secondaires à une dysmotilité œsophagienne, des épisodes d'hypoglycémie, des troubles de la sudation ou encore une variation de la température corporelle ont également été rapportés (Faure et al., 2002, Vanderlaan et al., 2004) (Tableau 1).

Caractéristiques cliniques		Références
Cardiaque	diminution de la fréquence et de la variabilité cardiaque	(Ogawa et al., 1993, Trang et al., 2005b, Woo et al., 2005)(Silvestri et al., 2000)
	atténuation de l'augmentation de la fréquence cardiaque à l'exercice	(Silvestri et al., 1995)
	valeur de pression artérielle inférieure pendant l'éveil et supérieure pendant le sommeil (par rapport aux témoins)	(Trang et al., 2003)
	capacité de modification de la pression artérielle limitée	– (Zama et al., 2004, Carroll et al., 2014)
	profonde hypotension orthostatique avec diminution du débit sanguin cérébral régional	
Gastrointestinale	maladie d'Hirschsprung (16%-20% des individus CCHS)	(Trochet et al., 2005, de Pontual et al., 2006)
	constipation sévère en absence de la maladie d'Hirschsprung	(Weese-Mayer et al., 1993)(Weese-Mayer et al., 2001)
	dysmotilité oesophagienne / dysphagie	(Weese-Mayer et al., 2001)
Tumeurs de la crête	neuroblastomes, ganglioneuromes ou encore	(Trochet et al., 2005, Berry-Kravis et al., 2006)
Ophthalmologique	anomalies pupillaires	(Patwari et al., 2012)
Psychologique	diminution de la perception de l'anxiété	(Pine et al., 1994)
Respiratoire	diminution de la variabilité respiratoire	(Weese-Mayer et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2010a)
	hypoventilation alvéolaire	(Weese-Mayer et al., 2010a)
	perte de la réponse respiratoire à l'hypercapnie et à l'hypoxie	(Carroll et al., 2010, Weese-Mayer et al., 2010a)
Activité sudomotrice	transpiration abondante sporadique	(1999, Weese-Mayer et al., 2001)
	température basale du corps diminuée	

Tableau 1 : Les caractéristiques cliniques des	patients CCHS décrites dans la littérature.
--	---

### II.2.3- Modèles CCHS de souris

### II.2.3.1- Souris KO pour Phox2b

Le premier modèle de souris génétiquement modifiées pour le gène *Phox2b* a conduit à l'obtention de souris Knock-out (KO) homozygotes (Phox2b<sup>-/-</sup>). Celles-ci meurent *in utero* à E14 (Pattyn et al., 2000b, Amiel et al., 2009), néanmoins il a été montré qu'un traitement avec des agonistes noradrénergiques permettait de secourir les embryons démontrant que la létalité embryonnaire est due du moins en partie à un défaut de la signalisation noradrénalinergique (Pattyn et al., 2000a). Les souris hétérozygotes (Phox2b<sup>+/-</sup>) quant à elles ne présentent pas de létalité embryonnaire et sont fertiles. Ces souris présentent un défaut de développement des corps carotidiens et du NTS commissural et médian (Dauger et al., 2003). A noter que dans cet article l'analyse histologique des neurones du RTN n'a pas été réalisée. En enregistrant la respiration de ces souris en pléthysmographie Dauger et collaborateurs ont montré que contrairement aux patients CCHS les souris Phox2b<sup>+/-</sup> : présentent deux jours après la naissance une réponse respiratoire à l'hypercapnie même si diminuée par rapport à des souris témoins (Figure 19) ; et récupèrent après 10 jours de vie une réponse respiratoire à l'hypercapnie similaire aux souris témoins.





Les tracés illustrent des enregistrements pléthysmographiques de souris nouveau-nées (P2) témoins et mutantes *Phox2b* <sup>+/-</sup> pendant une exposition en normocapnie et à 8% de CO<sub>2</sub>.*D'après Dauger et al 2003* 

Ce phénotype met ainsi en évidence la discordance entre ce modèle et la présentation clinique chez l'Homme (Dauger et al., 2003). A noter que des expériences réalisées en pléthysmographie avec analyse des stades du sommeil révèlent qu'au même titre que certains patients CCHS ces souris ont une atteinte respiratoire préférentiellement pendant le sommeil. En effet elles font en moyenne 6 fois plus d'apnées que les souris témoins et ont une fréquence respiratoire diminuée seulement pendant le sommeil (Durand et al., 2005). Comme dit plus haut (*cf* : *II.2.2.1- Implication du gène PHOX2B*) les mécanismes qui sous-tendent le phénotype en fonction du génotype sont complexes et dépendent de la mutation. Dès lors on peut imaginer que le phénotype des modèles de souris explicités ci-dessus (où la présence de

*PHOX2B* est nulle ou fortement diminuée) soit discordant de ceux observés chez l'Homme chez qui PHOX2B est mutée mais présente.

### *II.2.3.2-* Souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> constitutives

Un modèle de souris porteuses de la mutation humaine a été obtenu grâce à l'approche Knock-in (KI) qui a permis d'insérer une expansion de 7 alanines reproduisant ainsi de la mutation la plus fréquente de CCHS humaine : le génotype PHOX2B PARM +7 (Allèle Phox2b<sup>27Ala</sup>) (Dubreuil et al., 2008). Les souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> pèsent à la naissance le même poids que les souris témoins mais elles sont haletantes cyanosées et meurent en quelques respiratoires (Dubreuil et al., 2008). heures d'arrêts Les enregistrements pléthysmographiques effectués directement dans les 20 minutes suivant la naissance ont montré un rythme respiratoire très variable d'un animal à l'autre. Ainsi des nouveau-nés ont un rythme respiratoire lent et régulier tandis que d'autre ont un rythme très instable interrompu par des périodes d'apnées (Dubreuil et al., 2008). Les épisodes apnéigues plus fréquents et plus longs font que la durée d'apnée totale est multipliée d'un facteur 6,5 chez les souris mutantes par rapport aux témoins. De plus, à la différence des souris témoins ces nouveau-nés mutants ne présentent aucune réponse à l'hypercapnie ni en fréquence ni en amplitude (Dubreuil et al., 2008). Cette perte de la réponse respiratoire a été mise en perspective par les auteurs avec la diminution de 60 à 80% du nombre de neurones PHOX2Bpositifs/VGLUT2-positifs au niveau de la région du RTN/pFRG (Dubreuil et al., 2008). D'autres régions connues pour être impliquées dans la modulation du contrôle de la respiration exprimant PHOX2B ont également été analysées i.e. les corps carotidiens (Dauger et al., 2003), le LC (Hilaire et al., 2004), la région A5 (Hilaire et al., 2004) et le NTS, ainsi que des groupes cellulaires PHOX2B-négatifs i.e. le préBotz et les noyaux des raphés RPa ROb et RMg. A l'exception du RTN/pFRG, aucun défaut anatomique n'a été mis en évidence (Dubreuil et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que le phénotype respiratoire de ces souris pourrait donc être imputable à l'altération des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG (Dubreuil et al., 2008).

### *II.2.3.3-* Souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> conditionnelles

Des souris mutantes conditionnelles porteuses de la mutation Phox2b<sup>27Ala/+</sup> spécifiquement dans le RTN/pFRG ont ensuite été générées grâce au système Cre/Lox (Ramanantsoa et al., 2011a). A la différence des souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> constitutives ces souris mutantes survivent jusqu'à l'âge adulte. Le phénotype respiratoire de ces souris à la naissance concorde avec celui de l'Homme avec une ventilation de base diminuée et une absence de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Figure 20). A partir de 3 semaines elles présentent à une ventilation de base équivalente aux témoins et une augmentation significative de la réponse à l'hypercapnie correspondant à 20% des valeurs obtenues chez les souris témoins. A 4 mois, les adultes ont une réponse respiratoire à l'hypercapnie renforcée mais qui reste encore diminuée en n'étant qu'à 40% de ce qui est observé chez les souris témoins (Ramanantsoa et al., 2011a). Les résultats obtenus sur ce modèle montrent que la suppression génétique du

RTN/pFRG n'entrainait pas de létalité à la naissance mais suggèrent que les neurones PHOX2Bpositifs du RTN/pFRG sont requis pour à la détection des variations de  $CO_2/H^+$  pendant la période périnatale. La récupération d'une chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  après 3 semaines suggère que des mécanismes compensatoires partiels encore inconnus contribueraient à restaurer une sensibilité au  $CO_2/H^+$  (Ramanantsoa and Gallego, 2013). Ces derniers pourraient ne pas être suffisamment fonctionnels à la naissance (Ramanantsoa and Gallego, 2013). Or il a été montré chez le rongeur nouveau-né que le défaut de participation des structures associées à la CCR aux adaptations respiratoires été associé à l'immaturité du système nerveux central (Berquin et al., 2000a). En outre les neurones sérotoninergiques des RPa et ROb décrit comme des chémorécepteurs centraux au  $CO_2/H^+$  (*cf* : *Chapitre II, III.2- Les noyaux des Raphés*) (Wang et al., 2001b, Hodges et al., 2004) pourraient être de bons candidats dans la mesure où ils ne deviennent pleinement opérationnel qu'après la période néonatale (P20) (Corcoran et al., 2009). A noter que ces éléments de discussion quant à l'identification de ces mécanismes compensatoires est en lien direct avec une des hypothèses de ce travail de thèse.



# Figure 20 : Absence des neurones PHOX2B-positifs dans le RTN/pFRG et de la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez les souris mutantes Phox2b<sup>27Ala/+</sup> conditionnelles.

A et B : microphotographies prises au niveau du RTN/pFRG d'une souris témoins Egr2<sup>cre /0</sup> en A et d'une souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> mutantes conditionnelle en B. A noter la perte en B des neurones PHOX2B-positifs (en rouge) au niveau du RTN/pFRG identifié par ovale blanc. En vert Islet1,2 et TH, nVII : noyau facial. C : Les tracés illustrent des enregistrements pléthysmographiques de souris nouveau-nées (P2) témoins et mutantes Phox2b<sup>27Ala/+</sup> conditionnelles pour le RTN/pFRG pendant une exposition en normocapnie et à 8% de CO<sub>2</sub>.D'après Ramanantsoa et al 2011

### II.3. LO-CCHS

Le terme « congénital » fait référence au fait que la pathologie est présente et symptomatique dès la naissance. Cependant, certains patients porteurs de la mutation *PHOX2B* PARM, le plus souvent +4 et +5 (Trochet et al., 2005, Parodi et al., 2008) et NPARM deviennent symptomatiques au minimum 1 mois après la naissance (Matera et al., 2004, Trochet et al., 2005, Doherty et al., 2007). On parle d'apparition tardive : Later Onset-CCHS,

LO-CCHS, le diagnostic peut être posé après 1 mois de vie ou plus tard pendant l'adolescence ou la vie d'adulte. Ce début tardif traduit la variabilité de la pénétrance des mutations de *PHOX2B.* Ces patients n'ont pas nécessairement le phénotype caractéristique des CCHS, mais peuvent présenter les symptômes suivants : cyanose pendant le sommeil, infections pulmonaires sévères et récurrentes, convulsions inexpliquées, dépression respiratoire après une sédation, une anesthésie ou avec un traitement anti-épileptique, retard neurocognitive inexpliqué, hypercapnie et hypoxémie nocturne et enfin une apparente insensibilité à l'hypercapnie et à l'hypoxémie (nage sous-marine prolongée, pneumonie) (Repetto et al., 2009, Weese-Mayer et al., 2010a). Chez certains individus`, la découverte de l'hypoventilation requière en général un cofacteur environnemental suscitant le phénotype (Repetto et al., 2009, Weese-Mayer et al., 2010b). Dès lors l'analyse des antécédents médicaux des patients ayant contracté une hypoventilation alvéolaire après la période néonatale amène souvent à découvrir une symptomatologie d'hypoventilation alvéolaire passée inaperçue.

### III- ROHHAD

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1965 sans être nommé (Fishman et al., 1965). C'est en 2000 que des auteurs l'ont baptisé syndrome d'hypoventilation centrale d'apparition tardive avec dysfonctionnement hypothalamique (LO-CHS/HD) pour la distinction avec les CCHS, après avoir mis en évidence un dysfonctionnement hypothalamique chez 11 patients LO-CCHS. En 2007, Ize-Lodlow et collaborateurs (Ize-Ludlow et al., 2007) décrivent, dans une étude comprenant 15 patients avec un LO- CHS/HD, un profil avec une apparition rapide d'obésité associée à des anomalies végétatives avec une hypoventilation et ont proposé le terme de ROHHAD (Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfonction, hypoventilation and autonomic dysregulation). Les auteurs attirent ainsi l'attention des praticiens sur la séquence d'apparition des signes cliniques tout en démontrant une claire distinction avec les CCHS notamment avec la réalisation de test génétique pour *PHOX2B*.

### III.1- Épidémiologie

A l'heure actuelle 75 cas ont été décrits dans la littérature (Reppucci et al., 2016). La prévalence et le ratio homme/femme atteints ne sont pas disponibles (Carroll et al., 2015).

### III.2- Caractéristiques cliniques

ROHHAD est un trouble pédiatrique rare et complexe indépendant de *PHOX2B* avec des anomalies du système endocrinien, du système nerveux végétatif et du contrôle de la respiration associé à un taux de mortalité entre 50 à 60% majoritairement dû à un arrêt cardiorespiratoire (Ize-Ludlow et al., 2007, Bougneres et al., 2008). Un diagnostic précoce de cette pathologie constitue donc un enjeu majeur. Le syndrome apparait entre 1 an et demi et 10 ans avec comme premier signe clinique une apparition rapide de l'obésité (gain de poids de 10 à 20 kg sur une période de quatre à six mois) avec un ralentissement de la croissance

(Bougneres et al., 2008). S'ensuit d'autres anomalies d'ordre hypothalamique : sécrétion anormale de vasopressine induisant une hypo ou une hyponatrémie, une hyperprolactinémie, un hypothyroïdisme, une puberté précoce ou retardée, une déficience en hormone de croissance ou encore une insuffisance corticotrope (Ize-Ludlow et al., 2007). Plus tard, des dérégulations du système nerveux végétatif apparaissent, comme la diminution ou l'absence de dilatation de la pupille à la lumière, la présence d'un strabisme, la dérégulation de la température, une diminution de la perception de la douleur ou encore une dysfonction du rythme cardiaque (Bougneres et al., 2008, Chew et al., 2011, Patwari and Wolfe, 2014). Il a également été rapporté des dépressions et des troubles du comportement comme la psychose avec débordements, des troubles bipolaires, une labilité émotionnelle, ou encore des troubles obsessionnels compulsifs (Ize-Ludlow et al., 2007). Dans 40% des cas le ROHHAD s'accompagne d'une tumeur des crêtes neurales (Carroll et al., 2010, Patwari et al., 2011, Kocaay et al., 2007, Bougneres et al., 2008).

Le syndrome de ROHHAD est notamment caractérisé par son phénotype respiratoire à savoir : une abolition ou une réduction importante de la réponse respiratoire à l'hypercapnie et à l'hypoxémie (Ize-Ludlow et al., 2007, Chew et al., 2011, Carroll et al., 2015, Reppucci et al., 2016), dont les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été élucidés. Une étude de 2015 (Carroll et al., 2015) a estimé, sur une cohorte de patients la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et à l'hypoxie à l'éveil chez des enfants et adolescents ROHHAD et a montré que les patients ROHHAD, à la suite d'un challenge hypoxique hypercapnique, présentent une diminution du volume courant ainsi que de la commande inspiratoire (définie comme étant le rapport du volume courant sur la durée entre chaque bouffées inspiratoire). En revanche leur réponse est similaire aux patients témoins en cas de challenges hyperoxiques et hyperoxiques hypercapniques (Carroll et al., 2015). La mise en perspective de ces résultats avec ceux d'une étude réalisée chez des patients CCHS utilisant un protocole identique (Carroll et al., 2014) suggère que les patients ROHHAD ont une meilleure sensibilité à l'hypoxie que les patients CCHS (Carroll et al., 2015). En effet, bien que dans ces deux troubles ait été décrite une ventilation de base inadéquate pendant l'éveil ainsi qu'une hypoventilation plus prononcée pendant le sommeil, les résultats présentés ici indiquent que les ROHHAD auraient un déficit de la chémosensibilité à l'O<sub>2</sub> et au CO<sub>2</sub> à l'éveil moins marqué que chez les CCHS (Carroll et al., 2015).

### III.3- Etiologie

De multiples théories ont été proposées quant au mécanisme physiopathologique du ROHHAD. Parmi elles, l'hypothèse d'une maladie autoimmune (Chow et al., 2015, Cemeroglu et al., 2016) et d'un syndrome paranéoplasique (Sirvent et al., 2003, Paz-Priel et al., 2011). L'analyse IRM de l'encéphale d'un adolescent atteint de ROHHAD a mis en évidence la présence d'une inflammation locale au niveau de la PAG et de l'hypothalamus. De façon intéressante cette inflammation locale pourrait expliquer une grande partie des symptômes observés (Chow et al., 2015). Plusieurs études ont cherché à identifier des mutations génétiques, *via* l'approche de gène candidat en regardant notamment des gènes impliqués

dans le développement neuronal, à savoir le gène codant le BDNF et celui codant son récepteur tyrosine kinase B, le gène ASCL1 (pour Achaete-scute homolog 1) et le gène NECDIN (Ize-Ludlow et al., 2007, Muzumdar and Arens, 2008). Aucune de ces études n'a été en mesure d'établir un lien entre ces gènes et le ROHHAD (Ize-Ludlow et al., 2007, Chew et al., 2011, Rand et al., 2011). Des études suggèrent l'implication d'un facteur monogénique (de Pontual et al., 2007, Thaker et al., 2015). En 2011, l'analyse du génotype de jumelles homozygotes dont une est atteinte de ROHHAD suggère l'implication de phénomène épigénétique dans le développement de ce phénotype (Patwari et al., 2011). En effet, des variations de l'épigénome de jumeaux identiques s'accumulent rapidement et tout au long de la vie, expliquant probablement dans le cas présent les discordances observées. Des études de séquençage entier de l'exome de patients présentant le diagnostic clinique du syndrome ROHHAD ont été effectués (Barclay et al., 2015, Thaker et al., 2015). L'étude de Thaker (Thaker et al., 2015) a identifié une mutation de novo du gène RAI1 (Retinoic acid induced 1) le produit de l'expression de ce gène est une protéine dont l'expression est dépendante de l'acide rétinoïque qui joue un rôle dans le développement neural craniofacial et semble cruciale dans le développement de la crête neurale (Tahir et al., 2014). Le gène RAI1 pourrait donc constituer un bon candidat pour l'identification du syndrome ROHHAD (Thaker et al., 2015).

Par ailleurs, le cas d'une patiente atteinte de ROHHAD présentant un taux non détectable d'orexine A dans le liquide céphalo-rachidien a été décrit (Dhondt et al., 2013). La jeune fille âgée de 7 ans présentait toutes les caractéristiques cliniques du ROHHAD avec en plus les caractéristiques de narcolepsie avec cataplexie. Dans cet article les auteurs élargissent le phénotype de ROHHAD en y incluant comme facteur de co-morbidité la narcolepsie avec cataplexie causée par le déficit en orexine. Par la suite une analyse génomique a été réalisée sur une cohorte de patient ROHHAD, à la recherche de mutation sur les gènes codant la prépro-orexine ainsi que les deux récepteurs décrits OX1R et OX2R (Barclay et al., 2016). Cette étude n'a identifié aucune mutation dans les séquences codantes de ces gènes, sans pour autant pouvoir exclure la possibilité d'une mutation dans les séquences introniques ou promotrices. Au même titre que pour la narcolepsie, la signalisation orexinergique pourrait jouer un rôle dans le mécanisme physiopathologique du ROHHAD sans que la communauté scientifique n'ait pu être en mesure d'en découvrir l'origine (Barclay et al., 2016).

# IV- Autres pathologies associées à un défaut de la commande centrale respiratoire : le Syndrome Hypoventilation d'Obésité

Le syndrome hypoventilation associé à l'Obésité (OHS) est défini par la triade : obésité, hypoventilation diurne et troubles respiratoires du sommeil qui prennent la forme d'apnées et d'hypopnées non obstructives sans atteintes neuromusculaires mécanique ou métabolique permettant d'expliquer l'hypoventilation. Ce syndrome méconnu est une maladie chronique qui conduit à une diminution des activités physiques et sociales de la vie quotidienne et à une augmentation des risques d'hospitalisation et de décès (Mokhlesi, 2010, Jennum and Kjellberg, 2011). Les signes cliniques permettant de diagnostiquer des patients atteints d'OHS (ratio homme/femme de 2:1) sont la présence : d'une obésité morbide (Indice de masse corporelle > 30kg/m<sup>2</sup>), d'un syndrome d'apnée/hypopnée non obstructive du sommeil et

d'une hypoventilation alvéolaire diurne stable ( $PaCO_2$  à l'éveil > 45 mmHg) (Muzumdar and Arens, 2008, Mokhlesi, 2010, Pepin et al., 2012). A noter que pour signer le diagnostic toutes les autres causes possibles d'hypoventilation (neuromusculaire, mécanique ou métabolique) doivent être écartées (Mokhlesi, 2010). Malgré la gravité établie de ce syndrome d'hypoventilation seulement un tiers des patients atteints sont effectivement diagnostiqués (Nowbar et al., 2004, BaHammam et al., 2005). Carrillo et collaborateurs décrivent les résultats d'une étude réalisée sur 173 patients atteints d'OHS admis à l'hôpital pour une insuffisance respiratoire aigüe. Avant leur admission seulement 9% d'entre eux étaient traités à domicile par pression positive continue ou par ventilation non invasive bien que 65% avait déjà été admis dans une unité de soins intensifs pour une insuffisance respiratoire aigüe (Carrillo et al., 2012). Ces données soulignent l'importance de mettre en place une meilleure prise en charge avec un dépistage systématique de l'hypercapnie chez les patients atteints d'obésité. Un examen sensible et peu couteux qui permet de faciliter le diagnostic du syndrome OHS est le dosage sérique du bicarbonate. En effet il est apparu qu'un taux de bicarbonate supérieur à 27 mmol/L témoigne d'une acidose respiratoire chronique (Mokhlesi et al., 2007). Ainsi 97% des patients présentant un taux inférieur à 27 mmol/L ne sont pas atteints de OHS tandis que 90% des OHS testé avait un taux de bicarbonate sérique supérieur à 27 mmol/L (Macavei et al., 2013).

Les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à une hypoventilation chez les patients OHS sont complexes et ont probablement plusieurs composantes (Figure 21). L'obésité impose une charge mécanique excessive à l'appareil respiratoire mais l'hypoventilation chez les patients OHS n'est pas nécessairement due à la surcharge pondérale dès lors qu'un traitement à court terme par pression positive continue améliore la PaCO<sub>2</sub> sans aucune modification significative du poids (Rapoport et al., 1986). A noter qu'il a été rapporté que le travail respiratoire des patients OHS est significativement plus élevé en comparaison de celui des patients obèses non-OHS, suggérant que la performance des muscles respiratoires pourrait être affectée par des perturbations biochimiques associées à l'hypoventilation (acidose ou hypoxémie) (Resta et al., 2000). En comparaison des patients souffrant d'obésité avec ou sans troubles respiratoires du sommeil les patients OHS présentent : une augmentation de la résistance des voies aériennes supérieures (Lin et al., 2004) et un déséquilibre du ratio ventilation-perfusion (Kaltman and Goldring, 1976, Piper and Grunstein, 2010) contribuant à la survenue d'épisodes hypercapnique/hypoxiques pendant le sommeil. Par ailleurs, la diminution de la réponse respiratoire à l'hypoxémie et à l'hypercapnie rapportée chez les patients OHS pourraient contribuer à l'hypoventilation diurne. Mais cette hypothèse ne peut pas à elle seule expliquer le phénotype dès lors qu'il a été montré qu'un traitement par ventilation à pression positive permettait de corriger ces déficits, suggérant que cette diminution de la réponse respiratoire est secondaire au syndrome mais pas l'origine de celui-ci (Han et al., 2001).

Enfin, les patients OHS ont été décrits comme étant résistant à la leptine (Phipps et al., 2002). Cette résistance pourrait être une des composantes qui sous-tend l'hypoventilation. La leptine (aussi appelée hormone de la satiété) produite par les adipocytes est connue pour son effet facilitateur sur la ventilation (Tankersley et al., 1996, O'Donnell et al., 2000). Chez les personnes obèses la surcharge pondérale conduit à une augmentation de la production de

CO<sub>2</sub>, cette surcharge en CO<sub>2</sub> est en partie compensée par le fait que le tissu adipeux synthétise de la leptine qui contribue à augmenter la ventilation et à éliminer le CO<sub>2</sub> en excès (Shimura et al., 2005). Les patients atteints d'OHS ont des niveaux de leptine significativement plus élevée, comparé à des sujets sains à l'indice de masse corporel équivalent et il a été montré que ce taux sérique élevé était diminué après traitement par ventilation à pression positive, suggérant que ces derniers pourraient être résistants à l'effet de la leptine (Phipps et al., 2002, Shimura et al., 2005, Yee et al., 2006).



# Figure 21 : Schéma représentant les mécanismes par lesquels l'obésité peut conduire à hypercapnie diurne chronique.

D'après Mokhlesi et al 2010

### Chapitre IV – les systèmes progestéronergiques

### I- La progestérone et les progestatifs de synthèse

### I.1- La progestérone

La progestérone (du latin pro gestationem qui permet la gestation), appartient à la famille des hormones stéroïdiennes sexuelles (Porcu et al., 2016). Sa formule moléculaire a été initialement décrite par Allen en 1929 (Allen W. M., 1929). Les hormones stéroïdiennes appartiennent à la classe des lipides, elles sont caractérisées par une structure de base commune : un complexe polycyclique de 17 atomes de carbone formant un système à quatre cycles communément appelé noyau stérane (Figure 22). Ce noyau est composé de 3 cyclohexanes (désignés A, B et C), et un cyclopentane (désigné D). D'après le nombre d'atomes de carbone, les hormones stéroïdiennes sexuelles sont divisées en trois groupes : les progestagènes (progestérone, pregnénolone,...) sont caractérisés par leurs 21 atomes de carbone, les androgènes (testostérone, déhydroepiandrosterone,...) en comptent 19, tandis que les œstrogènes (estrone et estradiol,...) en ont 18. Toutes ces hormones ont comme précurseur commun le cholestérol. A partir de ce dernier elles sont synthétisées via une série de réactions enzymatiques, qui en fonction de l'hormone considérée, peut avoir lieu notamment au niveau des gonades, des glandes surrénales, du placenta (Stoffel-Wagner, 2001, Guennoun et al., 2008) mais aussi au sein du SNC (Baulieu, 1991). L



### Figure 22 : Structure de la molécule de progestérone.

La progestérone est une molécule contenant un noyau stérane : squelette de base carbonée (17 carbones), composé de 3 cycles cyclohexanes (cycles A, B et C) et un cycle cyclopentane (cycle D). Cette molécule porte un groupement cétone en C3, un groupement acétyle en C17, deux groupements méthyl en C10 et C13 ainsi qu'une double liaison en C4.

La voie de biosynthèse est la même quel que soit l'organe, mais le type et la quantité de stéroïdes synthétisés et sécrétés dépend de l'expression des enzymes spécifiques à chacun de ces organes (Mellon and Griffin, 2002, Taraborrelli, 2015). La synthèse de progestérone résulte de deux étapes enzymatiques : premièrement la conversion du cholestérol en pregnénolone dans la mitochondrie par le cytochrome P450scc, deuxièmement la conversion de la pregnénolone en progestérone par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) (Figure 23) (Schumacher et al., 2007). Une fois synthétisée la progestérone peut être convertie en glucocorticoïdes et en androgènes. Dans le plasma, elle est transportée de façon prédominante sous forme liée au cortisol-binding globulin (Taraborrelli, 2015), tandis que la fraction libre, qui ne représente qu'une faible part, est capable de passer la barrière

hématoencéphalique. La progestérone a une demi-vie relativement courte dans le corps de seulement cinq minutes (McEwen et al., 1991, Taraborrelli, 2015).



Nature Reviews | Neuroscience

### Figure 23 : Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes.

Les hormones sexuelles stéroïdiennes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. OMM membrane mitochondriale externe IMM membrane mitochondriale interne ; StAR protéine régulatrice de la stéroïdogenèse; TSPO protéine translocatrice ; VDAC canal voltage-dépendent selectif aux anions ; ANT protéine translocatrice de nucléotide adénine ; P450scc : enzyme P450 clivage chaine latérale ;  $3\beta$ -HSD :  $3\beta$  hydroxysteroide deshydrogénase ;  $17\beta$ HSD :  $17\beta$  hydroxysteroide deshydrogénase ;  $3\alpha$ HSD :  $3\alpha$  hydroxysteroide deshydrogénase. (*Arevalo et al., 2015*)

### I.1.1- Ses rôles périphériques

La progestérone est principalement connue pour son rôle en tant qu'hormone sexuelle féminine. Lors de la gestation elle permet notamment, le maintien et la densification de la muqueuse utérine, le développement de la vascularisation de l'endomètre, la facilitation de la nidation du blastocyte, l'apparition de glandes utérines et le développement des tissus mammaires en vue de l'allaitement. Chez la femme, le cycle ovarien dure environ 28 jours. On distingue deux phases *i.e.* la phase folliculaire et la phase lutéale. La phase lutéale est caractérisée par la présence du corps jaune (*corpus luteum*) qui secrète de la progestérone dont le taux peut monter jusqu'à 14 ng/mL par jour (Dreher et al., 2007, Mihm et al., 2011). Le corps jaune se développe puis dégénère s'il n'y a pas fécondation. S'il y a fécondation la progestérone est synthétisée en continue pendant la grossesse par le placenta et contribue au maintien de l'endomètre (Mihm et al., 2011). Chez les rongeurs, le cycle œstral s'étend sur environ 4-5 jours et se décompose en cinq phases reconnaissables par des changements de l'épithélium vaginal *i.e.* prœstrus, œstrus, metestrus et diœstrus. Les taux circulants de progestérone varient au cours du cycle. Ainsi les phases diœstrus et prœstrus sont caractérisées par un niveau de progestérone élevé.

### I.1.2- Ses rôles en tant que neurostéroïde

La progestérone une fois passé la barrière hématoencéphalique peut être qualifiée de stéroïde neuroactif, elle exerce alors son rôle d'hormone, notamment en régulant l'expression de gènes via son interaction avec ses récepteurs nucléaires et membranaires (*cf* : *Chapitre IV: II- Récepteurs cibles de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs de synthèse au sein du SNC*) (Mellon and Griffin, 2002, Behan and Wenninger, 2008). Elle intervient alors dans de multiples processus comme sur la prolifération neuronale, la différenciation, la migration, la survie ou encore la synaptogenèse (Rubin and Carroll, 2009.). Outre son rôle en tant qu'hormone, la progestérone répond à l'appellation de neurostéroïde dès lors qu'elle est synthétisée de novo dans le SNC. Elle exerce alors son action en tant que neuromodulateur et sa présence au sein du SNC, hormis la fraction libre qui franchit la barrière hématoencéphalique, est alors indépendante de la stéroïdogénèse effectuée par les glandes endocrines périphériques.

Le concept de neurostéroïde, établie par Baulieu et collaborateurs, permet de différentier les stéroïdes synthétisés au sein du SNC, de ceux synthétisés au sein des tissus stéroïdogènes classiques (Baulieu, 1991, Compagnone and Mellon, 2000). Dans les années 1980 il a été constaté la présence dans les tissus de l'encéphale de pregnénolone et de déhydroépiandrostérone (DHEA) à des concentrations supérieures à la concentration plasmatique (Corpechot et al., 1981, Corpechot et al., 1983). De plus, dans le cas de la DHEA, sa concentration dans l'encéphale n'est pas affectée par la stimulation ou l'inhibition des glandes surrénales par des modulateurs pharmacologiques (Corpechot et al., 1981). Concernant la pregnénolone, il a été montré que cette dernière est présente dans l'encéphale à une concentration élevée au cours de la période post-natale chez le rat, période qui se caractérise par une quasi complète inactivité des glandes surrénales (Corpechot et al., 1983). Une autre observation indirecte mais importante a permis de montrer que la présence de ces deux neurostéroïdes dans le SNC perdurait deux semaines après une gonadectomie ou une surrénalectomie, malgré le déficit constaté dans les tissus périphériques (Corpechot et al., 1981, Corpechot et al., 1983, Baulieu, 1991). De plus cette hypothèse de la synthèse de novo a été confirmée dès lors qu'il a été mis en évidence que des enzymes responsables de la stéroïdogénèse étaient présentes au sein du SNC et plus particulièrement au niveau des neurones et des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) (Mellon and Griffin, 2002). Grâce à des dosages enzymatiques et des approches d'immunohistologie et de biologie moléculaire, une cartographie des enzymes stéroïdogéniques au sein de l'encéphale a pu être établie (Compagnone and Mellon, 2000). Ainsi, le cytochrome P450scc est retrouvé au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du cervelet et de la moelle épinière (Compagnone and Mellon, 2000) tandis que la  $3\beta$ -HSD est de surcroit exprimée au niveau de la partie dorsale du bulbe rachidien et du pont (Dupont et al., 1994, Guennoun et al., 1995, Compagnone and Mellon, 2000).

Plusieurs rôles de la progestérone en tant que neurostéroïde au sein du SNC ont été décrits (Mellon and Griffin, 2002). Ses actions génomiques ou non-génomiques peuvent être médiées directement par la progestérone ou indirectement par ses métabolites comme l'alloprégnanolone. On retiendra que la progestérone aurait un effet neuroprotecteur

notamment en favorisant la production de myéline (Thomas et al., 1999, Mellon and Griffin, 2002). Elle semble également affecter les sphères cognitives et comportementales : l'augmentation des niveaux de cette hormone *post-partum* pourrait expliquer la réduction des comportements agressifs chez des souris allaitantes (Pinna et al., 2008). Par des mécanismes non-génomiques comme son interaction directe ou indirecte *via* l'alloprégnanolone sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, la progestérone pourrait avoir un rôle protecteur dans les comportements agressifs, épileptiques, la dépression et l'anxiété (Majewska et al., 1986, Pinna et al., 2008). Les effets de la progestérone et de ses métabolites sur la respiration seront détaillés dans la partie III. Les systèmes progestéronergiques et la ventilation.

### I.2- Les progestatifs de synthèse

Le terme progestatif désigne les progestatifs de synthèse qui sont capables de se lier aux même récepteurs que la progestérone et de reproduire l'effet biologique de la molécule endogène (Sitruk-Ware, 2008). Dans les années 1950, en remplaçant le groupe méthyle en position 19 de la progestérone par un atome d'hydrogène, Birch a obtenu un composé ayant une activité progestative quatre à huit fois supérieure à celle de la progestérone, la 19norprogestérone (Birch, 1950). La formulation de nombreux autres composés progestatifs découle de cette découverte. On classe les progestatifs de synthèse utilisés en clinique selon si ils sont des dérivés de la testostérone (dérivés de la 19-nortestosterone) ou de la progestérone (dérivés de la 17-OH progestérone et de la 19-norprogesterone) (Benagiano et al., 2004, Sitruk-Ware, 2008) (Tableau 2).

Testotérone	Progestérone	
19-nortestotérone	17-hydroxprogestérone	19-norprogestérone
estranes	préganes	nor-préganes
norethynodrel	médroxprogestérone acétate	promégestone
norethistérone	mégestrol acétate	trimégestone
gonanes	chlormadinone acétate	nestérone
lévonogestrel	cyprotérone acétate	
norgestrel		
désogestrel		
gestodène		
norgestimate		

Tableau 2 : Tableau représentant les différentes classes de progestatifs de synthèse.

Les progestatifs de synthèse sont soient des dérivés de la testostérone (dérivés de la 19nortestostérone) soient de la progestérone (dérivés de la 17-hydroxyprogestérone et de la 19norprogestérone). Les dérivés de la 19-nortestostérone incluent les progestatifs du groupe des estranes et des gonanes. Les dérivés de la 17-hydroxyprogestérone constituent la famille des pregnanes et les dérivés de la 19- norprogestérone la famille des nor-pregnanes. Dans le plasma, ces progestatifs se retrouvent principalement liée à la protéine de liaison des hormones sexuelles la Sex Hormone Binding Globuline (SHBG) ou à la sérum albumine avec plus ou moins d'affinité suivant le progestatif et en faible proportion sous forme libre (Schindler et al., 2008).

### I.2.1- Dérivés de la 19-nortestosterone

Les dérivés de la 19-nortestosterone sont classés en deux groupes *i.e.* les estranes, et les gonanes. Ces dérivés de la testostérone sont aujourd'hui pour la plupart utilisés comme contraceptifs (Stanczyk, 2002, Sitruk-Ware, 2008) (Tableau 2).

### I.2.1.1- Les estranes

Les estranes sont des composés constitués de 18 atomes de carbones ayant un groupe méthyle au niveau du carbone 13 du noyau stérane (Edgren and Stanczyk, 1999, Schindler et al., 2003, Sitruk-Ware, 2008).

Le noréthynodrel a été le premier progestatif synthétisé. Historiquement il constitue la classe de progestatif de première génération. Cette pro-drogue est métabolisée en norethistérone (Stanczyk, 2002, Sitruk-Ware, 2008).

La norethistérone, appartenant à la seconde génération, est souvent utilisé sous forme de noréthistérone acétate (Sitruk-Ware, 2008). Ces derniers sont rapidement absorbés dans l'intestin avec une biodisponibilité d'environ 64%. Dans le plasma, cette molécule se retrouve dans une large proportion sous forme liée (61% à la sérum albumine, 36% à la SHBG), ce qui participe au fait que le temps de demi-vie de cette molécule dans l'organisme est d'environ 7-8H (Sitruk-Ware, 2008). Le norethistérone et le noréthistérone acétate sont prescrits en cas d'endométriose, d'irrégularité du cycle menstruel, ou encore de troubles de la ménopause (Vercellini et al., 2016). Ces molécules possèdent une activité progestéronergique, androgénique et œstrogénique (Schindler et al., 2008).

### I.2.1.2- Les gonanes

Le terme gonane regroupe les noyaux stéranes à 17 carbones *i.e.* le cyclopentanoperhydrophenanthrène (Edgren and Stanczyk, 1999). Les progestatifs de ce groupe possèdent un groupe éthyle au niveau du carbone 13 du noyau stérane (Edgren and Stanczyk, 1999, Benagiano et al., 2004). Ils constituent une partie des progestatifs de seconde génération, incluant le lévonorgestrel, et les progestatifs de troisième génération contenant le désogestrel, le gestodène et la norgestimate (Benagiano et al., 2004, Sitruk-Ware, 2008) (Tableau 2).

Le lévonorgestrel est rapidement absorbé lorsqu'il est pris par voie orale. Sa biodisponibilité est pratiquement de 100% et le niveau du pic plasmatique est obtenu 1 à 3 heures après l'administration. Dans le plasma, 50% est lié à la sérum albumine, 47,5% à la SHGB et 2,5% se retrouve sous forme libre. Sa demi-vie peut aller jusqu'à 26H (Sitruk-Ware, 2008). Il possède une forte activité progestéronergique, une activité androgénique et pas d'activité

œstrogénique (Schindler et al., 2008, Kubli-Garfias et al., 2013). Il est utilisé comme contraceptif et contraceptif d'urgence (pilule du lendemain) administré oralement mais on le retrouve également associé à des dispositifs intra-utérins ou son action est alors locale. Il exerce son action en supprimant le pic de l'hormone lutéinisante ce qui perturbe le processus d'ovulation. A noter que de fait, dans le cadre d'une contraception d'urgence le lévonorgestrel doit être pris avant que le pic d'hormone lutéinisante ne soit enclenché et donc avant que le processus l'ovulation ne soit amorcée, sous peine de ne pas être efficace.

Le désogestrel est une pro-drogue métabolisée en 3-keto-desogestrel (ou étonogestrel, ETO), son principal métabolite biologiquement actif formé *in vivo* (Figure 24). Sa biodisponibilité orale est de 76% (Sitruk-Ware, 2008). En tant que membre des progestatifs de troisième générations le désogestrel présente une plus grande affinité pour les récepteurs de la progestérone que ces prédécesseurs, une plus faible affinité pour les récepteurs des androgènes, une plus grande spécificité d'action (Benagiano et al., 2004). Le pic de concentration plasmatique est atteint en 2 heures. On le retrouve majoritairement sous forme lié (76% à la sérum albumine, 32% à la SHBG) et les 2% restants sont libres dans le plasma. Comme le lévonorgestrel, l'ETO possède une forte activité progestéronergique, une activité androgénique moindre et pas d'activité œstrogénique (Verhoeven et al., 1998, Timmer et al., 1999, Schindler et al., 2003, Grandi et al., 2014). Le désogestrel est utilisé comme contraceptif administré oralement sous forme de pilule, son action contraceptive tient au fait qu'il inhibe l'ovulation et augmente la viscosité de la glaire cervicale.



### Figure 24 : Structure des molécules de désogestrel et d'étonogestrel.

Le désogestrel (à droite) est une pro-drogue métabolisée en 3-keto-desogestrel ou étonogestrel (à gauche) son principal métabolite biologiquement actif formé *in vivo*.

Le gestodène, biologiquement déjà actif, possède une biodisponibilité proche de 100% et le pic de concentration plasmatique est atteint en 2 heures. Il est considéré comme l'un des progestatifs le plus puissant en terme d'inhibition de l'ovulation et il est le progestatif qui, par rapport à la dose ingérée, présente la plus forte concentration dans le plasma (Benagiano et al., 2004). Le gestodène a une activité progestéronergique, androgénique moindre et pas d'activité œstrogénique (Philibert et al., 1999, Schindler et al., 2008).

Le norgestimate est métabolisé en norgestrel. Le pic de concentration plasmatique est atteint 1H après administration. Il a des propriétés progestéronergique, androgénique et pas d'activité œstrogénique (Schindler et al., 2008). Il est utilisé comme traitement contraceptif dont les effets passent par l'inhibition de l'ovulation, l'augmentation de la viscosité de de la glaire cervicale et des modifications de la motilité des trompes de Fallope et de l'endomètre.

### I.2.2- Dérivés de la 172-hydroxyprogesterone (pregnanes)

Les dérivés de la famille des pregnanes comportent la medroxyprogestérone acétate, la chlormadinone acétate, la cyprotérone acétate et le mégestrol acétate (Tableau 2) (Schindler et al., 2008). Ils contiennent un groupement COCH<sub>3</sub> au niveau du carbone 17 avec une double liaison en C4. A noter que les progestatifs de cette famille listés ci-dessous présentent la propriété d'interagir avec les récepteurs aux glucocorticoïdes et d'en moduler le fonctionnement.

Le medroxyprogestérone acétate a une biodisponibilité proche de 100% et est liée à 88% à la sérum albumine. Il possède une activité progestéronergique une faible activité androgénique et pas d'activité œstrogénique (Hellman et al., 1976, Bullock and Bardin, 1977, Schindler et al., 2003, Kubli-Garfias et al., 2013). Il est prescrit en tant que contraceptif qui inhibe l'ovulation, épaissit la glaire cervicale et réduit l'épaisseur de l'endomètre. En outre il est également utilisé pour traiter certains types de cancers de l'endomètre et du sein.

La molécule de chlormadinone acétate présente un atome de chlorine au niveau du C6. Sa biodisponibilité est proche de 100% et est liée à 93% à la sérum albumine. Il possède une activité progestéronergique et pas d'activité androgénique et œstrogénique (Schindler et al., 2003). Il est utilisé comme traitement contraceptif et pour traiter notamment les dysménorrhées, les syndromes prémenstruels et les troubles gynécologiques dus à une insuffisance lutéale.

Le cyprotérone acétate porte également un atome de chlorine au niveau du C6. Sa biodisponibilité est proche de 100%. Il possède une activité progestéronergique et pas d'activité androgénique ni œstrogénique (Bullock and Bardin, 1977, Schindler et al., 2003). Outre son action contraceptive cette molécule de par son action antiandrogènique est notamment utilisée dans le cadre de cancer de la prostate et pour traiter l'hirsutisme féminin. La biodisponibilité du mégestrol acétate est également proche de 100%. Cette molécule se lie en majorité à la sérum albumine. Elle possède une activité progestéronergique, une faible activité androgénique et pas d'activité œstrogénique (Bullock and Bardin, 1977, Schindler et al., 2003).

### I.2.3- Dérivés de la 19-Norprogesterone (nor-pregnanes)

Les dérivés de la famille des nor-pregnanes comportent le promégestone le trimégestone et le nesterone. Ces dérivés contiennent un groupement méthyle, en plus du COCH<sub>3</sub> au niveau du C17 avec une double liaison en C4. Ils possèdent une activité progestéronergique, anti-gonadotropique et anti-œstrogénique sans exercer d'action sur les récepteurs aux glucocorticoïdes ou au minéralocorticoïdes (Schindler et al., 2003, Sitruk-Ware, 2008).

Le promégestone est rapidement absorbé après l'ingestion orale et a une demi-vie courte. La concentration maximale est atteinte 1-2 h après l'administration. Il est principalement lié à la sérum albumin et est métabolisé par hydroxylation (Schindler et al., 2003).

Le trimégestone est un métabolite actif de promégestone, il a un effet progestatif fort. Son utilisation en clinique est récente (Schindler et al., 2003).

Le nestérone est très actif uniquement, lorsqu'il est administré par voie parentérale en raison de son métabolisme hépatique rapide. Il ne se lie pas à la SHBG et est rapidement excrété (Schindler et al., 2003).

# II- Récepteurs cibles de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs de synthèse au sein du SNC

Les mécanismes par lesquels la progestérone, les stéroïdes neuroactifs et les neurostéroïdes agissent au sein du SNC comprennent à la fois des actions génomiques et nongénomiques médiées respectivement par des récepteurs nucléaires et membranaires spécifiques ou non de la progestérone.

### II.1- Récepteurs nucléaires à la progestérone

### II.1.1- Récepteurs nucléaires, les isoformes présentes dans l'encéphale

Les récepteurs nucléaires à la progestérone (RP) appartiennent à la super-famille des facteurs transcriptionels. Ils transrégulent l'expression de gènes ayant une séquence Progesterone Responsive Element (PRE) au niveau de leur promoteur (Brinton et al., 2008). L'expression des gènes en question entraine plusieurs effets qui constituent la réponse physiologique aujourd'hui bien documentée à la progestérone et aux progestatifs. La progestérone se lie majoritairement dans l'encéphale à deux isoformes RP-A et RP-B provenant d'un seul gène localisé sur le chromosome 11. Les deux isoformes sont obtenus par promoteurs alternatifs, PR-A est tronquée en N-terminal de 164 aa par rapport à l'isoforme RP-B (Figure 25). Cette séquence de 164 aa constitue un activation function 3 (AF3) un site d'activation de la transcription qui permet au RP-B de recruter des co-activateurs, qui vont faciliter le recrutement du complexe d'initiation de la transcription. RP-A et RP-B sont tous les deux codés par un gène de 8 exons et comportent différents domaines d'activités aux homologies de séquence plus ou moins importantes en fonction du domaine considéré. L'exon 1 code AF3 (présent que sur RP-B) ainsi qu'une région capable de recruter des co-répresseurs (inhibition factor, IF) et un second domaine AF1, les exons 2 et 3 codent un domaine conservé de liaison à l'ADN, l'exon 4 contient la séquence signale permettant la translocation dans le noyau ainsi qu'une partie du domaine conservé de liaison au ligand, l'exon 5 et une partie de l'exon 6 finissent de coder ce domaine, tandis que la fin de l'exon 6, l'exon 7 et la majorité de l'exon 8 codent un troisième AF, AF2 (Figure 25) (Brinton et al., 2008). En l'absence de ligand, les PRs sont complexés à l'extérieur du noyau à des protéines chaperonnes HSP90, HSP70 et HSP40 (Pratt, 1998, Pratt and Toft, 2003). Les changements conformationnels induits par la liaison du ligand à son récepteur entrainent la dissociation des protéines chaperonnes. Le complexe ligand/récepteur se dimérise avant d'être transloqué dans le noyau où il va alors interagir avec les séquences PRE des gènes dont il va réguler la transcription (Edwards et al., 1991, Leonhardt et al., 2003).

Du fait de l'absence du domaine AF3 sur le récepteur RP-A, les deux isoformes majoritaires dans l'encéphale ont des activités transcriptionnelles distinctes. En effet le

domaine IF présent sur les deux isoformes bloquerait les fonctions transcriptionnelles de AF1 et AF2. Dans la forme RP-B, le domaine AF3 servirait à masquer le domaine IF permettant aux domaines AF1 et AF2 d'être fonctionnels (Giangrande et al., 2000). De plus des variants autres que RP-A et RP-B ont été identifiés (Hirata et al., 2003). Le variant RP-C est obtenu par omission de l'exon 1 tandis que les variants PR-S et PR-T sont obtenus par omission des exons 1 à 3. A noter qu'il a également été rapporté la présence d'exons-introniques notés T et S entre les exons 3 et 4 et i45a et i45b entre les exons 4 et 5. Ces séquences normalement épissées sont alors présentes dans la région 5'UTR (pour les exons T et S) de l'ARNm ou au sein de la séquence codante (pour les exons i45a et i45b) et participent vraisemblablement à la régulation des modifications post-transcriptionelles sans que les mécanismes aient été élucidés (Hirata et al., 2003, Brinton et al., 2008). La découverte de ces nouveaux variants aux fonctions biologiques distinctes ajoute un niveau de complexité dans la compréhension de l'impact des ligands des RP.



### Figure 25 : Structure du gène codant pour PR-A et PR-B et domaines fonctionnels.

Chez le rat, le gène (tout en haut) du récepteur nucléaire à la progestérone (PR) est composé de 8 exons. Les deux isoformes PR-A et PR-B obtenus par promoteurs alternatifs, on distingue donc deux sites d'initiation de la transcription (flèches rouges horizontales). Le site de terminaison de la transcription est lui commun (flèche rouge verticale). PR-A est tronquée en N-terminal de 164 aa par rapport à l'isoforme RP-B. AF : domaine d'activation fonctionnelle ; IF : domaine de recrutement d'inhibiteur ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; h : séquence signal permettant la translocation dans le noyau ; LBD : domaine de liaison du ligand. *D'après Brinton et al. 2008* 

La proportion tissulaire relative des différentes isoformes de RPs varie en fonction du tissu cible et de la situation physiologique (Bethea and Widmann, 1998). L'expression des RPs dans l'encéphale varie notamment en fonction des fluctuations hormonales, de l'âge et de la localisation encéphalique (Bethea and Widmann, 1998, Guerra-Araiza et al., 2002, Camacho-Arroyo et al., 2007). A noter que les variations d'expression des RPs au niveau des structures respiratoires n'ont pas à ma connaissance été étudiées.

### II.1.2- Localisation des RPs au niveau de structures en lien avec la respiration

Au sein du SNC, les PR sont retrouvés au niveau de structures du tronc cérébral : la région ventrolatérale du bulbe rachidien (Kastrup et al., 1999), le NTS (Haywood et al., 1999), le XIIN (Kastrup et al., 1999, Behan and Thomas, 2005), le LC (Helena et al., 2009), le noyau parabrachial (Kastrup et al., 1999) ; du diencéphale : zone pré-optique, l'aire ventrolatérale (Lauber et al., 1991, Furuta et al., 2010), l'hypothalamus notamment le noyau dorsomédian (Kato et al., 1994, Guerra-Araiza et al., 2001), le noyau arqué (Lauber et al., 1991, Guerra-Araiza et al., 2001), le noyau arqué (Kato et al., 1994, Guerra-Araiza et al., 2001).

Les études ayant étudié l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles sur les chémorécepteurs périphériques sont peu nombreuses. Chez le rat adulte et nouveau-né, la présence de récepteurs PR localisés au niveau des cellules chémosensibles du corps carotidien a été mise en évidence par immunohistochimie et Western Blot (Joseph et al., 2006). Dans ce même article il a également été mis en évidence la présence de P450scc, la première enzyme impliquée dans l'étape de la synthèse des stéroïdes, qui convertit le cholestérol en pregnénolone. L'isoforme PR-A semble être prédominante par rapport l'isoforme PR-C (Joseph et al., 2006).

### II.2- Récepteurs membranaires à la progestérone

De nombreux effets des stéroïdes ne peuvent pas être expliqués par des mécanismes génomiques classiques dans la mesure où cela implique la transcription d'ARNm et la traduction de protéines, un processus relativement lent, se situant sur une échelle de temps qui va de l'heure à quelques jours. Or il a été montré que des stéroïdes sont capables d'initier l'activation de voie de signalisation intracellulaire qui entraîne des modifications des flux d'ions et des concentrations en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire en quelques secondes (Blackmore et al., 1991) ainsi que le recrutement d'autre seconds messagers en quelques minutes (Liu and Patino, 1993, Filardo et al., 2000). Une étude a notamment montré que l'induction de la maturation des ovocytes médiée par des récepteurs membranaires à la progestérone était imputable à un mécanisme non génomique dans la mesure où il n'a pas été bloqué par l'ajout d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction (DeManno and Goetz, 1987, Thomas et al., 2002). Ainsi peu à peu des preuves se sont accumulées quant à l'existence de récepteurs à la progestérone localisés à la membrane plasmique des cellules cibles qui enclenchent des mécanismes non génomiques (Revelli et al., 1994, Revelli et al., 1998, Watson and Gametchu, 1999, Falkenstein et al., 2000). A noter que qu'il ne faut pas exclure le fait que la liaison du ligand aux récepteurs membranaires de la progestérone peut enclencher des voies de signalisation comme celle des MAPkinases (Pace and Thomas, 2005), qui in fine entraine des modifications de la transcription de gène (Karteris et al., 2006).

### II.2.1- Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs membranaires à la progestérone (mPR) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs adipoQ (Progestin and AdipoQ Receptors, PAQR) (Thomas, 2008, Kelder et al., 2010, Thomas and Pang, 2012). Les mPR comptent 11 membres dont on distingue trois classes en fonction de leur structure et leur caractéristique de liaison au ligand (Tang et al., 2005). Seuls les mPR de classe II sont sensibles à la progestérone (Smith et al., 2008). La classe II comporte cinq membres uniquement présents chez les vertébrés, comprenant les PAQR7 (ou mPR $\alpha$ ), qui ont pour la première fois été identifiés chez la truite de mer tachetée (Zhu et al., 2003), les PAQR8 (ou mPR $\beta$ ) et PAQR5 (ou mPR $\gamma$ ) identifiés chez l'Homme et d'autres vertébrés (Zhu et al., 2003) et les PAQR6 (ou mPR $\delta$ ) et PAQR9 (ou mPR $\epsilon$ ), également identifiés chez les humains mais pour lesquels les caractéristiques restent pour le moment encore peu élucidées (Smith et al., 2008, Pang et al., 2013). Ces récepteurs présents chez l'Homme sont hautement conservés chez le rongeur (Zhu et al., 2003, Smith et al., 2008, Liu and Arbogast, 2009).

### II.2.1.1- mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ et mPR $\gamma$

En utilisant différentes approches expérimentales il a été montré que les mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  et mPR $\gamma$  sont des récepteurs couplés à une protéine G sensible à la toxine pertussique, la protéine Gi inhibitrice (Zhu et al., 2003, Thomas et al., 2007, Moussatche and Lyons, 2012). En conséquence la liaison du progestatif sur ces récepteurs entraine une réduction de l'activité des adénylates cyclases, des enzymes qui catalysent la production d'AMPc (Thomas et al., 2007).

La présence de ces récepteurs au sein de l'encéphale humain a été prouvé par RT-PCR par Tang et collaborateurs (Tang et al., 2005). Ensuite différentes études se sont attachées à étudier la distribution des protéines et des ARNm codant les différentes isoformes, au sein du SNC (Zuloaga et al., 2012, Meffre et al., 2013, Pang et al., 2013). Ainsi, ces récepteurs exprimés préférentiellement dans les neurones (Meffre et al., 2013), sont présents dans différentes régions de l'encéphale : l'hypothalamus, le tronc cérébral, le cortex cérébral, l'hippocampe, le cervelet ou encore la moelle épinière (Labombarda et al., 2010, Zuloaga et al., 2012, Meffre et al., 2013, Pang et al., 2013), à des niveaux équivalents entre mâles et femelles (Meffre et al., 2013). Certaines des structures où ces récepteurs sont exprimés sont impliquées dans le contrôle de la respiration. Il a notamment été montré la présence des récepteurs mPR $\beta$  dans la région dorsale du tronc cérébral, notamment au niveau du NTS et du XIIN (Boukari et al., 2015).

### II.2.1.2- mPR $\delta$ et mPR $\varepsilon$

Les récepteurs mPR $\delta$  et mPR $\epsilon$  découverts plus récemment (Smith et al., 2008) semblent présenter une affinité plus grande à la progestérone que les mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  et mPR $\gamma$  (Zhu et al., 2003, Pang et al., 2013, Petersen et al., 2013). Les expériences de co-immunoprécipitation réalisées ont montré que ces récepteurs sont couplés à une protéine G

stimulatrice, de fait la fixation du ligand entraine une augmentation de la concentration en AMPc (Pang et al., 2013). mPR $\delta$  semble être le seul membre des mPR identifié à ce jour comme étant spécifique à l'encéphale où il est l'isoforme la plus représentée, on le retrouve dans le cortex, l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau accumbens, le bulbe olfactif, le pont, le corps calleux, ou encore la moelle épinière (Pang et al., 2013). mPR $\epsilon$  est lui abondant dans la glande hypophyse et l'hypothalamus (Pang et al., 2013).

### II.2.2- PGRMC1

Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) est la nomenclature approuvée pour cette protéine de 194 aa conservée chez les vertébrés qui contient un court domaine N-terminal, un domaine transmembranaire, et un domaine C-terminal caractérisé par la présence d'un motif cytochrome b5 (Cahill, 2007, Petersen et al., 2013). Cette protéine après avoir été découverte dans différentes espèces a donné lieu à une pléthore de noms synonymes en lien avec les processus biologiques ou avec les tissus auquel il a été associé ostensiblement indépendants.

Purifié en 1996, à partir de foie de porc cette protéine a ensuite été clonée dans la même espèce à partir des cellulaires musculaires lisses (Falkenstein et al., 1996, Meyer et al., 1996). Par la suite, des protéines homologues ont indépendamment été clonées dans d'autres espèces de vertébrés par plusieurs équipes de recherches qui lui ont donné différents noms. Le terme le plus couramment utilisé avec PGRMC1 (Losel et al., 2004, Peluso et al., 2005) pour décrire l'expression et la régulation de ce récepteur membranaire dans l'encéphale et la moelle épinière est 25-Dx (Krebs et al., 2000, Meffre et al., 2005) pour son induction dans le foie de rats traités à la dioxine (Selmin et al., 1996).

PGRMC1 est une protéine dont la localisation subcellulaire n'est pas encore complètement élucidée (Cahill, 2007). PGRMC1 a été purifiée à partir des fractions membranaires de foie de rat (Meyer et al., 1996) et a été montrée comme présente dans la fraction du réticulum endoplasmique (Nolte et al., 2000). Les expériences d'immunohistochimie sur des cellules de Purkinje ont suggéré une distribution de PGRMC1 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Sakamoto et al., 2004). Raza et collaborateurs (Raza et al., 2001) ont observé PGRMC1 dans les microsomes et dans les fractions mitochondriales chez le rat. Par ailleurs PGRMC1 a été détectée à la surface de cellules non perméabilisées (Peluso et al., 2006), suggérant qu'au moins une certaine proportion de cette protéine était présente à la membrane plasmique. Les spermatozoïdes semblent également posséder PGRMC1 à la surface de la membrane plasmique, dans la mesure où un anticorps dirigé contre la région N-terminale de PGRMC1 bloque spécifiquement la réaction acrosomiale qui accompagne la fécondation (Buddhikot et al., 1999). Bramley et collaborateurs ont rapporté que PGRMC1 co-précipite avec la cavéoline (Bramley et al., 2002), et que cela dépendait de la fixation de ligand du récepteur. Ainsi, il a été suggéré que PGRMC1 serait associée à des membranes intracellulaires et qu'il se retrouve ensuite transitoirement à la surface cellulaire, avant d'être recyclé, le cas échéant, par endocytose (Runko and Kaprielian, 2002). Dans leur revue de 2004, Min et collaborateurs suggèrent que PGRMC1 pourrait former des polymères ce qui pourrait entraîner des changements dans la distribution intracellulaire de cette protéine en modifiant également sa fonction (Min et al., 2004). Par conséquent, il est probablement prudent de supposer que PGRMC1 peut modifier son emplacement subcellulaire dans certaines circonstances, qui sont encore mal connues, et que cette redistribution pourrait être importante pour les processus biologiques.

Plusieurs ligands ont été décrits pour PGRMC1 : l'hème qui se fixe au niveau du motif cytochrome b5 (Song et al., 2004), le cholestérol et parmi les stéroïdes la progestérone et les glucocorticoïdes (Menzies et al., 1999, Cahill, 2007), qui témoignent des potentielles nombreuses fonctions biologiques de ce récepteur. En réalisant des expériences de compétition de liaison dans un modèle de cellules CHO il est apparu que PGRMC1 à la propriété d'interagir avec des stéroïdes (Falkenstein et al., 1996). Ainsi il a été mis en évidence une forte affinité de ce récepteur pour la progestérone, une affinité modérée pour la testostérone, une faible affinité pour la corticostérone et le cortisol et aucune affinité pour l'œstradiol et l'aldostérone (Falkenstein et al., 1996). La liaison de la progestérone à PGRMC1 est sélective, réversible et rapide (Falkenstein et al., 1996, Meyer et al., 1996). De plus il est important de noter que PGRMC1 nécessite pour être en mesure d'exercer certaines fonctions notamment anti-apoptotique de se lier avec un partenaire protéique connu sous le nom serpine mRNA binding protein 1 (Peluso et al., 2005, 2006).

Des techniques d'immunohistochimie et de RT-PCR ont permis de mettre en évidence la présence de PGRMC1 au sein du SNC et notamment au niveau du tronc cérébral, de l'hypothalamus du cortex cérébral ou encore du cervelet (Meffre et al., 2005, Guennoun et al., 2008, Intlekofer and Petersen, 2011, Guennoun et al., 2015). De plus, PGRMC1 est exprimé au sein de structures connues pour être impliquées dans la genèse du rythme respiratoire comme le préBotz (Tan et al., 2012) (Figure 26) ainsi que des structures impliquées dans la modulation du rythme respiratoire comme le NTS, la PAG dans le mésencéphale, et l'hypothalamus caudal (Intlekofer and Petersen, 2011, Tan et al., 2012).

Pour finir, des données suggèrent que PGRMC1 pourrait également agir comme une protéine adaptatrice, en liant et en permettant le transport de mPR $\alpha$  jusqu'à la surface cellulaire, où PGRMC1 et mPR $\alpha$  constitueraient alors les composants d'un complexe de protéine agissant comme récepteur à la progestérone (Thomas et al., 2014). L'intégration de cette mosaïque d'informations donne un aperçu des multiples fonctions implicites de cette protéine encore mal connue.



Figure 26 : Profil d'expression bulbaire du gène Pgrmc1.

Le profil d'expression du gène Pgrmc1 a été déterminé en utilisant une sonde ARN radioactive S35 sur photographie à fond clair. Pgrmc1 est fortement exprimé dans le noyau du tractus solitaire (NTS), les olives inférieures (IO) et le préBotz. La flèche indique des neurones marqués. Echelle = 30µm. *D'après Tan et al. 2012* 

### II.3- Récepteurs à d'autres messagers chimiques

### II.3.1- Récepteurs GABAA

Dans l'encéphale, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est synthétisé grâce à l'acide glutamique décarboxylase (GAD) qui en catalysant la réaction de décarboxylation du glutamate forme le GABA (Erlander et al., 1991). Deux isoformes de l'enzyme GAD ont été décrites GAD65 et GAD67, en référence à leur poids moléculaires respectifs de 65 et 67 kDa. Codées par des gènes différents, ces deux isoformes diffèrent au niveau de leur localisation subcellulaire : GAD65 est majoritairement retrouvée au niveau des terminaisons nerveuses où elle est liée à la membrane et est responsable de la production de GABA directement dans des vésicules, tandis que GAD67 est détectée dans le cytoplasme des corps cellulaires où elle est responsable de la production cytoplasmique de GABA (Erlander et al., 1991, Kaufman et al., 1991). Les effets du GABA sont médiés par deux classes de récepteurs *i.e.* les récepteurs GABA<sub>B</sub> métabotropiques et récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub> ionotropiques perméables aux ions chlorure (Benarroch, 2012, Comenencia-Ortiz et al., 2014).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des canaux perméables aux ions Cl<sup>-</sup> qui appartiennent à la super-famille des canaux ioniques ligands-dépendants à boucle-cystéine (Figure 27). Ils sont responsables d'une proportion importante des inhibitions synaptiques rapide du SNC et sont la cible de nombreuses molécules thérapeutiques, comme les benzodiazépines, les anesthésiques généraux ou certains anticonvulsivants (Frolund et al., 2002, Braat and Kooy, 2015, Knoflach et al., 2016). La liaison du ligand entraine un changement conformationnel de GABA<sub>A</sub> permettant ainsi une entrée ou une sortie d'un flux ionique en fonction du gradient électrochimique du Cl<sup>-</sup>. Le gradient électrochimique de chlorure est généré et maintenu

principalement par deux co-transporteurs de Cl<sup>-</sup>, NKCC1 (fait entrer dans la cellule deux Cl<sup>-</sup> en plus d'un Na<sup>+</sup> et d'un K<sup>+</sup>) et KCC2 (fait sortir de la cellule un Cl<sup>-</sup> en même temps qu'un K<sup>+</sup>) (Ben-Ari et al., 2012, Braat and Kooy, 2015). Le niveau relatif d'expression de ces deux cotransporteurs diffère selon l'état de maturité du SNC. Pendant les étapes précoces du développement, contrairement à KCC2, NKCC1 est fortement exprimé et est alors responsable d'une concentration intracellulaire élevée en Cl<sup>-</sup>. Le gradient électrochimique allant dans le sens d'une sortie de Cl<sup>-</sup>, les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont principalement dépolarisants. Avec le développement le niveau d'expression entre NKCC1 et KCC2 s'inverse reversant ainsi le gradient électrochimique de Cl<sup>-</sup> et rendant les courants sous-tendus par GABA<sub>A</sub> majoritairement hyperpolarisants (Ben-Ari et al., 2012).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des hétéromères pentamériques (Figure 27). On dénombre aujourd'hui 19 sous-unités regroupées, en fonction des homologies de séquence, en sousfamille  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  et  $\rho_{1-3}$  (Barnard et al., 1998, Sarto-Jackson and Sieghart, 2008). Bien que différentes ces sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> partagent une structure commune *i.e.* un grand domaine extracellulaire, quatre domaines transmembranaires hautement conservés et un domaine intracellulaire. Ces sous-unités s'organisent alors en formant un canal sélectif aux ions Cl<sup>-</sup> (Connolly and Wafford, 2004). Ce panel de sous-unité permet l'expression de 20-30 isoformes distinctes du récepteur GABA<sub>A</sub> dans le SNC, aux caractéristiques d'expression, de distribution, biophysiques et pharmacologiques distinctes, témoignant ainsi de la régulation complexe des mécanismes inhérents à ce récepteur (Connolly et al., 1996, Pirker et al., 2000, Sieghart and Sperk, 2002, Waldvogel and Faull, 2015). La majorité des récepteurs GABA<sub>A</sub> comprennent les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  avec une stœchiométrie de 2:2:1 (Belelli et al., 2002). De la composition en sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> semble dépendre de nombreuses propriétés pharmacologiques. Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur l'ovocyte de xénope ont mis en évidence que l'effet modulateur de l'alloprégnanolone (un stéroïde dérivé de la progestérone) sur GABA<sub>A</sub> était influencé par la composition en sous-unités de ce dernier (Belelli et al., 2002). Ainsi les expériences démontrent que la présence des sous-unités  $\delta$ ,  $\alpha_1 \alpha_3$  confèrent aux récepteurs GABA<sub>A</sub> une plus grande sensibilité à sa modulation par l'alloprégnanolone, que la sous-unité  $\beta$  n'aurait pas d'influence, tandis que la présence de sous-unité  $\varepsilon$  semble le rendre insensible à ses modulations (Belelli et al., 2002). De plus selon sa composition en sous-unités un récepteur GABA<sub>A</sub> pourrait être plus ou moins sensible pour une même concentration de stéroïdes. En effet la réponse évoquée, obtenue sur les isoformes contenant les sous-unités  $\alpha_1$  ou  $\alpha_3$  sont importantes pour de faibles concentrations d'alloprégnanolone tandis que les récepteurs équivalents qui ont les sous-unités  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  ou  $\alpha_6$  atteignent la même réponse évoquée avec des concentrations 3 à 10 fois supérieures (Belelli et al., 2002). Par ailleurs des modifications du niveau d'expression des sous-unités  $\alpha_4$  et  $\delta$  et des sous-unités  $\alpha_4 \beta_1$  et  $\delta$  ont été corrélées à des fluctuations de la concentration d'alloprégnanolone et de progestérone respectivement, suggérant que les neurostéroïdes pourraient moduler l'expression des sousunités des récepteurs GABA<sub>A</sub> et ainsi moduler la transmission GABA<sub>A</sub>ergique (Gulinello et al., 2001, Griffiths and Lovick, 2005, Maguire and Mody, 2009).



### Figure 27 : Récepteur ionotropique GABA<sub>A</sub>.

Représentation schématique du récepteur GABA<sub>A</sub> et des sites de liaison du GABA et des neurostéroïdes. Le récepteur GABA<sub>A</sub> est composé de 5 sous-unités qui forment un canal perméable aux ions Cl<sup>-</sup>. Il est constitué des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ et  $\gamma$  bien que la sous-unité  $\gamma$  puisse être remplacée par  $\delta$  ou  $\epsilon$ . Le site de liaison du GABA (bille orange) se situe à l'interface des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  tandis que celui des neurostéroïdes (bille verte) se situent au niveau du domaine transmembranaire de la sous-unité  $\alpha$ .

### II.3.1.1- Interaction des neurostéroïdes avec le récepteur GABAA

Afin de mettre en évidence un éventuel effet modulateur des neurostéroïdes sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, l'activité de ce dernier en réponse à une application d'agoniste a été enregistré sur des tranches d'encéphale en présence ou non d'un progestatif de la famille des pregnanes (la 5-pregnane-3-ol-11,20-dione) (Harrison and Simmonds, 1984). Il est apparu qu'en présence du progestatif l'effet de GABA sur GABA<sub>A</sub> était renforcé suggérant que les neurostéroïdes pouvaient être de puissants modulateurs du récepteur GABA<sub>A</sub> (Lambert et al., 2001, Belelli et al., 2002). De fait il a été décrit dans la littérature des modulateurs positifs comme la pregnenolone (3-hydroxy-5-pregnane-20-one), ou l'allopregnenolone (3-hydroxy-5-pregnane-20-one), ou l'allopregnenolone (3-hydroxy-5-pregnane-20-one), ces derniers ne modifieraient pas la conductance du canal, mais prolongeaient son temps d'ouverture (Callachan et al., 1987, Cottrell et al., 1987). Des modulateurs négatifs ont également été décrits comme la pregnenolone sulfate ou encore la déhydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) (Figure 29) (Majewska and Schwartz, 1987, Majewska et al., 1990, Majewska, 1992, Ren and Greer, 2006) qui semblent quant à eux agir en diminuant la fréquence d'ouverture du canal sans diminuer son temps d'ouverture (Park-Chung et al., 1999).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont exprimés dans tout le SNC alors que l'expression des enzymes stéroïdogéniques est région spécifique (Mellon and Griffin, 2002). L'interaction neurostéroïde/récepteur GABA<sub>A</sub> semble donc hautement sélective et suggère que les neurostéroïdes peuvent interagir de façon spécifique sur des pools distincts de récepteurs GABA<sub>A</sub> (Belelli and Lambert, 2005).

### II.3.1.2- Modulateurs positifs de l'action de GABA sur GABA<sub>A</sub>

En 1999 Park-Chung et collaborateurs ont entrepris d'examiner le lien entre la structure de stéroïdes endogènes et synthétiques et leur fonction sur GABA<sub>A</sub>. Au cours de cette étude il est apparu que l'allopregnanolone, un des modulateurs les plus efficaces du récepteur GABA<sub>A</sub> devait ses propriétés de modulateur positif du moins en partie au fait de posséder une simple liaison en C5, un groupement OH en position  $\alpha$  du C3 ainsi qu'un groupement acétyl en C17 (Park-Chung et al., 1999). De fait les stéroïdes comme la progestérone, l'androstenedione et la testostérone, qui possèdent un groupement cétone au

niveau du C3 et une double liaison en C4 conservent une activité de modulateur positif même si moins efficace que l'allopregnanolone (Park-Chung et al., 1999). Ensuite l'isomère  $\beta$  de l'allopregnanolone est inactif suggérant que la stœchiométrie du C3 est essentielle (Majewska et al., 1986, Wu et al., 1991). Enfin le remplacement du groupement acétyl en C17 de l'allopregnanolone avec un groupe hydroxyl (5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) entraine une perte de l'activité potentialisatrice. Ces observations ont permis en se basant sur la structure des stéroïdes de pouvoir prédire l'effet potentiel de ces derniers sur le récepteur GABA<sub>A</sub> (Park-Chung et al., 1999).



# Figure 28 : Effet de l'alloprégnanolone sur la fréquence respiratoire de préparations *ex vivo* de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés.

Tracés électrophysiologiques représentant l'activité intégrée de la racine cervicale ventrale C4 lors d'une administration d'alloprégnanolone en absence et en présence de bicuculline (Bic). *D'après Ren et Greer 2006* 

### II.3.1.3- Modulateurs négatifs de l'action de GABA sur GABA<sub>A</sub>

En 1987 les expériences réalisées par Majewska et collaborateurs chez le rat ont montré que la pregnenolone sulfate agissait comme un modulateur négatif du récepteur GABA<sub>A</sub> (Majewska and Schwartz, 1987). Cette même équipe a ensuite mis en évidence qu'une application de DHEAS bloquait de façon réversible l'effet de GABA sur GABA<sub>A</sub> (Majewska et al., 1990). Au cours de l'étude de Park-Chung il est apparu que l'ajout d'un groupement sulfate d'ester au niveau du C3 inverse l'effet modulateur du stéroïde (par exemple l'allopregnanolone, la pregnenolone et à l'androsterone) de positif à négatif. (Park-Chung et al., 1999). Pour autant les expériences ont révélé qu'en substituant le groupement sulfate par un autre groupement lui aussi chargé négativement comme l'hémisuccinate, l'effet inhibiteur du stéroïde était conservé, suggérant que plus que le groupement sulfate c'est la charge négative en position C3 qui confère la propriété de modulateur négatif (Park-Chung et al., 1999).


# Figure 29 : Effet de déhydroepiandrosterone sulfate sur la fréquence respiratoire de préparations *ex vivo* de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveaunés.

Tracés électrophysiologiques représentant l'activité intégrée de la racine cervicale ventrale C4 lors d'une administration muscimol (Mus) en absence et en présence de déhydroepiandrosterone sulfate (DHEAS). La barre d'échelle équivaut à 30 sec. *D'après Ren et Greer 2006* 

#### II.3.1.4- Site de liaison des neurostéroïdes

Dans l'étude de Park-Chung l'activité du récepteur GABA<sub>A</sub> a été enregistrée sur l'ovocyte de xénope en présence d'un mélange de GABA, de DHEAS (un modulateur négatif de faible affinité) et de l'allopregnanolone (modulateur positif de forte affinité). Les auteurs, après avoir évalué séparément l'effet de chacune de ces molécules sur GABA<sub>A</sub>, cherchaient ainsi à déterminer si les sites de fixation des modulateurs allostériques positifs et négatifs étaient communs. Il est ressorti de ces expériences que l'effet inhibiteur de la DHEAS ne peut pas être surmonté par l'ajout d'allopregnanolone, faisant ainsi valoir l'hypothèse que les effets des modulateurs positifs et négatifs sont médiés par des sites de liaison distincts (Park-Chung et al., 1999). Depuis il a été montré qu'à la différence du site de liaison du ligand endogène localisé à l'interface des sous-unités  $\alpha/\beta$  (Sieghart et al., 2012), les sites de fixation des neurostéroïdes leur permettant de moduler l'effet de GABA sur GABA<sub>A</sub> sont localisés au niveau du domaine transmembranaire hautement conservé de la sous-unité  $\alpha$  (Figure 27) (Hosie et al., 2006).

#### II.3.1.5- Influence de la phosphorylation sur l'effet de GABA sur GABA<sub>A</sub>

Il est maintenant établi que l'état de phosphorylation du récepteur GABA<sub>A</sub> tient lieu de mécanisme de régulation supplémentaire (Lambert et al., 2001). Les effets de la phosphorylation sur la fonction du récepteur GABA<sub>A</sub> sont complexes et dépendent de l'isoforme, de la sous-unité et des résidus d'acides-aminés phosphorylés, ainsi que des kinases ou des phosphatases mises en jeu (Belelli and Lambert, 2005, Song and Messing, 2005). Bien que le mécanisme moléculaire ne soit pas élucidé, il est apparu dans certains neurones, que l'impact des stéroïdes sur l'activité du récepteur GABA<sub>A</sub> peut être régulé par l'activité des kinases et phosphatases résidentes, suggérant que la sensibilité aux neurostéroïdes semble au moins partiellement dépendre de l'état de phosphorylation du récepteur GABA<sub>A</sub>. Par exemple, au sein des neurones à ocytocine magnocellulaires de l'hypothalamus la phosphorylation du récepteur semble supprimer la modulation de l'alloprégnanolone (Brussaard et al., 1997, Koksma et al., 2003), alors que dans l'hippocampe, la phosphorylation semble favoriser l'interaction entre le récepteur GABA<sub>A</sub> et la pregnénolone (Harney et al., 2003). Il semble que l'isoforme PKCε soit impliquée dans la modulation du récepteur GABA<sub>A</sub> par certains neurostéroïdes. En effet, des souris PKCε<sup>-/-</sup> possèdent une meilleure sensibilité à

certains neurostéroïdes comme l'alloprégnanolone (Hodge et al., 2002, Song and Messing, 2005).

#### II.3.2- Récepteurs NMDA

Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont les principaux médiateurs de la transmission synaptique excitatrice dans l'encéphale (Traynelis et al., 2010). Trois classes de récepteurs ionotropiques au glutamate ont été définies en fonction de la pharmacologie de leurs sites de liaison au glutamate : le récepteur AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate), le récepteur kainate et le récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Lorsque le glutamate est libéré dans la fente synaptique, il va se lier à ces récepteurs ionotropiques, ce qui entraîne la modulation de l'activité du neurone post-synaptique. Les récepteurs NMDA jouent un rôle essentiel dans la plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme, l'apprentissage, la mémoire et les fonctions cognitives en général (Hackos and Hanson, 2016).

Les récepteurs NMDA sont de grands canaux ioniques organisés en tétramère contenant généralement deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités de GluN2, dans certains cas, une sous-unité GluN3 peut également être incorporée (Figure 30) (Mayer, 2016). Chaque sous-unité est constituée de 4 domaines membranaires, un domaine N-terminal extracellulaire qui contient les sites de liaison aux ligands, et un domaine C-terminal intracellulaire. La sous-unité GluN2 contient le site de liaison au glutamate, tandis que GluN1 et GluN3 contiennent le site de liaison à la glycine le co-agoniste. Ces sous-unités s'organisent pour former un canal ionique perméable aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Quatre types de sous-unités GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D) ont été décrits et chacune a un profil distinct d'expression spatiale et temporelle dans le SNC (Hackos and Hanson, 2016). GluN2B et GluN2D sont les sous-unités prédominantes dans l'encéphale de rat prénatale tandis que les sousunités GluN2A et GluN2C commencent généralement à être exprimées après la naissance au cours du développement (Cull-Candy et al., 2001). Ainsi chez l'adulte, GluN2B est remplacé par l'expression de GluN2C dans le cervelet tandis que l'expression de GluN2A augmente lentement dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. L'expression de GluN2D diminue au cours du développement précoce, mais conserve un certain degré d'expression dans les régions sous-corticales et notamment au niveau du tronc cérébral chez l'adulte (Hackos and Hanson, 2016). En plus des schémas d'expression spatiale et temporelle distinctes, les sousunités GluN2 présentent également des différences fonctionnelles importantes, en particulier dans la vitesse de désactivation après le retrait de glutamate (Hackos and Hanson, 2016).

Ces dernières années, un nombre croissant de modulateurs allostériques du récepteur NMDA ont été découverts et caractérisés. Parmi ces modulateurs les stéroïdes endogènes et synthétiques peuvent avoir des impacts de différentes natures sur la fonction du canal (Wu et al., 1991, Park-Chung et al., 1994, Weaver et al., 2000, Stastna et al., 2009).



# Figure 30 : Récepteur ionotropique NMDA.

Représentation schématique du récepteur NMDA. Le récepteur NMDA est constitué de 4 sous-unités formant un canal perméable aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Chaque sous-unité est composée d'une extrémité C-terminal intracellulaire, quatre domaines de membrane (M1-M4) et une région extracellulaire, domaine de liaison du glutamate et de la glycine. D'après Korinek et al. 2011

#### II.3.2.1- Modulation positive du récepteur NMDA

En principe, il existe deux types d'effets de modulations positives qui peuvent être détectées avec les moyens actuels 1/ les modulateurs peuvent agir en augmentant l'activité maximale ou l'efficacité d'un récepteur en augmentant par exemple sa probabilité ou le temps d'ouverture et 2/ ils peuvent agir en déplaçant l'EC50 de l'agoniste à des valeurs inférieures.

La pregnenolone sulfate (PS), est le neurostéroïde potentialisateur des récepteurs NMDA le plus largement étudié (Wu et al., 1991). Différents mécanismes expliquant l'action de la PS au niveau des récepteurs NMDA ont été proposés, la PS pourrait augmenter l'efficacité et/ou l'activité du glutamate et de la glycine sur leurs sites de liaison (Bowlby, 1993, Malayev et al., 2002). En effet en enregistrant l'activité du récepteur NMDA en présence de PS et du glutamate il a été montré que la liaison de la PS sur le récepteur induit une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal ionique (Horak et al., 2004). Lorsque le stéroïde est appliqué avant le glutamate, la PS induit son effet potentialisateur au maximum. Cet effet est légèrement diminué quand le stéroïde est co-appliqué avec le glutamate et fortement diminué lorsque le glutamate est déjà lié au site de liaison (Horak et al., 2004, Horak et al., 2006). Une autre étude attribue cet effet potentialisateur de la PS au fait que cette dernière pourrait à la fois maintenir l'agoniste sur son site de liaison et diminuer la désensibilisation du récepteur (Ceccon et al., 2001). A noter que ces résultats différents peuvent être attribuables au fait que le degré de modulation de PS sur le récepteur NMDA est influencé par la composition en sous-unité de ce dernier. Une étude a montré que la PS potentialise l'activité des récepteurs composés des sous-unités GluN2A et GluN2B et inhibe ceux qui contiennent les sous-unités GluN2C et GluN2D (Malayev et al., 2002). Par ailleurs, les résultats qui ont été obtenus sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur NMDA ont montré que la potentialisation induite par la PS est réduite en cas d'inhibition de la protéine kinase A. L'ajout d'un activateur de cette dernière rétabli l'effet de la PS. Les résultats de cette étude suggèrent que l'effet de la PS sur les récepteur NMDA est contrôlé par des mécanismes cellulaires qui sont médiés par des voies de déphosphorylation/phosphorylation (Petrovic et al., 2009).

En dehors de la PS, une autre classe de neurostéroïdes a été décrite comme modulant positivement les récepteurs NMDA : les dérivés oxystérol du cholestérol. Le oxystérol 24(S)-

hydroxycholestérol est le métabolite du cholestérol le plus abondant dans l'encéphale. L'oxystérol sus-cité augmente fortement le courant des récepteurs à des concentrations saturantes de glutamate et de glycine (Linsenbardt et al., 2014). Cette oxystérol, ainsi que ses dérivés synthétiques ont été décrits comme favorisant l'activité des récepteurs NMDA indépendamment des sous-unités qui le compose (Paul et al., 2013).

#### II.3.2.2- Effet modérateur sur le récepteur NMDA

En enregistrant l'activité du récepteur NMDA sur des cultures de neurones de moelle épinière, des auteurs ont montré qu'une application de pregnanolone sulfate un analogue de la PS, entrainait une diminution du courant passant à travers le récepteur. Le mécanisme qui sous-tend cet effet semble être une modulation allostérique du récepteur dans la mesure où, comme le démontrent les auteurs dans cette étude son mécanisme d'action ne fait pas appel à un processus d'inhibition compétitive avec un agoniste ni à un blocage du canal ionique (Park-Chung et al., 1994). Une autre étude de la même équipe a ensuite montré que le site de liaison de la prégnanolone sulfate est localisé dans la partie N-terminale du récepteur NMDA et que ce site se distingue des sites de liaison pour la glycine, les polyamines (modulateurs positifs du récepteur), ou encore le MK-801 (antagoniste du récepteur) (Park-Chung et al., 1997). En 2005 des expériences réalisées sur des cultures cellulaires de HEK293 et de neurones d'hippocampe ont testé l'effet d'une co-application de prégnanolone sulfate et de glutamate (Petrovic et al., 2005). Cette co-application entraine une inhibition quasi complète de la réponse du récepteur NMDA au glutamate. A noter qu'en absence de l'agoniste le neurostéroïde n'a aucun effet sur le récepteur. Dans cet article l'hypothèse des auteurs est que la fixation de la prégnanolone sulfate diminue le processus de changement de conformation du récepteur NMDA normalement induit par la fixation de l'agoniste et participe à diminuer la fréquence d'ouverture du récepteur. De plus les auteurs ont montré que l'effet de la pregnanolone sulfate sur le récepteur NMDA dépendait de la composition en sous-unités du récepteur. Son affinité est maximale pour les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D et plus faible voir quasiment inexistante quand le récepteur contient respectivement les sous-unités GluN2A et GluN2B et GluN1A et GluN1B (Petrovic et al., 2005).

## II.3.2.3- Relation entre la structure du stéroïde et son effet sur le récepteur NMDA

Afin de mesurer l'impact de la structure du stéroïde sur son effet sur le récepteur NMDA, de nombreux stéroïdes ont été testés (Park-Chung et al., 1994, Weaver et al., 2000, Stastna et al., 2009). Il ressort de ces études que ce qui confère aux stéroïdes la propriété de moduler la fonction du récepteur NMDA semble être lié à la présence d'un groupe chargé sur le carbone C3 du noyau stérane (Park-Chung et al., 1997). Sur la base de la configuration spatiale des atomes de carbone chiraux en C3 et en C5, la forme moléculaire du stéroïde peut être « pliée », forme caractéristique des stéroïdes inhibiteurs, ou « plane » typique des stéroïdes potentialisateurs des récepteurs NMDA (Weaver et al., 2000). Ainsi la pregnanolone sulfate et la PS, qui ne diffère que par la présence d'une double liaison et par la configuration du carbone C3, vont avoir des effets opposés sur le récepteur NMDA.

#### II.3.2.4- Localisation des récepteurs NMDA au sein du SNC

Au sein du SNC, les récepteurs NMDA sont principalement localisés au niveau de la membrane postsynaptique mais peuvent être retrouvés au niveau présynaptique, extrajonctionnel et au niveau des cellules gliales (Blanke and VanDongen, 2009). Ils sont exprimés dans différentes structures respiratoires du tronc cérébral : au niveau du NTS ventrolatéral (Liu and Wong-Riley, 2010) et médian (Guthmann and Herbert, 1999), du noyau ambigu (Guthmann and Herbert, 1999, Liu and Wong-Riley, 2010), du noyau de l'hypoglosse (Liu and Wong-Riley, 2010), des noyaux des RPa et ROb (Haghparast et al., 2007, Sluka et al., 2012) et au niveau du préBotz (dans 50 à 80% des neurones) (Liu and Wong-Riley, 2010). Au niveau supra-bulbaire, ils sont exprimés dans le PB, le KF (Guthmann and Herbert, 1999), l'aire hypothalamique latérale (Landeira-Fernandez, 2015) et l'hypothalamus ventromédian (Resch et al., 2014).

## III- Les systèmes progestéronergiques et la ventilation

#### III.1- Effet sur la ventilation de base

III.1.1- Effet des systèmes progestéronergiques chez l'Homme

#### III.1.1.1- Effet de la progestérone

L'une des premières études à suggérer que les hormones stéroïdiennes pourraient avoir un impact facilitateur sur la ventilation est un rapport de Hasselbach au début du XX<sup>éme</sup> qui note une diminution de la PCO<sub>2</sub> alvéolaire au cours de la grossesse, période caractérisée par la présence de forte concentration plasmatique en progestérone (Hasselbach, 1912a). Un autre rapport montrera ensuite que cette diminution pendant la grossesse se traduisait également par une baisse de la PaCO<sub>2</sub> (Hasselbach, 1915a). Une étude ultérieure a observé que la ventilation fluctuait cycliquement selon les phases du cycle menstruel, et que ce phénomène disparaissait avec la ménopause (Griffith and Carmer, 1929). Ces fluctuations à savoir, une hyperventilation concomitante à une diminution de la PaCO<sub>2</sub>, ont par la suite été corrélées aux fluctuations de la concentration plasmatique en progestérone : élevée dans la phase lutéale et faible dans la phase folliculaire, suggérant une composante hormonale dans la régulation de la ventilation (Dempsey, 1986, Bayliss and Millhorn, 1992, Tatsumi, 1995). Ces observations ont par la suite été étayées par d'autre études chez l'Homme qui ont établi un lien entre les concentrations plasmatiques élevées en progestérone et la ventilation au cours de la grossesse (Figure 32) (Jensen et al., 2005, Jensen et al., 2007, Jensen et al., 2008), ainsi qu'au cours de la phase lutéale du cycle menstruel (da Silva et al., 2006, Slatkovska et al., 2006).

#### III.1.1.2- Effet des progestatifs

Des effets du même ordre ont été observés en cas d'exposition aux progestatifs chez l'homme et la femme. Une administration quotidienne de medroxypogestérone acétate entraine chez l'homme une augmentation du volume courant (Zwillich et al., 1978). Un résultat équivalent a été obtenu par une autre équipe qui a observé une diminution de la PaCO<sub>2</sub> concomitante avec une alcalinisation du pH sanguin et du LCR chez 5 hommes qui recevaient quotidiennement de la medroxypogestérone acétate par voie orale (Skatrud et al., 1978). Chez la femme post-ménopausée la prise de ce même progestatif entraine une augmentation significative du volume courant équivalente à ce qui est observé chez la femme enceinte (Regensteiner et al., 1989). Par ailleurs une récente étude du laboratoire dans lequel ce travail doctoral a été effectué (Joubert et al., 2016) a corrélé une administration de désogestrel (un progestatif de la famille des gonanes) à une augmentation de la fréquence respiratoire de patientes CCHS conduisant à une diminution de leur PaCO<sub>2</sub>.

# *III.1.1.3- Lien entre systèmes progesteronergiques et les pathologies avec atteintes respiratoires*

Sur un autre versant, il a été montré que la progestérone et les progestatifs pourraient constituer un traitement dans le cadre de pathologies avec atteintes respiratoires. Keefe et collaborateurs ont montré en 1999 une diminution de 50% de l'indice de détresse respiratoire chez des femmes ménopausées souffrant d'apnées du sommeil après 1 mois de traitement à la médroxyprogestérone acétate et aux œstrogènes (Keefe et al., 1999). En 2003, une autre équipe montrait que les femmes ménopausées souffrant d'apnées du sommeil qui recevaient un traitement hormonal (œstrogène et progestérone) présentaient une diminution significative du nombre d'épisodes apnéiques (Shahar et al., 2003). La même année il a été montré que les femmes présentant un syndrome d'apnée du sommeil sévère étaient celles qui présentaient les taux de progestérone et d'œstrogène plasmatiques les plus faibles (Netzer et al., 2003). Dans le cadre d'une autre pathologie la broncho-pneumopathie chronique obstructive, une administration de médroxyprogestérone acétate améliore la respiration nocturne chez les femmes ménopausées (Saaresranta et al., 2005).

## III.1.2- Effet des systèmes progestéronergiques sur des modèles animaux

## III.1.2.1- Les effets centraux

## Effet de la progestérone

L'effet de la progestérone et des progestatifs sur la respiration a été étudié sur des modèles animaux, en se focalisant principalement sur son action au sein du SNC. Au vu de la distribution des récepteurs capables de médier les effets de ces molécules sur la respiration, ces dernières pourraient agir *via* un effet direct sur les motoneurones respiratoires ou sur les neurones voisins au sein des noyaux moteurs respiratoires ; sur les neurones pré-moteurs ; sur les structures génératrice du rythme respiratoire ; ou encore sur les structures qui modulent le rythme respiratoire. Les mécanismes d'actions par lesquels la progestérone influence la ventilation restent aujourd'hui encore mal connus. En étudiant l'influence de la grossesse sur la respiration de vaches Jersey non anesthésiées des auteurs ont montré que les résultats étaient similaires à ceux obtenus chez l'Homme : une ventilation élevée et une

diminution de la PCO<sub>2</sub> artérielle corrélée avec une concentration en progestérone plasmatique élevée (Keith et al., 1982). En 1987 Bayliss et collaborateurs ont testé chez le chat anesthésié et chémodenervé l'effet d'une administration intraveineuse de doses croissantes de progestérone sur la respiration en enregistrant l'activité du nerf phrénique (Bayliss et al., 1987). Il est apparu que la progestérone entraine une augmentation dose-dépendante de la fréquence et de l'amplitude des décharges du nerf phrénique (Figure 31). Cet effet est reversé par un pré-traitement avec un antagoniste des récepteurs nucléaire à la progestérone. De plus les auteurs en testant l'effet sur d'une injection stéréotaxique de progestérone dans le NTS ont montré que cela induisait une augmentation de l'activité du nerf phrénique (Bayliss et al., 1987). Ces résultats suggèrent que la progestérone en agissant par l'intermédiaire de mécanismes centraux faisant potentiellement intervenir le NTS, facilite la CCR. Quelques années plus tard la même équipe a publié une étude montrant, chez des chattes ovariectomissées et pré-traitées à l'oestradiol, que l'effet facilitateur de l'administration de progestérone sur l'activité du nerf phrénique n'était pas modifié quand l'animal était décortiqué et était fortement diminué en cas d'ablation des structures rostrales au tronc cérébral (Bayliss et al., 1990). Au vu de ces résultats et des données de la littérature les auteurs posent l'hypothèse que les structures diencéphaliques pourraient médier les effets facilitateurs de ces molécules sur la CCR. De plus en montrant qu'une partie de ces effets était diminuée en cas de pré-traitement avec de l'anisomycin et de l'actinomycine-D, des bloquants de la synthèse protéique et des ARNm respectivement, ces résultats suggèrent une fois encore l'implication des récepteurs nucléaires à la progestérone (Bayliss et al., 1990).



# Figure 31 : Effet d'une administration en intra-veineuse de doses croissantes de progestérone chez le chat adulte.

L'effet de la progestérone sur l'activité intégrée du nerf phrénique a été déterminé par l'administration en intraveineuse de dose croissante de progestérone. La PCO<sub>2</sub> est maintenue à 32 Pa. *D'après Bayliss et al. 1987* 

#### Effet des progestatifs

Chez des chats femelles anesthésiées et pré-traitées avec de l'œstradiol, une administration aigue de medroxyprogestérone acétate induit une diminution de la PETCO<sub>2</sub> (Wagenaar et al., 2000). Chez le rat mâle une étude a montré, qu'une administration chronique de TZP4238, un progestatif de la famille des pregnanes, combiné avec de l'œstrogène induisait une hyperventilation concomitante à une diminution de la PaCO<sub>2</sub>, alors que l'administration de TZP4238 ou d'œstradiol seul n'a pas d'effet sur la ventilation (Tatsumi

et al., 1991). Enfin dans la récente étude du laboratoire (Joubert et al., 2016) il a été montré chez la souris que le métabolite du désogestrel, l'étonogestrel, induisait une augmentation de la fréquence respiratoire sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière ainsi qu'*in vivo*. Les investigations d'histologie fonctionnelle et pharmacologiques révèlent que ces effets seraient médiés par les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé RPa et ROb et notamment en modulant les effets qu'exercent les récepteurs GABA<sub>A</sub> et NMDA sur la fréquence respiratoire.

L'ensemble de ces données suggère que la progestérone et certains progestatifs de synthèse influencent la ventilation de base chez les mâles et les femelles en agissant, notamment au niveau central, et que cet effet peut être potentialisé en combinaison avec des œstrogènes (Behan and Wenninger, 2008).

#### III.1.2.2- Les effets périphériques

Les investigations menées concernant l'effet de la progestérone sur la respiration médié par les corps carotidiens ont révélé que ces derniers semblent être sensibles à la progestérone mais que l'impact de cette sensibilité sur la ventilation est très modéré. En 1989, Hannhart et collaborateurs ont rapporté chez le chat que l'activité du nerf carotidien augmentait après une élévation soutenue de progestérone et d'œstrogène, suggérant que l'activité des corps carotidien pouvait être modulée par ces deux stéroïdes (Hannhart et al., 1989). Plus récemment une équipe a testé avec ou sans mifeprestone (un antagoniste des RP) la réponse à l'hypoxie : des corps carotidiens enregistrés in vitro et de l'animal entier par pléthysmographie. Cette étude a montré que la réponse à l'hypoxie des corps carotidien est altérée en présence de l'antagoniste, pour autant ces effets ne semble pas se traduire in vivo dans la mesure où la réponse respiratoire est équivalente avec ou sans traitement (Joseph et al., 2012). Bien que apparemment contradictoires, ces résultats sont en ligne avec des études antérieures montrant que l'altération de l'activité des chémorécepteurs périphériques ne parvient pas dans certains cas à entraîner une modification correspondante de la réponse ventilatoire hypoxique (Bavis et al., 2011, Joseph et al., 2012, Joseph et al., 2013). Ces observations mises en lien avec la présence au niveau des cellules chémosensibles du corps carotidien d'une enzyme impliquée dans la synthèse des stéroïdes (P450scc) (Joseph et al., 2006), souligne l'intérêt de mieux comprendre l'influence des sources extra-ovariennes de progestérone sur la fonction de chémorécepteurs périphériques.

III.2- Effet de la progestérone et des progestatifs sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie

#### III.2.1- Effet des systèmes progestéronergiques chez l'Homme

En 1985, une étude a montré un abaissement de la valeur seuil de  $PaCO_2$  (c'est à dire à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation) chez la femme par rapport à l'homme (Macnutt et al., 2012). Dans l'étude de Jensen mentionnée plus haut les auteurs ont évalué la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  chez les femmes enceintes (Figure 32)(Jensen et al., 2007). Il est apparu que ces dernières présentaient à la fois un abaissement de la valeur seuil de  $PaCO_2$  et une augmentation de la sensibilité du chémoréflexe ventilatoire, que traduit le coefficient directeur de la droite représentant la ventilation en fonction de la  $PaCO_2$ . En comparant la réponse au  $CO_2/H^+$  chez des femmes pré et post-ménopausée, une étude corrèle la meilleure réponse des femmes pré-ménopausées à leur concentration plasmatique en hormones sexuelles féminines (Preston et al., 2009). Par ailleurs il a été montré que la prise de medroxyprogestérone acétate induisait une meilleure réponse respiratoire à l'hypercapnie chez l'Homme (Skatrud et al., 1978, Saaresranta et al., 2005).

Un autre argument en faveur du fait que la progestérone ou les progestatifs pourraient constituer une cible thérapeutique est cette observation publiée par l'UMR\_S1158, laboratoire dans lequel ce travail de thèse a été réalisé, localisé au sein de la Pitié-Salpêtrière (lié au centre de référence national des CCHS adultes). En effet chez deux patientes CCHS il a été observé une récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>, concomitante à la prise d'un progestatif : le désogestrel. La première patiente CCHS âgée de 19 ans présentait une mutation PARM 20/25. Lors de son intégration au centre de référence elle ne présentait



# Figure 32 : Représentation de la réponse respiratoire au $CO_2/H^+$ chez une femme enceinte.

Représentation de la ventilation minute ( $V_E$ ) en fonction de la  $P_{ET}CO_2$  chez la même femme en fin de gestation (35 semaines aménorrhées) et après la gestation (18 semaines *post-partum*). On observe pendant la gestation une augmentation de la Subthreshold  $V_E$ : ventilation minute de base, une diminution du VRTCO<sub>2</sub> (valeur seuil de PaCO<sub>2</sub> à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation), ainsi qu'une augmentation de la sensibilité du chémoréflexe ventilatoire. *D'après Jensen et al., 2007* 

aucune réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$ . 3 ans plus tard, de manière tout à fait fortuite lors d'un examen d'exploration fonctionnelle, une réponse ventilatoire à l'hypercapnie a été observée (Figure 33). Le questionnement de la patiente a conduit à relier cette récupération à la consommation d'un puissant progestatif de synthèse, le désogestrel (Straus et al., 2010). Ce phénomène de récupération de la chémosensibilité a été observé chez une seconde patiente, porteuse d'une mutation PARM 20/26, trois semaines après qu'elle ait été placée sous désogestrel. Cette deuxième patiente est totalement dépendante à la ventilation artificielle pendant le sommeil et contrairement à la première patiente, présente également des hypoventilations pendant l'éveil (Straus et al., 2010). Suite à ces observations, une étude clinique<sup>2</sup> a été mise en place au sein de l'UMR S11583 dans le but de tester l'effet du progestatif sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie de patientes CCHS suivies au centre de référence adulte. Les résultats préliminaires sont très hétérogènes *i.e.* certaines patientes présentent une récupération de la chémosensibilité tandis que d'autres semblent insensibles au progestatif (données préliminaires, non publiées). De plus, le cas d'une patiente CCHS placée délibérément sous désogestrel ne présentant pas de récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> a été relaté (Li D, 2013). Ces résultats contradictoires avec les données observées chez les deux patientes présentées précédemment suggèrent un effet idiosyncrasique et/ou un mécanisme d'action complexe de la molécule.



# Figure 33 : Réponse ventilatoire d'une patiente CCHS pendant une expérience de réinhalation de $CO_2$ avant et pendant la prise de désogestrel.

Les graphiques représentent la ventilation minute de la première patiente en réponse à une augmentation de la  $PCO_2$  avant l'exposition au désogestrel (à gauche) et 18 mois après le début du traitement (à droite). *D'après Straus et al. 2010* 

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> L'essai clinique « RespirOndine » (NCT01243697) a été mis en place en 2010 par le Pr Christian Straus, directeur adjoint de l'UMR\_S 1158, chef du service central d'explorations fonctionnelles respiratoires à l'hôpital de La Pitié Salpêtrière et responsable de la branche adulte du centre de référence du syndrome d'Ondine

#### III.2.2- Effet des systèmes progestéronergiques sur des modèles animaux

Dans l'étude de Bayliss et collaborateurs relatée plus haut, les auteurs ont évalué l'effet d'une administration de progestérone sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez le chat pré-traité à l'oestradiol en cas ou non d'une décortication ou d'une ablation des structures rostrales au tronc cérébral. Il est apparu que l'administration de progestérone augmente la réponse respiratoire à l'hypercapnie et que ce phénomène serait en grande partie médié par la présence du diencéphale (Bayliss et al., 1990). Une autre étude a testé la réponse à l'hypercapnie sur des souris femelles adultes KO ou non pour le gène RP implantés avec une pompe osmotique délivrant de la progestérone (Marcouiller et al., 2014). Les animaux ont été placés dans une chambre de pléthysmographie pour enregistrer leur ventilation. Dans la mesure où l'effet facilitateur de la progestérone sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie n'est plus présent chez les souris KO, les résultats obtenus suggèrent que la progestérone facilite la réponse respiratoire à l'hypercapnie et que cet effet est médié au moins en partie par les RP.

Ainsi un faisceau d'arguments c'est constitué autour de l'hypothèse selon laquelle la progestérone et les progestatifs exerceraient une influence directe et facilitatrice sur la ventilation notamment sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie et que ces effets potentiellement médiés par des mécanismes faisant intervenir le diencéphale, constitue une piste de recherche pertinente pour le traitement des syndromes d'hypoventilation alvéolaire central.

MATERIELS ET METHODES

Le travail présenté ici s'est attaché à observer et à caractériser dans quelles mesures, les interactions entre les systèmes progestéronergiques et les mécanismes d'adaptation de la commande respiratoire à l'hypercapnie pourraient constituer une perspective thérapeutique pour le traitement des CHS. De par les données dont nous disposions les travaux ont été focalisés sur l'étude des effets qui s'opéraient au niveau du système nerveux central (SNC). Pour cela nous avons entrepris d'apprécier, sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé, l'effet de l'étonogestrel (ETO) le principal métabolite actif du désogestrel, un puissant progestatif de synthèse. L'origine des effets centraux observés a alors été décortiquée et caractérisée à l'échelle cellulaire avec la mise en œuvre d'approches d'histologie fonctionnelle.

La première partie traitera des expériences réalisées sur le modèle de préparation *ex vivo* de SNC isolé avant d'ensuite aborder l'histologie fonctionnelle. Il sera détaillé pour chacune des techniques, la procédure expérimentale, les protocoles mis en place, l'analyse des résultats et les tests statistiques employés.

## I- Les préparations ex vivo de système nerveux central isolés

# I.1- Enregistrements électrophysiologiques sur la commande centrale respiratoire

Dans le cadre de la présente thèse, les préparations *ex vivo* ont été soumises à différentes approches et protocoles expérimentaux afin d'apprécier l'effet de ETO, sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique, un modèle d'hypercapnie (Harada et al., 1985, Gestreau et al., 2010), et de décortiquer les voies neuronales mises en jeu.

I.1.1- Obtention et enregistrements des préparations *ex vivo* de système nerveux central isolé

## I.1.1.1- Procédure expérimentale

Après anesthésie au froid (Danneman and Mandrell, 1997), la première étape d'obtention des préparations *ex vivo* de SNC isolé de rat nouveau-né, consiste en une section rostrale au bregma (point de jonction de la suture coronale et de la suture sagittale des os du crâne) visible au travers la peau de l'animal et en une section caudale sous le diaphragme. L'ensemble ainsi isolé est fixé en decubitus ventral dans une cuve de dissection, dont le fond recouvert d'une couche de Sylgard<sup>®</sup> (WPI, France, un élastomère permettant la bonne dioxygénation des tissus qui se trouvent à son contact direct grâce à ces propriétés de diffusion des gaz) et contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa : 129mM NaCl, 3,35mM KCl, 1,15mM MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 0,58mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 30mM glucose, 1,26mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 21mM NaHCO<sub>3</sub>), saturé en O<sub>2</sub> et ajusté à pH 7,4 par bullage avec 95%O<sub>2</sub> et 5%CO<sub>2</sub> (LCRa-normopH) à 4±1°C. La peau est incisée le long de l'axe médian. Ensuite, une section des os du crâne et des vertèbres cervicales permet de découvrir les parties restantes de l'encéphale (le diencéphale et quelques structures télencéphaliques l'entourant, le mésencéphale, le pont, le

bulbe rachidien) et la moelle épinière jusqu'aux segments cervicaux C7-C8. La section soigneuse des racines cervicales dorsales mais surtout ventrales de la moelle épinière permet à cette dernière d'être soulevée délicatement avec une attention toute particulière pour les racines du segment C4 ; la section des nerfs crâniens V, VI, IX, X, et XII permet ensuite de libérer le tronc cérébral (Bodineau et al., 2003, Voituron et al., 2005, Voituron et al., 2011). Le SNC ainsi isolé (Figure 34) est alors transféré dans une cuve d'enregistrement (10 mL), fixé sur le Sylgard<sup>®</sup> à l'aide de minuties et superfusé en continu (10 mL min<sup>-1</sup>) avec du LCRa-normopH maintenu à 26±1°C.



# Figure 34 : Schéma représentant une préparation *ex vivo* DBS de rat nouveau-né dans une cuve d'enregistrement ainsi que l'activité rythmique enregistrée sur 1 min au niveau de C4.

Après la procédure chirurgicale, des préparations *ex vivo* ont été placées dans une cuve d'enregistrement et superfusées soit avec du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) correspondant à la condition de nomopH (pH 7,4) ou à la condition d'acidose métabolique (pH 7,23), les deux sont saturés avec  $O_2$  et ajustés au pH en faisant buller avec 95% d' $O_2$  et 5% de  $CO_2$ . Des agents pharmacologiques peuvent être ajoutés au LCR selon les conditions expérimentales. La préparation *ex vivo* illustrée contient les régions suprabulbaires jusqu'au diencéphale. Les lignes pointillées montrent les niveaux de transections: l'extrémité rostrale pour les préparations DBS (1), BS (2), PMS (3) et pour les préparations MS (4) et l'extrémité caudale pour toutes les préparations (5). À droite, un enregistrement électrophysiologique typique de l'activité respiratoire au niveau du la racine cervicale ventral C4 et son intégration sont présentés. C4 : activité inspiratoire de C4 ;  $\int C4$  : activité intégrée de C4.

4 types de préparations *ex vivo* avec différents niveaux d'extension rostrale ont été utilisés au cours du présent travail de thèse. Dans tous les cas, la section caudale a été faite entre la 7<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> racine cervicale ventrale de la moelle épinière. Seul le niveau de la section rostrale différait, se faisant au niveau de l'émergence des nerfs crâniens VII pour les préparations de bulbe rachidien-moelle épinière (préparations MS, pour medullary-spinal cord), au niveau de

l'émergence des nerfs crâniens V, caudaux aux colliculi inférieurs, pour les préparations de pont-bulbe rachidien-moelle épinière (préparations PMS, pour pons-medullary-spinal cord), au niveau de l'intersection entre l'artère cérébrale postérieure et l'artère communicante postérieure pour les préparations de tronc cérébral-moelle épinière (préparations BS, pour brainstem-spinal cord) et enfin au niveau de l'extrémité rostrale du chiasma optique pour les préparations de diencéphale-tronc cérébral-moelle épinière (préparations DBS, pour diencephalic-brainstem-spinal cord). Le type de préparation était choisi au regard de l'hypothèse considérée.

## I.1.1.2- Enregistrement de l'activité électrique des racines cervicales ventrales C4

L'activité des racines cervicales ventrales C4 est enregistrée au moyen d'une électrode de succion obtenue par étirement d'un tube de verre pour que son extrémité mesure 70±10 µm de diamètre (Clark Electromedical instruments). L'électrode munie d'un fil d'argent fixée à un porte électrode (M3301/M1, WPI France), lui-même fixé à un micromanipulateur manuel sur pied magnétique est reliée à une seringue qui permet d'exercer une dépression. L'extrémité de l'électrode est amenée à proximité de la racine cervicale ventrale C4 et une légère dépression permet de placer la racine dans l'électrode. Le LCRa accompagnant la racine permet d'assurer la continuité électrique avec le fil d'argent. Les signaux électriques sont ensuite dirigés vers un système d'enregistrement où ils sont filtrés (300-1000 Hz), amplifiés (gain 10000 ; Differential AC Amplifier Model 1700 ; A-M systems), digitalisés et intégrés *via* un PowerLab 4SP et enfin, visualisés et analysés grâce un système d'analyse de données LabChart 7.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Le signal enregistré est analysé selon deux variables : la fréquence respiratoire ( $f_R$ ) définie comme étant le nombre de cycles respiratoires (une bouffée inspiratoire suivie d'une période de silence assimilée l'expiration) pendant 1min (cycles min<sup>-1</sup>)(Suzue, 1984, Voituron et al., 2005).

# I.2- Protocoles expérimentaux

## I.2.1- Substances pharmacologiques

La majeure partie des substances pharmacologiques utilisées dans ces expérimentations ont été achetées chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) : l'étonogestrel (3-kétodésogestrel; ETO), le solvant de l'étonogestrel le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Ren and Greer, 2006) et l'orexine A (O6012). Par ailleurs l'antagoniste spécifique des récepteurs 1 et 2 à l'orexine, l'almorexant (ACT-078573, (2R)-2-{(1S)-6,7-dimethoxy-1-[2-(4-trifluoromethylphenyl)-ethyl]-3,4-dihydro-1Hisoquinolin-2-yl}-N-methyl-2-phenyl-acetamide) nous a été fourni par le laboratoire pharmaceutique Actelion.

I.2.2- Détermination et analyse de l'effet de l'étonogestrel en condition de normopH

La première série de protocoles présentée ici visait à apprécier l'effet de l'ETO en condition de normopH, sur la f<sub>R</sub>. En fonction de l'hypothèse testée il a été ajouté au LCRanormopH des agents pharmacologiques : soit l'ETO à différentes concentrations (5·10<sup>-1</sup> et 1  $\mu$ M), dissout dans DMSO 0,01%, soit du DMSO seul à 0,01%.

Le protocole commence par une période de stabilisation qui consiste en une superfusion de 30 min avec du LCRa-normopH dépourvu de substances pharmacologiques (Figure 35). Ensuite les préparations ont été superfusées avec du LCRa-normopH contenant soit de l'ETO soit du DMSO pendant 30 min. A noter qu'après cette période d'exposition des préparations ont été soumises à une période de retour aux conditions initiales (LCRa-normopH, sans substance pharmacologique). L'effet de l'ETO sur la f<sub>R</sub> en normopH a été apprécié dans un premier temps minute par minute le long des 30 min d'exposition. Les résultats obtenus ont montré que l'effet de l'ETO sur la f<sub>R</sub> tend à devenir significatif après 10 min d'exposition. Par la suite l'effet de l'ETO a été apprécié en comparant la valeur moyenne obtenue pendant les 10 dernières minutes de la période de stabilisation (V<sub>témoins</sub>).



Figure 35 : Schéma représentant le protocole d'exposition en normopH.

Après une période de stabilisation, les préparations sont exposées soit à l'ETO soit au DMSO, l'effet de l'ETO a été apprécié en comparant V<sub>normopH</sub> à V<sub>témoins</sub> calculées sur respectivement 5 et 10 min.

I.2.3- Détermination et analyse de l'effet de l'étonogestrel en condition d'acidose métabolique

Cette série expérimentale visait à apprécier l'effet de l'ETO sur la  $f_R$  en condition d'acidose métabolique, un modèle d'hypercapnie couramment utilisé (Harada et al., 1985, Gestreau et al., 2010). Pour cela elles ont été superfusées avec un LCRa qui diffère du LCRa-normopH en terme de concentration en NaHCO<sub>3</sub> (15 mM), saturé avec O<sub>2</sub> et ajusté à pH 7,23 par bullage avec 95%O<sub>2</sub> et 5%CO<sub>2</sub> (LCRa-acidose métabolique) (Gestreau et al., 2010).

Après une période de stabilisation, les préparations ont été superfusées avec du LCRanormopH contenant : soit de l'ETO à différentes concentrations  $(5 \cdot 10^{-2} ; 5 \cdot 10^{-1} ; 1 \text{ et } 2 \ \mu\text{M})$  soit du DMSO pendant 15 min, temps nécessaire pour que l'effet de l'ETO soit observable, afin de s'affranchir de son potentiel effet en normopH (Figure 36). Les préparations ont ensuite été superfusées avec du LCRa-acidose métabolique toujours en présence soit d'ETO soit de DMSO pendant 30 min. Après cette période d'exposition à l'acidose métabolique quelques préparations ont été soumises à une période de retour aux conditions initiales (LCRanormopH, sans substance pharmacologique). L'effet de l'ETO sur la f<sub>R</sub> et IntC4 en acidose métabolique a été apprécié en comparant la valeur moyenne obtenue pendant les 5 dernières minutes de la période d'acidose métabolique (V<sub>acidose métabolique</sub>) à la moyenne calculée sur les 5 min qui précèdent le passage en acidose métabolique (V<sub>pré-acidose métabolique</sub>).



#### Figure 36 : Schéma représentant le protocole d'exposition en acidose métabolique.

Après une période de stabilisation, les préparations sont exposées soit à l'ETO soit au DMSO toujours en normopH, puis exposées à une acidose métabolique. L'effet de l'ETO a été apprécié en comparant V<sub>acidose</sub> métabolique à V<sub>pré acidose métabolique</sub> calculées sur 5 min.

## I.2.4- Détermination de l'implication potentielle des neurones orexinergiques

A la suite des séries expérimentales explicitées ci-dessus il est apparu que sur les préparations DBS l'exposition à l'ETO en acidose métabolique a induit une potentialisation de l'augmentation de la f<sub>R</sub> causée par l'acidose métabolique avec un effet optimal à  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M. L'analyse de l'effet de l'ETO sur les 3 autres types de préparations (MS, PMS et BS) avec différents niveaux d'extension rostrale (Figure 34), a montré que cet effet potentialisateur requiert l'activation d'un mécanisme diencéphalique. Nous avons donc ensuite focalisé nos expériences sur l'implication des neurones orexinergiques du diencéphale, chémosensibles au  $CO_2/H^+$  (Williams et al., 2007). Pour cela, la série de protocoles présentée ci-dessous avait pour but d'évaluer l'implication de la signalisation orexinergique dans les effets observés de l'ETO sur les préparations DBS, en travaillant avec un antagoniste spécifique des récepteurs 1 et 2 à l'orexine (Brisbare-Roch et al., 2007), l'almorexant précédemment utilisé dans des investigations concernant l'étude de la commande centrale respiratoire (Li and Nattie, 2010).

#### I.2.4.1- Effet de l'orexine A sur la fR

Dans un premier temps il nous a fallu apprécier l'effet de l'orexine sur la f<sub>R</sub>. En nous basant sur les données de la littérature nous avons travaillé avec l'orexine A décrite comme ayant un effet facilitateur sur la commande centrale respiratoire (Young et al., 2005, Huang et al., 2010) et comme induisant la dépolarisation des neurones respiratoires du noyau réticulaire bulbaire ventrolatéral (Huang et al., 2010), du locus coeruleus (Hagan et al., 1999) ou encore du RTN/pFRG (Hagan et al., 1999, Lazarenko et al., 2011). D'après les données de la littérature, l'orexine A mise en solution dans du NaCl 0,9% a été testée à différentes concentrations  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , et  $5 \cdot 10^{-4} \,\mu$ M (Sugita et al., 2014, Umezawa et al., 2015).

Après une période de stabilisation, les préparations ont été exposées à l'orexine A en normopH pendant 15 min d'exposition. L'effet a été apprécié en comparant la moyenne calculée sur les 10 dernières minutes de la période de stabilisation (V<sub>témoins</sub>) à la moyenne calculée sur la dernière minute d'exposition à l'orexine A (V<sub>orexine</sub>).

#### 1.2.4.2- Détermination de la concentration d'almorexant

Ensuite, afin de déterminer la concentration nécessaire et suffisante d'almorexant à laquelle on s'assure de bloquer complètement la signalisation orexinergique nous avons effectué des co-applications d'almorexant, molécule précédemment utilisé dans des investigations concernant l'étude de la commande centrale respiratoire (Li and Nattie, 2010) et d'orexine A ( $10^{-2} \mu$ M, concentration pour laquelle on a un effet maximal). Dans un premier temps il nous a d'abord fallu déterminer si l'almorexant seul avait un effet sur la f<sub>R</sub>.

En se basant sur les données de la littérature, l'almorexant mis en solution dans du NaCl 0,9%, a été testé à différentes concentrations : 5,  $5 \cdot 10^{-1}$ , et  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M (Brisbare-Roch et al., 2007). L'effet potentiel de l'almorexant sur la f<sub>R</sub> a été testé en exposant les préparations DBS, après une période de stabilisation, en normopH pendant 15 min. L'effet a été apprécié en comparant la moyenne calculée sur les 10 dernières minutes de la période de stabilisation à la moyenne calculée sur la dernière minute d'exposition à l'almorexant. La concentration  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M a été sélectionnée pour s'affranchir des effets non-spécifiques de la molécule.

Le protocole de co-applications d'almorexant et d'orexine a ensuite été effectué. Après une période de stabilisation, les préparations ont été exposées en normopH à l'almorexant 15 min, puis à l'orexine A pendant 15 min toujours en présence d'almorexant. L'effet de l'application d'orexine A a été apprécié en comparant la dernière minute de la période de co-application almorexant-orexine A (V<sub>almorexant-orexine</sub>) à la moyenne obtenue sous almorexant seul V<sub>almorexant</sub>.

A l'issu de ce protocole il est apparu que la concentration  $5\cdot 10^{-2} \,\mu$ M était nécessaire et suffisante pour abolir l'effet de l'orexine A sur la f<sub>R</sub>.

#### *I.2.4.3-* Co-applications almorexant 5·10-2μM - ETO 5·10-1μM

Un protocole visant à déterminer si l'effet potentialisateur de l'ETO à  $5 \cdot 10^{-1} \mu M$  était toujours observable en présence d'almorexant a ensuite été mis en place (Figure 37).

Après une période de stabilisation, les préparations ont été préincubées 15 min avec l'almorexant en normopH avant de poursuivre avec un protocole équivalent au protocole *Effet de l'ETO en acidose métabolique*. Les préparations, toujours en présence de l'almorexant, ont donc ensuite été exposées 15 min en normopH avec soit du DMSO soit de l'ETO, suivie de 30 min en acidose métabolique toujours en présence des mêmes agents pharmacologiques. L'effet de l'exposition à l'ETO sur la f<sub>R</sub> a été apprécié en comparant les V<sub>acidose métabolique</sub> aux V<sub>pré-acidose métabolique</sub>.



# Figure 37 : Schéma représentant le protocole de co-applications almorexant 50nm - ETO 5·10<sup>-1</sup> $\mu$ m en acidose métabolique.

Après une période de stabilisation, les préparations sont préincubées 15 min avec l'almorexant en normopH puis exposées soit à l'ETO soit au DMSO toujours en normopH, avant d'être exposées à une acidose métabolique. L'effet de l'ETO a été apprécié en comparant V<sub>acidose métabolique</sub> à V<sub>pré acidose métabolique</sub> calculées sur 5 min.

## I.3- Statistiques

Chaque préparation n'a subi qu'un seul protocole. Les valeurs de la f<sub>R</sub> ont été exprimées en valeurs vraies ainsi qu'en pourcentage de modification moyen ± erreur standard à la moyenne (sem). La normalité de la distribution des données a été vérifiée à l'aide du test de d'Agostino et Pearson (GraphPad Prism5) permettant ou non l'utilisation de tests paramétriques. L'effet intragroupe sur la f<sub>R</sub> induite par une condition expérimentale a été apprécié en utilisant un one sample t test ou un Wilcoxon signed rank test. La comparaison de l'effet sur la f<sub>R</sub> entre 2 groupes a été effectuée en utilisant un t test non apparié. Afin de mettre en évidence les différences induites par les conditions expérimentales entre plus de 2 groupes (par exemple, la réponse respiratoire à l'acidose métabolique entre les préparations DBS, BS, PMS et MS), la f<sub>R</sub> ou le pourcentage de changement de la f<sub>R</sub> ont été comparés à l'aide d'une ANOVA 1-way suivie par le test de comparaison multiple de Bonferroni, ou en utilisant Kruskal-Wallis suivie du test de comparaison multiple de Dunn. Les différences ont été considérées comme significatives pour p <0,05.

## II- Investigations anatomiques

## II.1- Préparation et découpe des échantillons

A l'issu des protocoles *ex vivo* les préparations réservées à l'identification histologique ont été fixées par immersion dans une solution de PFA 4% à 4°C pendant 48H. Cette solution de fixation est ensuite remplacée par une solution de sucrose 30% dans du tampon phosphate à 0,1M en vue de cryoprotéger les tissus. La procédure est répétée deux fois à 24H d'intervalle. Les préparations ont ensuite été placées à -20°C en vue de leur futur traitement histologique. Ainsi à partir des préparations DBS exposées au DMSO ou à l'ETO à 5·10<sup>-1</sup> µM en normopH, en acidose métabolique et en présence ou non d'almorexant, des coupes coronales sériées de 40 µM d'épaisseur ont été obtenues au cryostat (Leica, CM1510S) et collectées dans des microplaques 12 puits (Dustcher) contenant du tampon phosphate (Phosphate Buffered Saline, PBS : PB 0,1M, NaCl 0,9%, pH 7,4).

#### II.2- Protocole d'immunomarquage

#### II.2.1- Substances pharmacologiques

Différents sels, réactifs et produits utilisés dans cette partie ont été achetées chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), à savoir : les sels nécessaires à la préparation du PBS 0,1M et du tampon TRIS 0,05 M, le tritonX100 ; le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la Bovine Serum Albumin (BSA). Les anticorps primaires : l'anticorps polyclonal fait chez le lapin dirigé contre la protéine c-FOS sc-253, et l'anticorps polyclonal fait chez la chèvre anti orexine A et B sc-28935 ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology Inc (USA). Ensuite le complexe avidine-biotine (ABC Vectastain Elite, ABC kit) et les anticorps secondaires chèvre-anti-lapin et lapin-anti-chèvre ont été achetés chez Vector Laboratories. Le 3,3'-tetrahydorchlorure de diaminobenzidine (DAB) provient de Polysciences Incorporation, tandis que le nickel ammonium sulfate provient de Carlo Erba reagents. Enfin les échantillons ont été montées avec du Entellan (Merck Millipore) sur des lames silanisées (Histobond, Marienfeld).

#### II.2.2- Simple et double détection immunohistochimique

Les marquages ont été effectués d'après le procédé immunohistochimique indirect en lumière froide avec amplification du signal grâce au complexe ABC associant un substrat chromogène la DAB mis en présence ou non de nickel ammonium sulfate (Figure 38).

Rapidement, sur le tissu la protéine d'intérêt est repérée *via* certains de ses épitopes par un anticorps primaire polyclonal fait dans une espèce donnée. On met ensuite ce complexe antigène-anticorps en présence d'un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre l'espèce ayant produit l'anticorps primaire. Puis on ajoute la solution commerciale de complexe ABC, préalablement préparée. L'avidine (masse moléculaire 66 KDa) a la propriété de posséder 4 sites de fixation pour une petite molécule (244 Da), la biotine (vitamine H), qu'elle fixe de façon quasi-covalente. Dans la solution commerciale, la biotine est couplée à un traceur enzymatique, la peroxydase. Ainsi lors de la mise en présence de cette solution et du tissu chaque anticorps secondaire biotinylé va fixer un complexe fait d'avidine et de biotine-peroxydase. *In fine*, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le substrat de la péroxydase la DAB est ajouté, ce dernier va subir une oxydation et former un dépôt chromogénique.



# Figure 38 : Schéma représentant le protocole de détection immunohistochimique des protéines c-FOS et orexine A par procédé immunohistochimique indirect en lumière froide avec amplification du signal grâce au complexe ABC.

(A) Représentation schématique et illustration des étapes (1) à (4) pour la réalisation d'un simple marquage c-FOS associant un substrat chromogène la DAB mis en présence de nickel ammonium sulfate. (B) Représentation schématique et illustration des étapes (5) à (8), consécutives aux étapes (A) pour la réalisation d'un double marquage c-FOS/orexine A/B associant un substrat chromogène la DAB.  $H_2O_2$  : péroxyde d'hydrogène.

Les marguages ce sont déroulés selon les étapes suivantes : l'activité des peroxydases endogènes a été éliminée par incubation avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30 min, ensuite une incubation de 10 min avec du PBS supplémenté en TritonX100 (PBST 0,3%) a permis la perméabilisation des membranes. Les coupes ont ensuite été incubées en présence de BSA 1% mis en solution dans du PBST 0,3% (solution de blocage) pendant 1H dans le but de saturer les sites aspécifiques et de réduire au maximum le bruit de fond. Elles ont ensuite été incubées à 4°C avec un anticorps dirigé contre la protéine c-FOS au 1:10000 mis en solution dans la solution de blocage. 48H après les coupes ont été mises en présence pendant 2H à température ambiante d'un anticorps secondaire biotinylé, fait chez la chèvre et dirigé contre le lapin, dilué au 1:500 puis pendant 1H avec de l'ABC au 1:250. L'activité de la peroxydase a ensuite été révélée par incubation avec une solution de DAB 0,015%-Nickel 0,4%- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,006% dans du tampon TRIS 0,05 M (pH 7,6), donnant un précipité bleu/gris. Les coupes sont rincées dans du PBS. Le marquage s'arrête ici en cas de simple détection. Lors d'un double marquage il poursuit comme suit : les coupes subissent de nouveau, à partir de l'incubation avec le PBST, les mêmes étapes pour mettre cette fois en évidence l'orexine A et B. Seul l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire et la solution de révélation qui ne contenait pas de nickel (le précipité chromogénique est alors marron/rouge) étaient différents (anticorps primaire fait chez la chèvre anti orexine A et B au 1:2000 ; anticorps secondaire biotinylé fait chez le lapin et dirigé contre la chèvre). A la fin d'un simple ou d'un double marquage les coupes ont ensuite été rincées à l'eau déminéralisée, montées sur des lames silanisées, séchées à l'air, déshydratées avec de l'alcool absolu, éclaircies au xylène et recouvertes d'une lamelle avec de l'Entellan.

## II.3- Analyse quantitative de la distribution des neurones détectés et statistiques

La quantification des neurones marqués dans les structures d'intérêts a été faite sous observation au microscope (DM2000, Leica, grossissement x200/400). Les repères anatomiques standards de chaque structure ont été déterminés le long de l'axe rostro-caudal selon l'atlas de (Paxinos and Watson, 1998). Le nombre moyen de neurones par coupe a été établi sur l'ensemble des structures d'intérêt. Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem. Le nombre moyen de cellules positives pour c-FOS et de cellules c-FOS / orexine par section ont été comparés entre deux conditions, en utilisant le test de Mann Whitney, one ou two tailed selon l'hypothèse considérée. Les différences ont été considérées comme significatives pour p <0,05.

RESULTATS

La commande centrale respiratoire (CCR) est élaborée par un réseau de neurones bulbo-pontique (Richter and Spyer, 2001, Feldman et al., 2003, Guyenet, 2014) dont l'activité est constamment adaptée aux besoins de l'organisme contribuant ainsi à l'homéostasie en maintenant les valeurs du pH sanguin, les pressions partielles artérielle et tissulaire en dioxyde de carbone (PaCO<sub>2</sub> et PtCO<sub>2</sub>) et en dioxygène (PaO<sub>2</sub> et PtO<sub>2</sub>) à un niveau physiologique. Tout phénomène qui induit un glissement hors des valeurs de consignes enclenche des mécanismes issus de structures périphériques et centrales qui influencent le réseau l'origine de la CCR.

Des pathologies neuro-respiratoires regroupées sous l'appellation de syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale sont associées à un dysfonctionnement de la CCR et/ou des mécanismes de régulation de cette commande (Cielo and Marcus, 2014). Ces dysfonctionnements se traduisent notamment par l'abolition ou la réduction importante de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (augmentation des PaCO<sub>2</sub> et PtCO<sub>2</sub> / diminution du pH) (Carroll et al., 2010). Ces neuropathologies regroupent notamment le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce (ROHHAD) (Bougneres et al., 2008, Carroll et al., 2010), le syndrome d'hypoventilation tardive (LO-CCHS) (Katz et al., 2000, Carroll et al., 2010) ou encore le syndrome d'hypoventilation alvéolaire central congénital (CCHS) encore appelé syndrome d'Ondine (Carroll et al., 2010). CCHS, le mieux documenté des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale est une pathologie neuro-respiratoire rare associée à la mutation du gène PHOX2B (Amiel et al., 2003). Actuellement, un consensus existe concernant l'origine de la réduction ou de la perte de la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Elle serait liée au dysfonctionnement des neurones PHOX2B-positifs du noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG), décrit comme ayant un rôle clé dans les mécanismes de chémosensibilité centrale au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Mulkey et al., 2004). La perte de ce groupe neuronal entrainerait une abolition (ou une importante réduction) de la réponse respiratoire à l'hypercapnie qui serait à l'origine des profondes hypoventilations principalement observées pendant le sommeil. Pour autant la preuve formelle de l'existence d'un groupe de neurones PHOX2B-positifs chez l'Homme équivalent au RTN/pFRG décrit chez le rongeur n'est pas clairement établie. En effet les études qui ont entrepris par analogie avec les données animales d'identifier un équivalent du RTN/pFRG rongeur chez l'Homme par immunohistochimie sont peu concluantes et n'ont à ce jour pas été reproduit (Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012, Nobuta et al., 2015). Actuellement, pour CCHS comme pour les autres syndromes d'hypoventilation centrale, il n'existe pas de traitement pharmacologique. Les patients sont donc obligatoirement placés sous ventilation assistée au minimum pendant le sommeil (Gozal, 1998, Healy and Marcus, 2011).

Dans ce contexte, un faisceau d'arguments nous a conduit à poser l'hypothèse qu'il existe des mécanismes capables de compenser le dysfonctionnement des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG (*i*) à la lumière des données actuelles, ces derniers ne sont pas mis en cause dans la pathologie du ROHHAD, ce qui suggère que la perte de la réponse au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chez ces patients est sous-tendu par d'autres mécanismes indépendants de *PHOX2B* et donc potentiellement fonctionnels chez les patients CCHS (Carroll et al., 2010), (*ii*) des souris mutantes *Phox2b* conditionnelles pour la région du RTN/pFRG sont capables d'hyperventiler lors de challenges hypercapniques à partir de 22 jours postnataux alors qu'elles ne le sont pas à la naissance (Ramanantsoa et al., 2011a) même si l'hyperventilation qu'elles développent

reste moindre en comparaison de celle des animaux témoins, (iii) dans l'unité de recherche dans laquelle ce projet doctoral a été mis en œuvre, il a été observé de façon fortuite chez deux patientes CCHS, une récupération de la réponse respiratoire à l'hypercapnie corrélée à la prise d'un puissant progestatif de la famille des gonanes : le désogestrel (Straus et al., 2010). Au vu des données de la littérature montrant les effets facilitateurs de la progestérone sur la ventilation de base et la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Zwillich et al., 1978, Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990, Bayliss and Millhorn, 1992, Jensen et al., 2005, Slatkovska et al., 2006), il a été suggéré que le desogestrel avait permis d'induire une récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Straus et al., 2010). En revanche, l'observation clinique réalisée au sein de notre unité de recherche semble être en contradiction avec une étude réalisée par une équipe américaine présentée dans le cadre d'un congrès qui a conclu qu'une patiente exposée au désogestrel ne présentait de restauration de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Li, 2013). Cette étude semble être en accord avec des données préliminaires obtenues par le Professeur Christian STRAUS au sein de notre unité de recherche<sup>3</sup>. Il semble donc que la restauration ou l'absence de restauration liée à la prise de désogestrel ne soit pas systématique. Elle pourrait ainsi dépendre de caractéristiques rencontrées ou non chez les patientes *i.e.* intégrité ou au contraire dysfonctionnement d'une structure cible ou d'un système de neurotransmission cible du progestatif. En effet, il a été décrit que les épisodes hypoxiques qui surviennent fréquemment chez les patients Ondines pouvaient induire des microlésions au sein du SNC (Harper et al., 2014). Une hypothèse plausible serait que chez certaines patientes, ces microlésions engendrent une incapacité d'action du progestatif ce qui les rendrait résistantes à la molécule. Cette réflexion ne fait que contribuer à souligner l'éventuelle complexité de la prise en charge des patients avec des progestatifs de la famille des gonanes.

Tenant compte de ces éléments, ce travail doctoral a été axé sur les actions centrales que pourrait exercer l'étonogestrel (ETO), le principal métabolite actif du désogestrel (Timmer et al., 1999). En effet, des études ont montré la capacité des stéroïdes naturels ou synthétiques à initier des voies génomiques et non génomiques influençant les fonctions neuronales, ces derniers sont considérés comme neuroactifs, (Baulieu, 1991, Barann et al., 1999, Rupprecht and Holsboer, 1999, Behan and Wenninger, 2008, Brinton et al., 2008, Behan and Kinkead, 2011). De plus, il est admis que la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> est principalement sous-tendue par des mécanismes centraux (Nattie, 1999, Lahiri and Forster, 2003, Chernov et al., 2010, Guyenet et al., 2010a, Guyenet et al., 2010b, Guyenet, 2014, Guyenet and Bayliss, 2015). Enfin sur la base de la structure chimique de l'ETO les arguments sont en faveur du fait que ce dernier est capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Pardridge and Mietus, 1979). Notre hypothèse de travail était alors que l'ETO active ou suractive des mécanismes, contribuant ainsi à l'adaptation de la CCR à l'hypercapnie. Cette activation et cette suractivation seraient capables de compenser le déficit lié au dysfonctionnement des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG chez les patientes CCHS. Au regard des données de

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>.L'essai clinique « RespirOndine » (NCT01243697) a été mis en place en 2010 par le Pr Christian Straus, directeur adjoint de l'UMR\_S 1158, chef du service central d'explorations fonctionnelles respiratoires à l'hôpital de La Pitié Salpêtrière et responsable de la branche adulte du centre de référence du syndrome d'Ondine

la littérature développées dans l'introduction de cette thèse, ces mécanismes pourraient dépendre de structures localisées dans le bulbe rachidien, le pont, le mésencéphale ou le diencéphale pour lesquelles il a été mis en évidence l'existence d'une part d'une chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et d'autre part d'une influence exercée sur le réseau respiratoire bulbo-pontique (Duffin and Hockman, 1972, Miles, 1983, Dean et al., 1990, Coates et al., 1993, Ryan and Waldrop, 1995, Horn and Waldrop, 1998, Oyamada et al., 1998, Nattie and Li, 2002a, Viemari et al., 2004a, Young et al., 2005, Zhang et al., 2005a, Zhang et al., 2005b, Li and Nattie, 2006, Biancardi et al., 2008, Song et al., 2012). D'autre part, il est à ce niveau particulièrement intéressant de souligner que des molécules couramment utilisés comme stimulants respiratoires, la medroxyprogestérone (un progestatif de la famille des pregnanes) et la progestérone n'ont pas été capables d'améliorer la ventilation et d'induire une restauration de la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez des patients CCHS (Hunt et al., 1979, Naeije et al., 1982, Oren et al., 1986, Weese-Mayer et al., 1992b, Gozal, 1998, Sritippayawan et al., 2002, Behan et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2010a). Ainsi, la connaissance précise et exhaustive des mécanismes d'action des progestatifs de la famille des gonanes ne peut que contribuer d'une part à comprendre l'origine de la récupération de la chémosensibilité des patientes Ondine et d'autre part à mettre en lumière un éventuel traitement dans le but de corriger ou de réduire leurs troubles respiratoires.

Afin appréhender les mécanismes centraux mis en jeu lors d'une hypercapnie par l'ETO, nous avons travaillé avec des préparations ex vivo de système nerveux central de rat nouveau-né. Ce modèle d'étude qui permet de s'affranchir des afférences périphériques, peut contenir en fonction de la question scientifique, en plus du bulbe rachidien et de la moelle épinière (subdivisions indispensables à l'obtention d'un rythme assimilé à la CCR depuis les travaux de (Suzue, 1984)), différentes subdivisions encéphaliques plus rostrales *i.e.* le pont, le mésencéphale et le diencéphale (Okada et al., 1998, Voituron et al., 2005). Cette caractéristique du modèle était particulièrement pertinente au regard de notre problématique dans la mesure où des données de la littérature suggèrent qu'outre le RTN/pFRG des structures neuronales localisées dans les subdivisions sus-citées jouent un rôle dans les adaptations respiratoires à l'hypercapnie (Peano et al., 1992, Horn and Waldrop, 1994, Pineda and Aghajanian, 1997, Teppema et al., 1997, Kramer et al., 1999, Lopes et al., 2012). De plus ce modèle permet d'étudier l'effet d'une substance pharmacologique exclusivement au niveau du système nerveux central (Johnson et al., 2012). Par ailleurs, nous avons associé l'analyse de l'effet de l'ETO sur ces préparations ex vivo à la détection de c-FOS sur ces mêmes préparations. Cette détection de c-FOS en immunohistologie est en effet couramment utilisée dans les études de neurophysiologie pour mettre en évidence les populations neuronales dont l'activité a été modifiée à court terme par le stimulus étudié (Dragunow and Faull, 1989, Perrin-Terrin et al., 2016). Le couplage de cette détection à celle d'un marqueur phénotypique particulier, l'orexine, nous a par ailleurs permis de révéler le rôle clé de cette population neuronale dans l'effet de l'ETO.

Dans ce contexte, ce travail doctoral avait pour principaux objectifs de :

- déterminer précisément l'effet de l'ETO le principal métabolite actif du désogestrel, sur la commande centrale respiratoire et surtout sur son adaptation à l'hypercapnie chez le rongeur ;

- d'identifier la ou les régions encéphaliques dans un premier temps puis plus précisément la ou les structures centrales mises en jeu par le progestatif chez le rongeur ;

- d'identifier la nature de populations neuronales jouant un rôle clé dans l'action de la progestative mise en jeu chez le rongeur.

Les résultats obtenus, décrits ou à décrire dans la littérature sont présentés dans les 3 chapitres suivants :

Chapitre I : L'ETO augmente la réponse respiratoire à l'acidose métabolique, un modèle d'hypercapnie, *via* l'implication de structures suprabulbaires

Chapitre II : Revue des données de la littérature qui conduisent à souligner l'intérêt des progestatifs de la famille des gonanes pour le traitement des troubles respiratoires dans le cadre des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale

Chapitre III : Implication de la signalisation orexinergique dans le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'ETO. Une potentielle piste thérapeutique pour le traitement des hypoventilations centrales

# Chapitre I : l'étonogestrel augmente la réponse respiratoire à l'acidose métabolique via l'implication de structures suprabulbaires

L'objectif de cette première étude était de caractériser l'influence centrale de l'ETO sur l'adaptation de la CCR en acidose métabolique (un modèle d'hypercapnie) mais aussi en normocapnie. L'utilisation de préparations ex vivo de système nerveux central isolé devait nous permettre de dégager un éventuel effet central de l'ETO en discriminant grossièrement son origine. Nous avons ainsi analysé les conséquences sur la CCR d'une exposition à l'ETO sur deux types de préparations i.e. des préparations de bulbe rachidien moelle épinière (MS) et des préparations de diencéphale-tronc cérébral-moelle épinière (DBS). Pour cette première étude, nous avons sélectionné une concentration d'ETO à 1 μM en nous basant sur des données de la littérature concernant d'autres stéroïdes appliqués à des préparations similaires (Ren and Greer, 2006). L'ETO a été mis en solution à l'aide du DMSO ; l'effet de l'ETO a donc été déterminé par comparaison avec des données obtenues en présence de DMSO seul à la même concentration que celle utilisée pour mettre l'ETO en solution. Concernant les conditions d'hypercapnie, nous avons fait le choix de les modéliser par une condition d'acidose métabolique comme réalisé dans d'autres études (Harada et al., 1985, Wang et al., 2001b, Gestreau et al., 2010). Afin de distinguer précisément l'action du progestatif sur l'adaptation de la CCR en acidose métabolique, nous avons dans un premier temps analysé son action dans des conditions de normopH qui elles modélisent la normocapnie.

# I- Effet de l'étonogestrel en normopH

Sur les préparations MS, l'exposition à l'ETO induisait une augmentation significative de la f<sub>R</sub> en comparaison des valeurs obtenues avant l'exposition à ETO, mais cette augmentation n'était pas statistiquement différente de celle observée après exposition au DMSO. Ces données suggèrent donc une tendance de l'ETO à augmenter la f<sub>R</sub> mais insuffisamment puissante pour apparaitre significative en comparaison de ce que nous avons observé au sein du groupe témoin. Sur les préparations DBS, l'exposition à l'ETO n'entrainait pas d'augmentation de la f<sub>R</sub> en comparaison des valeurs obtenues sur la période qui précédait l'exposition à ETO ; il n'y avait pas de différence significative entre les préparations exposées à l'ETO et celles exposées au DMSO seul. La comparaison des données observées sur les deux types de préparations suggère que parallèlement à une légère influence facilitatrice bulbaire sur la f<sub>R</sub>, l'ETO activerait en parallèle un/des mécanismes suprabulbaires qui eux s'opposeraient à l'augmentation de la f<sub>R</sub>. Ces données sont à mettre en parallèle avec des données obtenues au laboratoire et récemment publiées (Joubert et al., 2016). Dans cette étude, il a été mis en évidence 1/ chez les patientes CCHS ayant récupéré une réponse respiratoire à l'hypercapnie sous désogestrel (Straus et al., 2010), une élévation de leur f<sub>R</sub> en normocaphie, 2/ sur des souris *in vivo* une élévation de leur  $f_R$  en normocaphie et 3/ sur des préparations MS de souris nouveau-nées une augmentation de la f<sub>R</sub> dépendante des systèmes sérotoninergiques bulbaires. Ainsi cet effet facilitateur bulbaire pourrait être minimisé chez le rat nouveau-né dans certaines conditions *i.e.* activation de mécanismes suprabulbaires. Par ailleurs, il est également possible que les préparations MS de rat nouveau-né présentent des différences en comparaison des préparations MS de souris qui minimisent cet effet facilitateur bulbaire. En effet, l'effet facilitateur de l'ETO semble être en partie lié à une action du progestatif sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, des récepteurs dont la résultante de leur activation dépend de la maturation du système nerveux central (Ben-Ari et al., 2012), or il est établi que la maturité du système nerveux central des souris nouveau-nées est moindre par rapport à celle des rats nouveau-nés à l'âge où les animaux ont été utilisé pour réaliser ces expériences (Gauda, 2006).

#### II- Effet de l'étonogestrel en acidose métabolique

Sur les préparations MS, l'exposition à l'ETO n'a pas modifié l'augmentation de la  $f_R$ induite par l'acidification du pH du liquide céphalorachidien artificiel qui superfusent les préparations *i.e.* sous ETO comme sous DMSO l'augmentation de la f<sub>R</sub> en réponse à l'acidose métabolique est du même ordre. Sur les préparations DBS contenant les structures suprabulbaires (pont, mésencéphale et diencéphale), au contraire, l'ETO a induit une majoration significative de l'augmentation de la f<sub>R</sub> induite par l'acidose métabolique, en comparaison de ce qui a été observé en cas d'exposition au DMSO. Notre hypothèse est que cette augmentation de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique illustre l'activation et/ou la suractivation des mécanismes à la base de la restauration de la réponse à l'hypercapnie des patientes CCHS. De plus, cet effet de l'ETO semble dépendant de la présence de structures suprabulbaires puisque nous ne l'observons pas sur les préparations MS. Différentes structures pourraient être impliquées dans cette augmentation de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique induite par l'ETO : le locus coeruleus, la substance grise périaqueductale, ou encore des structures localisées dans l'hypothalamus caudal comme le noyau dorsomédian, l'aire hypothalamique latérale ou l'aire hypothalamique postérieure ; ces structures ayant été décrites comme contenant des neurones chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Peano et al., 1992, Horn and Waldrop, 1994, Pineda and Aghajanian, 1997, Teppema et al., 1997, Kramer et al., 1999, Arbogast and Voogt, 2002, Lopes et al., 2012, Jin et al., 2013).

Ces premiers résultats ont donc permis d'identifier une action facilitatrice de l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique et de souligner la nécessité de la présence des régions encéphaliques suprabulbaires pour que cette action s'exerce. La connaissance précise et exhaustive des mécanismes sous-jacents à l'action du progestatif reste encore à décrire, ce qui sera l'objet du Chapitre III après une mise en perspective de ces premiers résultats vis-àvis des données disponibles dans la littérature dans le Chapitre II. Contents lists available at ScienceDirect

# Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

# The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures

Camille Loiseau<sup>a,b</sup>, Diane Osinski<sup>a,b</sup>, Fanny Joubert<sup>a,b</sup>, Christian Straus<sup>a,b,c</sup>, Thomas Similowski<sup>a,b,d</sup>, Laurence Bodineau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup> INSERM, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005 Paris, France

<sup>c</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service d'Explorations Fonctionnelles de la Respiration, de l'Exercice et de la Dyspnée,

F-75651 Paris, France

<sup>d</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale, F-75651 Paris, France

#### HIGHLIGHTS

- Central hypoventilations are associated with loss of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> respiratory response.
- Etonogestrel increased the respiratory frequency by medullary mechanisms.
- In presence of supramedullary areas, etonogestrel enhanced the response to acidosis.
- Etonogestrel may constitute a therapeutic perspective for central hypoventilations.

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 5 February 2014 Received in revised form 28 February 2014 Accepted 7 March 2014

Keywords: CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity Central respiratory drive Central congenital hypoventilation syndrome Etonogestrel *Ex vivo* preparations of central nervous system Supramedullary structures

#### ABSTRACT

Central congenital hypoventilation syndrome is a neuro-respiratory disease characterized by the dysfunction of the  $CO_2/H^+$  chemosensitive neurons of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. A recovery of  $CO_2/H^+$  chemosensitivity has been observed in some central congenital hypoventilation syndrome patients coincidental with contraceptive treatment by a potent progestin, desogestrel (Straus et al., 2010). The mechanisms of this progestin effect remain unknown, although structures of medulla oblongata, midbrain or diencephalon are known to be targets for progesterone. In the present study, on *ex vivo* preparations of central nervous system of newborn rats, we show that acute exposure to etonogestrel (active metabolite of desogestrel) enhanced the increased respiratory frequency induced by metabolic acidosis *via* a mechanism involving supramedullary structures located in pontine, mesencephalic or diencephalic regions.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; C4, fourth cervical ventral nerve root; CCHS, congenital central hypoventilation syndrome; CNS, central nervous system; DBS, diencephalon-brainstem-spinal cord preparations; DMSO, dimethyl sulfoxide; ETO, etonogestrel;  $f_R$ , respiratory frequency; MS, medullary-spinal cord preparations; PAG, periaqueductal gray; PRMC1, progesterone receptor membrane component 1; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group.

\* Corresponding author at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR.S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005 Paris, France. Tel.: +33 1 40 77 98 24; fax: +33 1 40 77 97 89.

*E-mail addresses:* laurence.bodineau@upmc.fr, laurence.bodineau@gmail.com (L. Bodineau).

http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.040 0304-3940/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is a neuro-respiratory disease characterized by life-threatening sleep-related hypoventilation associated with dysfunction of  $CO_2/H^+$  chemosensitive/PHOX2B-positive neurons of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) [1,2]. Recent studies suggest that various mechanisms may compensate this dysfunction: (i) recent incidental findings in two adult women with CCHS showed recovery of  $CO_2/H^+$  chemosensitivity concomitantly with oral contraception using desogestrel, a progestin [3] and (ii) conditional *Phox2b* mutant mice for RTN/pFRG, an animal model of







CCHS, are able to hyperventilate in response to hypercapnia at 22 days postpartum while they were unable to do so at birth [4]. Data from the literature suggest that central mechanisms independent of PHOX2B-positive RTN/pFRG neurons are involved in this recovery. It is generally accepted that, in addition to RTN/pFRG, considered to be the main  $CO_2/H^+$  chemosensitive site [5], other central nervous system (CNS) structures in various brain regions, such as pons, mesencephalon or diencephalon, may also play a role in modulating the ventilatory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> changes [6–10]. Progesterone and its metabolites are known to possess a wide range of targets within the CNS [11–14]. These steroids have a facilitatory influence on the central respiratory drive in humans, cats and rats, in response to both acute and chronic exposure, by acting on central mechanisms that remain poorly elucidated [15-19]. In the light of these data, we hypothesized that desogestrel, the progestin associated to a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in CCHS patients [3], activated or over-activated one or more central structures displaying CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sensitivity [6-10].

The present study was designed to determine whether acute exposure to the metabolite of desogestrel, etonogestrel (ETO) [20], has an impact on central respiratory drive. ETO is the biologically active metabolite of desogestrel. It displays a much higher affinity (25 times) for progesterone receptors than progesterone [21]. We hypothesized that acute ETO exposure (short-term effects) would enhance central respiratory drive and would do so more intensely in the presence of supramedullary structures. To test this hypothesis, we analyzed the effect of ETO on respiratory frequency ( $f_R$ ) of *ex vivo* CNS preparations from newborn rat under both normal pH and metabolic acidosis conditions. Two types of CNS preparations were used: preparations either containing or not containing supramedullary structures up to the diencephalon [22–24].

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals

Experiments were performed on CNS preparations isolated from newborn Sprague-Dawley rats (0–3 days old;  $8.04\pm0.12$  g; Janvier Labs; Le Genest Saint Isle, France) in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and French law (87/848), all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

#### 2.2. Surgery

Under deep cold anesthesia, medullary-spinal cord (MS) and diencephalon-brainstem-spinal cord (DBS) preparations were dissected out from different animals, as previously described [22-24]. In both cases, a caudal section was made between the seventh and eighth cervical spinal nerve roots. The rostral section differed between MS and DBS preparations: at the level of the VIII cranial nerve exit points for MS preparations and at the level of the rostral extremity of the optic chiasm for DBS preparations (Fig. 1(A)) [23,24]. Preparations were then placed in a recording chamber (10 mL) with the ventral surface facing upward, superfused at  $26 \pm 1 \,^\circ C$ , at a rate of  $10 \, mL \bullet min^{-1}$ with artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 129 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.15 mM MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 0.58 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 30 mM glucose, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 0.21 mM NaHCO<sub>3</sub>), saturated with O<sub>2</sub> and adjusted to pH 7.4 by bubbling with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (normal pH-aCSF).

#### 2.3. Drugs

Pharmacological agents were added to aCSF according to experimental conditions, *i.e.* ETO (3-ketodesogestrel; Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dissolved, like other steroids, in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) [19] or DMSO alone. The final concentrations of ETO and DMSO in the aCSF were 1  $\mu$ M and 0.01%, respectively.

# 2.4. Recording of ex vivo preparations of central nervous system electrical activity

The electrical activity of a fourth cervical ventral nerve root (C4) was recorded using a suction electrode (Fig. 1(B)), filtered (10–3000 Hz), amplified ( $\times$ 5000), integrated (time constant 100 ms) and digitized through a Spike 2 data analysis system (CED, Cambridge, UK), with a sampling frequency of 2500 Hz. As previously reported, f<sub>R</sub> was defined as the burst frequency recorded from C4 over 1 min [22].

#### 2.5. Experimental protocols

After the surgical procedure, preparations were superfused for 30 min with normal pH-aCSF to stabilize  $f_R$ ; control values were defined as the mean value over the last 10 min of this period. Two experimental protocols were carried out on both MS and DBS preparations to analyze the effect of ETO on  $f_R$  (Fig. 1(C)): under normal pH conditions (protocol 1) and under metabolic acidosis conditions (protocol 2). For protocol 1, ETO or DMSO alone were add to normal pH-aCSF to give ETO-normal pH-aCSF and DMSO-normal pH-aCSF, respectively. The metabolic acidosis test (protocol 2) was performed using aCSF that differed from normal pH-aCSF in terms of NaHCO<sub>3</sub> concentration (0.15 mM), saturated with  $O_2$  and adjusted to pH 7.23 by bubbling with 95%  $O_2$  and 5% CO<sub>2</sub> (metabolic acidosis-aCSF) in which ETO or DMSO alone were added to give ETO-metabolic acidosis-aCSF and DMSO-metabolic acidosis-aCSF, respectively. Preparations were also superfused with a free DMSO/free-ETO-metabolic acidosis-aCSF.

*Protocol 1*: after the stabilization period, preparations were superfused with either ETO-normal pH-aCSF or DMSO-normal pH-aCSF for 30 min, corresponding to the normal pH-test period.  $f_R$  values of the normal pH-test period were expressed relative to control values. The mean value obtained during the last 5 min of the normal pH-test period was used to analyze the effect of ETO or DMSO.

*Protocol 2*: after the stabilization period, preparations were superfused successively with ETO-normal pH-aCSF or DMSO-normal pH-aCSF for 15 min before being superfused with ETO-metabolic acidosis-aCSF or DMSO-metabolic acidosis-aCSF respectively for 30 min, *i.e.* metabolic acidosis-test period.  $f_R$  values of the metabolic acidosis-test period were expressed relative to mean values of  $f_R$  obtained during the 5-min period preceding the metabolic acidosis-test period (pre-metabolic acidosis values). The mean value obtained during the last 5 min of the metabolic acidosis-test period was used to analyze the effect of ETO or DMSO.

#### 2.6. Statistics

All values were expressed as mean  $\pm$  SEM. Only one experimental test was carried out for each preparation. Normality of data distribution was verified using the Kolmogorov–Smirnov test (GraphPad Prism5), allowing the use of parametric tests. Two-way ANOVA followed by *post hoc* inferences for individual comparisons using the least significant difference test (Bonferroni correction) were performed (GraphPad Prism5). Values obtained at the end of the normal pH-test and metabolic acidosis-test periods for each group of preparations were compared to control values or premetabolic acidosis values, respectively. The effect of ETO was also compared to the values obtained with DMSO under both normal



**Fig. 1.** *Ex vivo* CNS preparations, anatomical structures, respiratory-like activity and experimental protocols. Schematic diagram showing an *ex vivo* preparation of CNS from a newborn rat containing the medulla oblongata and supramedullary regions up to the diencephalon (A). Dotted lines show the levels of transections: the rostral extremity for DBS preparations (1) and for MS preparations (2); the caudal extremity for both MS and DBS preparations (3). A typical electrophysiological respiratory-like activity recording at the level of C4 and its integration is presented in (B). Schematic representation of the protocols used to test the effect of ETO under normal pH and metabolic acidosis conditions (C). Dotted lines represent the ends of protocol 1 (1) and protocol 2 (2). Anterior inferior cerebellar artery (aica); V, VI, VIII, IX, X, XI, XII cranial nerves.

pH and metabolic acidosis conditions for MS and DBS preparations. Differences were considered significant for *p* < 0.05.

#### 3. Results and discussion

#### 3.1. Baseline respiratory frequency

Mean f<sub>R</sub> was significantly different between MS  $(8.95 \pm 0.21 \text{ bursts} \bullet \text{min}^{-1})$ n = 54) and DBS  $(5.22 \pm$ 0.14 bursts • min<sup>-1</sup>, n = 56; p < 0.0001) preparations in line with previous data [23]. The moderating effect of supramedullary areas may depend on the pontine A5 region, which is known to decrease  $f_{R}$  [25] and/or other supramedullary areas such as those included in the mesencephalon, which exert a moderating effect on neurons of the ventrolateral reticular nucleus of the medulla oblongata encompassing the ventral respiratory group [24].

#### 3.2. ETO stimulation at normal pH

Under normal pH conditions, the f<sub>R</sub> of MS preparations was significantly increased by acute exposure to ETO (+29.68  $\pm$  14.41%, n = 8, p < 0.05; Fig. 2(B1 and B2)), but was not significantly changed by exposure to DMSO (+8.64 $\pm$ 5.18%, *n*=14; Fig. 2(A1 and A2)). However, there was no significant change between ETO and DMSO exposure (Fig. 2(E)). As exposure to ETO was only brief (30 min), the short-term observed facilitatory effect could be related to nongenomic effects dependent on an interaction with membrane receptors [11,26]. ETO may act on progesterone receptors such as progesterone receptor membrane component 1 (PRMC1), G protein-coupled membrane progesterone receptors, or may interact with GABA<sub>A</sub> or glycine receptors [12–14,19,27]. In particular, ETO could directly act at the level of the pre-Bötzinger complex, the center of inspiratory rythmogenesis [28], in which PRMC1 and GABA<sub>A</sub> receptors have been identified [27,29]. In addition, the short-term observed effects could be due to genomic mechanisms. Indeed, it has been reported that progesterone, through a genomic mechanism, induced a respiratory short-term effect when it was injected in a respiratory structure [17]. In DBS preparations,  $f_R$  in response to ETO or DMSO was not significantly different from control values (+21.52 ± 12.21%, *n* = 13 and +18.06 ± 12.21%, *n* = 22 respectively; Fig. 2(D1 and D2 and C1 and C2)). Loss of the facilitating effect of ETO induced by the addition of supramedullary areas suggests that, in parallel to its medullary facilitating influence on baseline central respiratory drive, ETO also exerts a moderating influence by a mechanism dependent on the presence of supramedullary structures under normal pH conditions. ETO may reinforce the moderating effect of supramedullary areas such as those that contribute to a less elevated baseline  $f_R$  in DBS than in MS. Obviously, further experiments are necessary to validate this hypothesis.

#### 3.3. Increase in respiratory frequency under metabolic acidosis

Under metabolic acidosis conditions (DMSO-aCSF superfusion), there was a similar significant increase in f<sub>R</sub> in both MS and DBS preparations (+31.78 ± 4.92%, p < 0.001, n = 14 and +27.84 ± 5.66%, p < 0.05, n = 7, respectively; Fig. 3(E)). The increase in f<sub>R</sub> observed in MS preparations is consistent with previous studies reporting that the magnitude of the metabolic acidosis-induced increase in f<sub>R</sub> in rats is approximately +30% [23,30]. To our knowledge, the present report is the first to analyze the effect of metabolic acidosis on *ex vivo* preparations of CNS containing supramedullary structures up to the diencephalon. The magnitude of the increase in f<sub>R</sub> was similar in DBS and MS, suggesting that supramedullary areas do not influence f<sub>R</sub> adaptation to metabolic acidosis with DMSOaCSF superfusion at least at this developmental stage and in the deafferented conditions used in this study.

#### 3.4. ETO stimulation under metabolic acidosis

The main result of this study in terms of our initial problem is that under metabolic acidosis conditions, in DBS



**Fig. 2.** Effect of ETO under normal pH conditions on  $f_R$  in *ex vivo* CNS preparations. Typical respiratory C4 activity recorded in CNS preparations. MS preparations superfused with normal pH-aCSF (A1) and (B1) and then with DMSO-normal pH-aCSF (A2) or ETO-normal pH-aCSF (B2), respectively. DBS preparations superfused with normal pH-aCSF (C1) and (D1) and then with DMSO-normal pH-aCSF (C2) or ETO-normal pH-aCSF (D2), respectively. Histogram showing the mean  $f_R$  obtained in MS and DBS preparations exposed to DMSO (white bars) or ETO (gray bars) (E). All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Significant increase in mean  $f_R$  compared to control values. Integrated activity of the C4 ventral nerve root (JC4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (JC4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (JC4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (JC4); T = 0

preparations, ETO induced a significant strengthening of the increase in f<sub>R</sub> compared to that observed in DBS preparations exposed to DMSO (approximately +50%; +78.22  $\pm$  21.91%, n = 7 with ETO vs. +27.84  $\pm$  5.66%, n = 7 with DMSO, p < 0.001; Fig. 3(D1 and D2 and C1 and C2)) and compared to that observed in DBS preparations superfused with free-DMSO/free-ETO-metabolic acidosisaCSF (approximately +42%; +78.22  $\pm$  21.91%, *n*=7 with ETO *vs*. +36.08  $\pm$  8.85%, *n* = 7 with free-DMSO/free-ETO, *p* < 0.01). In contrast, the mean effect of ETO-metabolic acidosis-aCSF superfusion on MS preparations (+22.07  $\pm$  3.84%, *n* = 18; Fig. 3(B1 and B2)) was not significantly different from that developed by MS preparations exposed to DMSO (+31.78  $\pm$  4.92%, *n* = 14; Fig. 3(A1 and A2)). Under metabolic acidosis conditions, the more marked increase in f<sub>R</sub> observed with ETO compared to DMSO in DBS but not in MS preparations suggests that, under our deafferented ex vivo conditions, this progestin enhanced the metabolic acidosis-induced increase in f<sub>R</sub> by a mechanism involving supramedullary structures. Various supramedullary structures have been implicated in the respiratory response to hypercapnia, such as the locus coeruleus localized in the pons, periaqueductal gray (PAG) in the mesencephalon and the caudal hypothalamus in the diencephalon [6–10,31]. Cells of some of these structures, *i.e.*, PAG, locus coeruleus and hypothalamus,



**Fig. 3.** Effect of ETO under metabolic acidosis conditions on  $f_R$  in *ex vivo* CNS preparations. Typical respiratory C4 activity recorded in CNS preparations. MS preparations superfused with DMSO-normal pH-aCSF (A1) and ETO-normal pH-aCSF (B1) and then with DMSO-metabolic acidosis-aCSF (A2) and ETO-metabolic acidosis-aCSF (B2), respectively. DBS preparations superfused with DMSO-normal pH-aCSF (C1) and ETO-normal pH-aCSF (C1) and ETO-normal pH-aCSF (C1) and ETO-normal pH-aCSF (C1) and ETO-metabolic acidosis-aCSF (D2), respectively. Histogram showing the mean  $f_R$  obtained in MS and DBS preparations exposed to DMSO (white bars) or ETO (gray bars) (E). All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. # Significant increase in mean  $f_R$  compared to pre-metabolic acidosis values; \* Significant difference between ETO and DMSO exposures. Integrated activity of the C4 ventral nerve root (f(C4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (f(C4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (f(C4); # p < 0.001, \*\*\* p < 0.001.

have been described as progesterone-sensitive [10,32,33]. Thus, ETO may act on one or more of these structures and activate or over-activate a supramedullary mechanism. Further experiments are obviously necessary to identify the cell populations involved and to characterize the ETO-activated mechanisms at the cellular and molecular levels.

#### 4. Conclusion

In view of our results and the recovery of  $CO_2/H^+$  chemosensitivity observed in CCHS patients exposed to desogestrel [3], this progestin may at least partly compensate for the loss of PHOX2B-positive RTN/pFRG neurons by a mechanism involving the supramedullary encephalic regions. The present results certainly highlight the value of identifying the modes of action of ETO in order to determine whether it can constitute an alternative treatment for patients with CCHS.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Association Française pour le Syndrome d'Ondine, the association CARDIF-assistance respiratoire, the Legs Poix and was supported by the French Government "Investissement d'Avenir ANR-10-AIHU 06" program. We thank Anthony Saul for the English style.

#### References

- [1] J. Amiel, B. Laudier, T. ttie-Bitach, H. Trang, P.L. de, B. Gener, D. Trochet, H. Etchevers, P. Ray, M. Simonneau, M. Vekemans, A. Munnich, C. Gaultier, S. Lyonnet, Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome, Nat. Genet. 33 (2003) 459–461.
- [2] V. Dubreuil, N. Ramanantsoa, D. Trochet, V. Vaubourg, J. Amiel, J. Gallego, J.F. Brunet, C. Goridis, A human mutation in Phox2b causes lack of CO<sub>2</sub> chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 1067–1072.
- [3] C. Straus, H. Trang, M.H. Becquemin, P. Touraine, T. Similowski, Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel, Respir. Physiol. Neurobiol. 171 (2010) 171–174.
- [4] N. Ramanantsoa, M.R. Hirsch, M. Thoby-Brisson, V. Dubreuil, J. Bouvier, P.L. Ruffault, B. Matrot, G. Fortin, J.F. Brunet, J. Gallego, C. Goridis, Breathing without CO<sub>2</sub> chemosensitivity in conditional Phox2b mutants, J. Neurosci. 31 (2011) 12880–12888.
- [5] D.K. Mulkey, R.L. Stornetta, M.C. Weston, J.R. Simmons, A. Parker, D.A. Bayliss, P.G. Guyenet, Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats, Nat. Neurosci. 7 (2004) 1360–1369.
- [6] J. Pineda, G.K. Aghajanian, Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current, Neuroscience 77 (1997) 723–743.
- [7] LJ. Teppema, J.G. Veening, A. Kranenburg, A. Dahan, A. Berkenbosch, C. Olievier, Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia, J. Comp. Neurol. 388 (1997) 169–190.
- [8] J.M. Kramer, P.C. Nolan, T.G. Waldrop, In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia, Brain Res. 835 (1999) 197–203.
- [9] E.M. Horn, T.G. Waldrop, Suprapontine control of respiration, Respir. Physiol. 114 (1998) 201–211.
- [10] L.T. Lopes, L.G. Patrone, K.C. Bicego, N.C. Coimbra, L.H. Gargaglioni, Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response, Pflugers Arch. 464 (2012) 155–166.
- [11] M. Schumacher, R. Guennoun, A. Ghoumari, C. Massaad, F. Robert, M. El-Etr, Y. Akwa, K. Rajkowski, E.E. Baulieu, Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system, Endocr. Rev. 28 (2007) 387–439.
- [12] Y. Pang, J. Dong, P. Thomas, Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and epsilon (mPRdelta and mPRepsilon) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis, Endocrinology 154 (2013) 283–295.
- [13] M. Park-Chung, A. Malayev, R.H. Purdy, T.T. Gibbs, D.H. Farb, Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, Brain Res. 830 (1999) 72–87.
- [14] D. Chesnoy-Marchais, Progesterone and allopregnanolone enhance the miniature synaptic release of glycine in the rat hypoglossal nucleus, Eur. J. Neurosci. 30 (2009) 2100–2111.

- [15] L. Slatkovska, D. Jensen, G.A. Davies, L.A. Wolfe, Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women, Respir. Physiol. Neurobiol. 154 (2006) 379–388.
- [16] O. Pascual, M.P. Morin-Surun, B. Barna, M. avit-Saubie, J.M. Pequignot, J. Champagnat, Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro, J. Physiol. 544 (2002) 511–520.
- [17] D.A. Bayliss, D.E. Millhorn, E.A. Gallman, J.A. Cidlowski, Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84 (1987) 7788–7792.
- [18] R. Lefter, C.E. Morency, V. Joseph, Progesterone increases hypoxic ventilatory response and reduces apneas in newborn rats, Respir. Physiol. Neurobiol. 156 (2007) 9–16.
- [19] J. Ren, J.J. Greer, Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period, J. Physiol. 574 (2006) 535–546.
- [20] C.J. Timmer, N. Srivastava, T.O. Dieben, A.F. Cohen, Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: Cerazette and Liseta, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 24 (1999) 335–343.
- [21] E.W. Bergink, A.D. Hamburger, J.E. de, J. van der Vies, Binding of a contraceptive progestogen ORG 2969 and its metabolites to receptor proteins and human sex hormone binding globulin, J. Steroid Biochem. 14 (1981) 175–183.
- [22] T. Suzue, Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat, J. Physiol. 354 (1984) 173–183.
- [23] Y. Okada, A. Kawai, K. Muckenhoff, P. Scheid, Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat, Respir. Physiol. 111 (1998) 55–63.
- [24] N. Voituron, A. Frugiere, F. Gros, J.M. Macron, L. Bodineau, 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 (2005) 843–854.
- [25] G. Hilaire, R. Monteau, S. Errchidi, Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat, Brain Res. 485 (1989) 325–332.
- [26] R.M. Losel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H.C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, M. Wehling, Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, Physiol. Rev. 83 (2003) 965–1016.
- [27] W. Tan, D. Sherman, J. Turesson, X.M. Shao, W.A. Janczewski, J.L. Feldman, Reelin demarcates a subset of pre-Botzinger complex neurons in adult rat, J. Comp. Neurol. 520 (2012) 606–619.
- [28] J.C. Smith, H.H. Éllenberger, K. Ballanyi, D.W. Richter, J.L. Feldman, Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals, Science 254 (1991) 726–729.
- [29] Q. Liu, M.T. Wong-Riley, Developmental changes in the expression of GABAA receptor subunits alpha1, alpha2, and alpha3 in the rat pre-Botzinger complex, J. Appl. Physiol. (1985.) 96 (2004) 1825–1831.
- [30] Y. Harada, M. Kuno, Y.Z. Wang, Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro, J. Physiol. 368 (1985) 679–693.
- [31] C.A. Peano, C.A. Shonis, G.H. Dillon, T.G. Waldrop, Hypothalamic GABAergic mechanism involved in respiratory response to hypercapnia, Brain Res. Bull. 28 (1992) 107–113.
- [32] X. Jin, W. Zhong, C. Jiang, Time-dependent modulation of GABAA-ergic synaptic transmission by allopregnanolone in locus coeruleus neurons of Mecp2-null mice, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 305 (2013) C1151–C1160.
- [33] L.A. Arbogast, J.L. Voogt, Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons, Neuroendocrinology 75 (2002) 273–281.

Chapitre II : Revue des données de la littérature qui conduisent à souligner l'intérêt des progestatifs de la famille des gonanes pour le traitement des troubles respiratoires dans le cadre des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale

L'objectif de cette revue <sup>4</sup> était d'une part de mettre en lumière l'intérêt de mener des investigations visant à utiliser des progestatifs de la famille des gonanes pour traiter les patients souffrant de syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale et d'autre part de décrire les mécanismes par lesquels ces molécules influencent la commande ventilatoire. Pour cela nous avons construit notre exposé en 3 parties : 1/ une description des modalités d'action connues de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs, 2/ la mise en évidence de l'action facilitatrice de ces molécules sur la commande ventilatoire dans des situations non-pathologiques et enfin 3/ la description des principaux éléments publiés à ce jour concernant spécifiquement les molécules de la famille des gonanes.

# I- La progestérone, ses dérivés et les progestatifs de synthèse ont des actions variées au sein du système nerveux central

Les effets de la progestérone, de ses dérivés et par extension des progestatifs (des molécules de synthèse capable de reproduire tout ou partie des effets biologiques de la progestérone en se fixant sur les mêmes récepteurs que la progestérone) sont médiés par des actions génomiques et non génomiques.

Les actions génomiques reposent sur l'interaction avec les récepteurs nucléaires à la progestérone (PR). Ceux-ci après fixation du ligand et dimérisation se fixent sur des séquences PRE (Progesterone Responsive Element) localisées dans la région promotrice de différents gènes et vont donc influencer leur expression (Leonhardt et al., 2003, Brinton et al., 2008). Les PRs sont retrouvés dans des régions du tronc cérébral directement impliquées dans la CCR et dans diverses régions encéphaliques régulant la CCR (Lauber et al., 1991, Kato et al., 1994, Haywood et al., 1999, Kastrup et al., 1999, Guerra-Araiza et al., 2001, Behan and Thomas, 2005, Helena et al., 2009, Furuta et al., 2010). Des données ont par ailleurs établi que la progestérone, ses dérivés ou encore des progestatifs de synthèse pouvaient interagir avec des récepteurs nucléaires appartenant à d'autres stéroïdes actifs ou neurostéroïdes (Schindler et al., 2003).

D'autre part, bien que de découverte plus tardive, l'existence d'une action de ces molécules via de effets non génomiques est aujourd'hui admise (Blackmore et al., 1991, Liu and Patino, 1993, Filardo et al., 2000). Cette action dépend de diverses familles de récepteurs à la progestérone : des récepteurs membranaires à la progestérone (mPR, couplés aux protéines G), le progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1,) et le récepteur

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> La revue intitulée «Current perspectives for the use of gonane progesteronergic drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes» a été soumise le 1 Avril 2017 à *Current in Neuropharmacology* 

sigma 1 (Su et al., 1988, Monnet et al., 1995, Falkenstein et al., 1996, Meyer et al., 1996, Ganapathy et al., 1999, Smith et al., 2008, Johannessen et al., 2011, Pang et al., 2013). D'autres par, ces molécules peuvent agir via des récepteurs membranaires spécifiques à d'autres messagers chimiques (le récepteur GABA<sub>A</sub>, le récepteur à la glycine, le récepteur NMDA, le récepteur nicotinique à l'acéthylcholine, le récepteur 5-HT<sub>3</sub> à la sérotonine, le récepteur à l'oxytocine) (Wu et al., 1990, Bertrand et al., 1991, Wu et al., 1991, Valera et al., 1992, Bowlby, 1993, Park-Chung et al., 1997, Grazzini et al., 1998, Wetzel et al., 1998, Barann et al., 1999, Park-Chung et al., 1999, Oz et al., 2002, Korinek et al., 2011, Borovska et al., 2012). D'une manière générale et non homogène, ces récepteurs ont tous été localisés au sein des structures du tronc cérébral et du diencéphale impliquées dans l'élaboration de la CCR ou dans sa régulation (Deutch et al., 1987, Conti et al., 1997, Bloom and Morales, 1998, Bleakman, 1999, Alonso et al., 2000, Kitaichi et al., 2000, Mellon and Griffin, 2002, Loftis and Janowsky, 2003, Lynch, 2004, Maurice, 2004, Betz and Laube, 2006, Nashmi and Lester, 2006, Webb and Lynch, 2007, Low and Wee, 2010, Intlekofer and Petersen, 2011, Jin and Smith, 2011, Tan et al., 2012, Pang et al., 2013, Boukari et al., 2015, Dumais and Veenema, 2016, Grinevich et al., 2016). Les modalités par lesquelles les stéroïdes agissent sur ces récepteurs ne sont pas toutes connues. A titre d'exemple, il est admis que certains d'entre eux exercent une modulation allostérique sur le récepteur GABA<sub>A</sub> avec pour résultante une modification du temps d'ouverture du canal à l'issue de la fixation du ligand sur le récepteur. En fonction de certaines caractéristiques de ces molécules, leur action est soit positive soit au contraire négative (Park-Chung et al., 1999).

# II- La progestérone et des progestatifs de synthèse exerce une action stimulante sur la commande respiratoire dans des situations non pathologiques

Comme cela a été développé dans l'introduction de cette thèse, diverses études ont montré que la progestérone, ses dérivés ou tout au moins certains, ainsi que différents progestatifs exercent une action globalement facilitatrice sur la commande ventilatoire.

Ce concept sur la ventilation de base en normocapnie a été formulé dès les travaux de Hasselbach et collaborateurs qui ont établi une diminution de la PCO<sub>2</sub> au cours de la grossesse, une situation physiologique caractérisée entre autre par des taux particulièrement élevés de progestérone (Hasselbach, 1912b, 1915b). Un concept confirmé par la suite avec la mise en évidence d'une ventilation plus élevée et d'une PCO<sub>2</sub> plus basse chez la femme pendant la phase lutéale en comparaison des valeurs observées pendant la phase folliculaire (Griffiths and Lovick, 2005, Slatkovska et al., 2006, Macnutt et al., 2012). Bien que les données soient parfois quelque peu contradictoires, dans un contexte de challenge gazeux (hypoxie ou hypercapnie), l'influence de ces molécules a également été soulignée. On peut par exemple citer les travaux ayant mis en évidence une augmentation du chémoréflexe au CO<sub>2</sub> chez la femme enceinte soumise à un mélange gazeux hyperoxique et enrichi en CO<sub>2</sub>. Ces travaux juxtaposés à d'autres données ont permis d'établir que les taux plasmatiques de progestérone étaient corrélés positivement à une augmentation de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub> (Jensen et al., 2005).
En ce qui concerne les mécanismes d'action, diverses études menées chez l'animal ont permis d'établir que l'action de ces stéroïdes dépendait d'effets génomiques et non génomiques localisés au sein du tronc cérébral ou du diencéphale. Plus particulièrement le NTS et l'hypothalamus caudal ont été mis en évidence comme des noyaux ou aires encéphaliques jouant un rôle clé dans l'action respiratoire de la progestérone (Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990). Les mécanismes associés dépendent d'action génomique ou non génomique dans la mesure où l'effet facilitateur sur la ventilation a pu être supprimé par l'application d'antagoniste des PR ou en faisant diminuer la traduction des ARNm codants les mPR (Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990, Pascual et al., 2002, Boukari et al., 2015, Boukari et al., 2016). En parallèle de ces éléments les systèmes sérotoninergiques doivent également être mentionnés. En effet, il semble qu'une partie au moins de l'action respiratoire de la progestérone implique une régulation de ces systèmes ; en particulier, il est admis que le dimorphisme sexuel constaté au sein de certains groupes neuronaux respiratoires dépend d'une corrélation entre les niveaux de sérotonine et les taux de progestérone (Behan et al., 2003).

## III- Des données cliniques et issues de modèles animaux suggèrent que les gonanes augmentent la ventilation chez des patientes CCHS

L'observation princeps qui a conduit à développer un intérêt pour les progestatifs de la famille des gonanes est relativement récente. Il s'agit de l'observation fortuite d'une restauration de la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez deux patientes Ondines placées sous désogestrel dans un but contraceptif (Straus et al., 2010). Cette observation est la première faisant un lien entre une exposition pharmacologique chez ce type de patient et la survenue d'une amélioration de leurs troubles ventilatoire. En effet, tous les autres stimulants respiratoires testés, et en particulier la progestérone et la medroxprogestérone n'ont pas montré d'amélioration de la ventilation chez les patients Ondine (Hunt et al., 1979, Haddad et al., 1982, Naeije et al., 1982, Oren et al., 1986, Weese-Mayer et al., 1992b, Gozal, 1998, Sritippayawan et al., 2002, Behan et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2010a). Cependant, une étude menée par une autre équipe de recherche a conclu sur la base de l'observation clinique d'une patiente exposée au désogestrel à la non efficacité de la molécule (Li, 2013). Ces données contradictoires peuvent dépendre de la complexité d'action de ce type de molécule (diversité des récepteurs impliqués) et de caractéristiques propres à chaque patients (intégrité de structures encéphaliques, de populations neuronales). L'hypothèse que nous avons formulée au sein de notre unité de recherche est que le désogestrel (et par extension son métabolite actif, l'ETO) active ou suractive des éléments centraux contrôlant la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Dans la mesure où cet effet a pu être observé chez deux patientes Ondine pour lesquelles les neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG (ou son équivalent humain) ne doivent pas être fonctionnels, l'effet du désogestrel ne doit pas dépendre de ces neurones mais d'autres populations neuronales.

Dans ce contexte, nous avons entrepris l'étude présentée dans le Chapitre I des résultats qui a permis de mettre en évidence que l'ETO augmentait la réponse respiratoire à l'hypercapnie par un ou plusieurs mécanismes dépendant des structures suprabulbaires. A ce stade de nombreux éléments restaient à déterminer *i.e.* zones encéphaliques, structures neuronales et populations neuronales impliquées. Ces éléments ont fait l'objet d'une étude conséquence qui sera présentée dans le Chapitre III des résultats et qui n'a pas été inclue dans cette revue.

D'autre part, au sein du laboratoire, en parallèle des travaux entrepris dans le cadre de cette thèse qui étaient principalement axés sur l'effet du progestatif dans des conditions d'hypercapnie/d'acidose métabolique, une analyse approfondie de l'effet du désogestrel et de son métabolite actif l'ETO a été menée en normocapnie (Joubert et al., 2016). Cette analyse a permis de mettre en évidence qu'outre leurs effets sur la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>, ces molécules exercent un effet stimulant sur la CCR en normocapnie. Cet effet a pu être observé à la fois chez les patientes CCHS objet de l'observation princeps (Straus et al., 2010), sur des souris in vivo par enregistrement de leur ventilation en pléthysmographie et sur des préparations MS ex vivo de souris nouveau-née. Sur le plan mécanistique, cette action stimulante de l'ETO semble dépendre d'une stimulation des systèmes sérotoninergiques bulbaires; l'ETO induit une augmentation du nombre des neurones doublement positifs pour c-FOS et la sérotonine au sein des noyaux des raphés bulbaires caudaux (Raphé Pallidus et Obscurus) et l'antagonisation de l'influence sérotoninergique qui s'exerce sur la CCR supprime l'effet stimulant de l'ETO sur les préparations ex vivo. Ces données ouvrent des perspectives de recherche clinique dans le champ des co-expositions à des agents sérotoninergiques et au désogestrel. Par ailleurs, les données obtenues sur les préparations MS de souris nouveaunées suggèrent également qu'une partie au moins de l'effet stimulant de l'ETO en normocaphie dépende d'une action exercée au niveau des récepteurs  $GABA_A$  et NMDA.



## Current perspectives for the use of gonane progesteronergic drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes

Journal:	Current Neuropharmacology
Manuscript ID	CN-2017-0041
Manuscript Type:	Invited Review
Date Submitted by the Author:	01-Apr-2017
Complete List of Authors:	LOISEAU, Camille; UPMC Faculte de Medecine, UMRS1158 Inserm/UPMC CAYETANOT, Florence; Aix-Marseille Universite JOUBERT, Fanny; UPMC Faculte de Medecine Site Pitie-Salpetriere, UMRS1158 Inserm/UPMC; Institut de la vision, INSERM, U968, CNRS, UMR 7210 PERRIN-TERRIN, Anne-Sophie; UPMC Faculte de Medecine Site Pitie- Salpetriere, UMRS1158 Inserm/UPMC; Universite Paris 13 Nord, EA2363 CARDOT, Philippe; UPMC Faculte de Medecine Site Pitie-Salpetriere, UMRS1158 Inserm/UPMC FIAMMA, Marie-Noëlle; UPMC Faculte de Medecine, UMRS1158 Inserm/UPMC FRUGIERE, Alain; UPMC Faculte de Medecine Site Pitie-Salpetriere, UMRS1158 Inserm/UPMC STRAUS, Christian; UPMC Faculte de Medecine Site Pitie-Salpetriere, UMRS158 Inserm/UPMC BODINEAU, Laurence; UPMC Faculte de Medecine, UMRS1158 Inserm/UPMC
Keywords:	central congenital hypoventilation syndrome, desogestrel, etonogestrel, Ondine's curse syndrome, progesterone, respiratory control



TITLE: Current perspectives for the use of gonane progesteronergic drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes

### RUNNING TITLE: progesteronergic drugs and central hypoventilation

Camille LOISEAU<sup>1</sup>, Florence CAYETANOT<sup>2</sup>, Fanny JOUBERT<sup>1,3</sup>, Anne-Sophie PERRIN-TERRIN<sup>1,4</sup>, Philippe CARDOT<sup>1</sup>, Marie-Noëlle FIAMMA<sup>1</sup>, Alain FRUGIERE<sup>1</sup>, Christian STRAUS<sup>1,5,6</sup>, Laurence BODINEAU<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR\_S1158 Neurophysiologie respiratoire expérimentale et clinique, F-75013, Paris, France; <sup>2</sup> Institut de Neurosciences de la Timone, Aix Marseille Université, CNRS, UMR 7289, F-13385, Marseille, France; <sup>3</sup> Sorbonne Universités, UPMC, Paris 06, UM 80, Institut de la Vision, INSERM, U968, CNRS, UMR 7210, F-75012, Paris, France; <sup>4</sup> Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire "Hypoxia & Lung" EA2363, 74 rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny, France ; <sup>5</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Brance; <sup>6</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Brance; <sup>6</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Fonce; <sup>6</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service d'Explorations Fonctionnelles de la Respiration, de l'Exercice et de la Dyspnée (*Département "R3S"*), Paris, France.

\*CORRESPONDENCE: Laurence Bodineau, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, INSERM, UMR\_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75013, Paris, France. Tel 33 1 40 77 97 15, Fax: 33 1 40 77 97 89.

E-mail: laurence.bodineau@upmc.fr

#### ASTRACT

**Background**. Central alveolar hypoventilation syndromes (CHS) encompass neurorespiratory diseases resulting from congenital or acquired neurological disorders. Hypercapnia, acidosis, and hypoxemia resulting from CHS negatively affect physiological functions and can be life-threatening. To date, the absence of pharmacological treatment implies that the patients must receive assisted ventilation throughout their lives.

**Objective.** To highlight the relevance of determining conditions in which using gonane synthetic progestins could be of potential clinical interest for the treatment of CHS.

**Methods.** The mechanisms by which gonanes modulate the respiratory drive were put into the context of those established for natural progesterone and other synthetic progestins.

**Results.** The clinical benefits of synthetic progestins to treat respiratory diseases are mixed with either positive outcomes or no improvement. A benefit for CHS patients has only recently been proposed. We incidentally observed restoration of CO<sub>2</sub> chemosensitivity, the functional deficit of this disease, in two adult CHS women by desogestrel, a gonane progestin, used for contraception. This effect was not observed by another group, studying a single patient. These contradictory findings are probably due to the complex nature of the action of desogestrel on breathing and led us to carry out mechanistic studies in rodents. Our results show that desogestrel influences the respiratory command by interacting with GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors, medullary serotoninergic systems, and supramedullary areas.

**Conclusion.** Gonanes show promise for improving ventilation of CHS patients, although the conditions of their use need to be better understood.

#### **K**EYWORDS

central congenital hypoventilation syndrome; desogestrel; etonogestrel; Ondine's curse syndrome; gonane; progesterone; respiratory control

### **1. INTRODUCTION**

Breathing is an essential part of life that depends on a rhythmic command from a brainstem neuronal network [61, 62, 188]. Within this neuronal network, two groups of medullary neurons play an important role, the pre-Botzinger complex, which drives inspiration [61, 62, 199], and the parafacial respiratory group (pFRG), which controls preinspiratory and expiratory activities [61, 62, 165]. In addition, a recently discovered group of neurons, called the post-inspiratory complex, has been proposed as a post-inspiration generator [6]. Breathing displays a strong variability allowing the respiratory network to accurately and quickly react to even small changes in environmental and behavioral conditions [63, 64, 183, 233-235]. In particular, the central respiratory drive is finely regulated to be adjusted to variations of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and pH, detected primarily by carotid body peripheral and ventral medullary surface central chemoreceptors [60]. Ventral medullary surface chemoreceptors for CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> are included in an entity called the retrotrapezoid nucleus that overlaps with the pFRG and expresses PHOX2B [84, 165]. They are considered to be the principal  $CO_2/H^+$  chemosensory cells [84, 85, 156]. Neurons from other central structures have also been shown to be  $CO_2/H^+$  chemosensitive and stimulate the central respiratory drive, such as neurons from the caudal hypothalamus in the diencephalon, periaqueductal gray matter in the mesencephalon, the locus coreuleus in the pons, and raphe nuclei of the medulla oblongata [101, 102, 123, 136, 162, 176, 187, 209].

Central alveolar hypoventilation syndromes (CHS) are neurorespiratory diseases resulting from impairment of the neuronal network that controls respiratory rhythm generation and its modulation by peripheral or central afferent inputs [46]. Insufficient ventilation in CHS leads to an increase in  $PaCO_2$  and a decrease in  $PaO_2$ , only or mostly during non-rapid eye movement sleep, a state during which the central respiratory drive depends predominantly on chemosensitive afferents. The diagnostic criteria of CHS are i) persistent central hypoventilation with a  $PaCO_2 > 60$  mmHg during sleep, with or without apnea, detected by polysomnography while the patient spontaneously breathes room air, ii) lack of ventilatory

response to inhaled CO<sub>2</sub>, iii) and the absence of primary lung, neuromuscular, or cardiac disease [4, 224]. Hypercapnia, acidosis, and hypoxemia, resulting from central hypoventilation, lead to negative short and long-term effects. These include neural damage that induces deleterious effects on cardiovascular function and neurocognitive development, leading to a risk of sudden death and profoundly affecting neurocognitive outcome and long-term quality of life [42, 91, 124, 157, 181, 217]. CHS encompass several pathological conditions. They may be congenital, such as the most documented CHS, the Congenital Central alveolar Hypoventilation Syndrome (CCHS) or the Late Onset Hypoventilation Associated with Hypothalamic Dysfunction Syndrome. They may also be acquired, such as through ischemic or hemorrhagic brainstem lesions or in the case of the Obesity Hypoventilation Syndrome.

Some drug classes are broadly considered to be conventional respiratory stimulants, among them natural progesterone and synthetic progestins [16, 18, 48, 113, 119, 150, 175, 179, 197, 198]. However, the prescription of respiratory stimulants and physiological conditions in which plasma levels of natural progesterone are high (pregnancy) have failed to improve the ventilation of CHS patients [19, 74, 86, 201, 225]. The absence of available pharmacological treatment results in CHS patients receiving life-long treatment by mechanical ventilation, at least during sleep, either with positive pressure ventilation *via* a tracheostomy or a mask, with phrenic nerve pacing, or with negative pressure ventilation *via* a cuirass [95]. These diseases present a true handicap for patients and a decrease in the quality of life [91, 124]. This unsatisfactory therapeutic solution, due to the dependence of patients on the machine, underlines the interest in developing pharmacological alternatives. A recent serendipitous clinical observation has suggested that a specific family of progestin, the gonanes, has a beneficial effect in some CCHS patients [202]. This first observation has led to experimentation in rodents to characterize the modes of action of these molecules on ventilatory control [114, 135].

Page 5 of 47

### **Current Neuropharmacology**

The aim of this review is to first present the modes of action of natural progesterone, its derivatives, and synthetic progestins on the central nervous system (CNS) and then summarize animal and clinical data concerning progesteronergic drugs and the central control of breathing with the objective to stimulate interest in gonane progestin drugs as a potential treatment modality for CHS patients.

### 2. NATURAL PROGESTERONE, ITS DERIVATIVES, AND FAMILIES OF SYNTHETIC PROGESTINS HAVE VARIOUS MODES OF ACTION ON THE CNS

For many years, the potential role of natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins on the CNS has been of clinical interest. Natural progesterone and its metabolites can be considered to be neuroactive steroids: i) their lipophilicity allows a small fraction to cross the blood-brain barrier [147, 170] and ii) natural progesterone and its metabolites can be synthesized by cells of the CNS de novo, independently of peripheral steroidogenesis, making them potential neurosteroids [11, 49]. All synthetic progestins have in common the ability to reproduce the biological effect of natural progesterone by binding, at least in part, to the same receptors as the endogenous molecule. They are commonly used in the clinic and are derived either from testosterone (19-nortestosterone derivatives) or progesterone (17hydroxyprogesterone and 19-norprogesterone derivatives) (Figure 1). Each subgroup of derivatives contain several classes of progestin: the gonane and estrane classes belong to the 19-nortestosterone derivatives, and the pregnane and nor-pregnane classes belong to the 17- hydroxyprogesterone and 19-norprogesterone derivatives, respectively [196]. Beyond the progestogenic effects of all progestins, understanding of the biological activities of progestins requires extensive knowledge of the inherent characteristics of each compound. That includes knowledge of their chemical structure, metabolism, depending on the route of administration, pharmacodynamics, and bioavailability, depending on storage sites in the body and binding to serum proteins [193]. Natural progesterone, its metabolites, and progestins all have neuronal functions due to their binding to cognate intracellular and membrane receptors or receptors belonging to other neurotransmitters.

### 2.1. Genomic effect of natural progesterone, and progestins

Nuclear progesterone receptors (PR) mediate the genomic actions of natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins by transregulating the expression of genes containing a Progesterone Responsive Element (PRE) sequence in their promoter [37]. Upon ligand binding, the subsequent conformational changes of the receptors lead to chaperone protein dissociation [177, 178]. The ligand/receptor complex then dimerizes before being translocated into the nucleus, where it interacts with the PRE sequence of the target promoters [57, 129]. Within the CNS, natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins bind to the predominant isoforms PR-A and PR-B obtained using alternative promoters. In addition, PR-C, PR-S, and PR-T isoforms have also been identified (Figure 1) [37, 100]. Each isoform has distinct transcriptional activities of which the mechanisms have not been fully elucidated [37, 100]. PRs are found in brainstem structures involved in the central respiratory drive: the ventrolateral region of the medulla oblongata [115], nucleus of the solitary tract [94], hypoglossal nucleus [17, 115], locus coeruleus [96], and parabrachial nucleus [115]; in the diencephalon [67, 80, 116, 127], and in the telencephalon [80, 116]. Natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins can also act through nuclear receptors other than the PR: the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors (Figure 1) [193]. In addition, several synthetic progestin members of the 17-hydroxyprogesterone derivatives (megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate) and almost all 19-nortestosterone derivatives (estrane and gonane family) have been shown to have androgenic activity by binding to nuclear androgenic receptors with varying affinity [193].

### 2.2. Non-genomic effects of natural progesterone, its metabolites and synthetic progestins

Evidence has emerged that neuroactive steroids have modulatory effects on neuronal functions through a non-genomic pathway, as studies have shown their ability to initiate intracellular signaling pathways and the recruitment of second messengers in a time window from a few milliseconds to a second [25, 65, 132]. It is therefore unlikely that these effects

### **Current Neuropharmacology**

are due to conventional genomic mechanisms involving gene transcription and protein synthesis, which are relatively slow processes taking from several minutes to hours.

### 2.2.1. Membrane receptors of progesterone

Progesterone membrane receptors (mPR) contain seven transmembrane domains and belong to the adipoQ family [118, 210, 211]. The mPR family is composed of 11 members subdivided into three classes [208]. Only class II mPR, which has five members, are sensitive to progesterone [200]. mPRα, mPRβ, and mPRγ are coupled to an inhibitory G protein [155, 212, 239, 240], whereas mPRδ and mPRε, which have a higher affinity for progesterone, [104, 169, 200, 239] are coupled to a stimulatory G protein (**Figure 1**) [169]. The biological effects which result from the binding of progesterone to these receptors are yet to be determined [195]. Several studies have described the distribution of proteins and mRNAs encoding various isoforms within the CNS [146, 169, 241]. These receptors, expressed preferentially in neurons [146], are present in the spinal cord, brainstem, cerebellum, hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex [34, 125, 146, 169, 241]. mPRδ is, to date, the only member identified to be specific to the CNS [169].

Binding of natural progesterone to progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) is rapid, selective, and reversible [58, 148]. The functional relevance of this interaction has only just started to be elucidated and includes the activation of extracellular signal-related kinase pathways [149, 195]. Several studies have demonstrated the presence of mRNA encoding this single-transmembrane protein in brainstem and structures involved in respiratory control, such as the pre-Botzinger complex [207], the nucleus of the solitary tract, periaqueducal gray matter, and the caudal hypothalamus [104, 207].

The sigma type 1 receptor, initially misnamed as "opioid" receptor [203, 204], is located in the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane and translocates to the plasma membrane upon fixation of agonists or stressors [205]. Two subtypes have been described called the sigma 1 and sigma 2 receptors [97]. The sigma 1 receptor has been

 clones, whereas the sigma 2 receptor has not [88]. Moreover, it has been suggested that the sigma 2 receptor is the previously described PGRMC1; further studies are required to clarify its final identification [236]. Interactions have been experimentally demonstrated between the sigma 1 receptor and dopamine and muscarinic acetylcholine receptors [110, 205], as well as many endogenous ligands [145, 204, 205]; among them, natural progesterone is one of the most potent antagonists described [69, 110, 151, 204]. Natural progesterone binds competitively at the orthosteric site and is therefore considered to be an endogenous ligand [69, 110, 204]. Sigma 1 receptor mRNA and protein have been detected by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in the diencephalon, for instance in the hypothalamus, as well as in the brainstem: periaqueducal gray matter, locus coeruleus, hypoglossal nucleus, and medullary raphe nuclei [3, 120, 145]. The physiological significance of these interactions are still unknown and require further studies [195].

### 2.2.2. Membrane receptors to endogenous chemical compounds other than natural progesterone

There is now considerable evidence that natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins are allosteric modulators of ligand-gated ion channels belonging to the Cys-loop family: GABA<sub>A</sub>, nicotinic acetylcholine, glycine, and 5HT<sub>3</sub> receptors, as well as the glutamatergic ion channel receptors, the NMDA and kainate receptors (**Figure 1**). These receptors are all distributed throughout the CNS from the telencephalon to the spinal cord [23, 26, 27, 50, 53, 109, 134, 139, 142, 147, 158, 223].

The modulation of GABA<sub>A</sub> activity by natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins is well documented. The neuroactive steroid binding site, responsible for the modulation of GABA<sub>A</sub>, is located at the highly conserved transmembrane domain of the  $\alpha$  subunit [103]. Moreover, the positive and negative allosteric properties of natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins on GABA<sub>A</sub> depend on the chemical structure of the compound. Thus, dehydroepiandrosterone, which carries a cetone group at carbon C17, is a negative allosteric modulator of GABA<sub>A</sub> [114, 171] whereas  $3\alpha5\alpha$  tetrahydroprogesterone (allopregnanolone),  $3\alpha5\alpha$  tetrahydroprogesterone (pregnanolone),

### **Current Neuropharmacology**

and  $3\alpha5\alpha$  tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) are strong positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> due to a hydroxyl and acetyl group at C3 and C17, respectively [2, 171, 186]. Natural progesterone, 11-deoxycorticosterone, and 17-hydroxyprogesterone, which carry a cetone group at C3, are also positive, but weaker, allosteric modulators [171]. The influence of neuroactive steroids on neuronal excitability through the modulation of GABA<sub>A</sub> activity also depends on the subunit composition of GABA<sub>A</sub>. This determines whether it is sensitive or not to specific neuroactive steroids and its level of sensitivity [20, 78, 81, 144]. Expression of GABA<sub>A</sub> is ubiquitous in the CNS, whereas the expression of steroidogenic enzymes is region specific, suggesting that neurosteroid/GABA<sub>A</sub> interactions are highly selective and that neurosteroids may specifically interact with distinct pools of GABA<sub>A</sub> receptors [21, 147].

The established link between the chemical structure of neurosteroids and their effect on GABA<sub>A</sub> does not allow prediction of their effect on other ligand-gated ion channels of the Cys-loop family. Indeed, natural progesterone is a non-competitive negative allosteric modulator of the nicotinic acetylcholine receptor at micromolar concentrations [22, 39, 117, 215], as well as A-ring reduced metabolites of progesterone  $5\alpha$ -dihydroprogesterone and allopregnanolone [39, 140]. In contrast to GABA<sub>A</sub>, the composition of nicotinic acetylcholine subunits has less influence on neuroactive steroid-induced allosteric modulation, as natural progesterone induces a similar effect, regardless of the subunit composition [39, 215]. Experiments made with natural progesterone that was bound or not to albumin, a water-soluble compound that does not cross the plasma membrane, showed that both bound and unbound progesterone were able to exert negative allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptor activity, suggesting an extracellular site of action [117, 215].

Comparatively little is known about the influence of neuroactive steroids on glycine receptors. Wu *et al.* have shown that natural progesterone and two of its metabolites (11-deoxycorticosterone and 17-hydroxyprogesterone, which differ from natural progesterone by the presence of a hydroxyl group at C21 and at C17, respectively) act on glycine receptors as negative allosteric modulators [229]. 11-deoxycorticosterone has similar activity whereas

17-hydroxyprogesterone is less potent than natural progesterone. Allopregnanolone, which has a hydroxyl group at C3, has no effect, suggesting that the structure-activity requirements for steroid interactions are different for  $GABA_A$  and the glycine receptor.

Other studies have shown that neuroactive steroids can modulate cation flux through the ionotropic channel 5-HT<sub>3</sub> [9, 168, 227]. Natural progesterone [9, 168, 227], its metabolites allopreganolone [227] and THDOC [9], and the synthetic progestin cyproterone acetate [9], a member of pregnane family, can all exert negative allosteric modulation of the 5HT<sub>3</sub> receptor. The interaction between natural progesterone and the 5HT<sub>3</sub> receptor may occur at the receptor-membrane interface or at an extracellular site, as natural progesterone bound to the hydrophilic compound albumin exerts the same functional allosteric activity as free progesterone and it binds to membranes of HEK 293 cells expressing the 5-HT<sub>3</sub> receptor [227].

Many studies have examined the effect of pregnenolone sulfate and its analog pregnanolone sulfate on the glutamatergic ionotropic receptors, the NMDA and kainiate receptors [33, 36, 122, 172, 230]. Pregnenolone sulfate appears to positively and negatively modulate the NMDA and kainate receptor, respectively [33, 36, 122, 172, 230] and preganolone sulfate negatively modulates both receptors [172]. Only a few studies have shown an effect of neuroactive steroids derived from natural progesterone on NMDA and kainate receptors. Allopregnanolone slightly modulates NMDA currents [221] and induces increased release of neurotransmitters, which is blocked by specific NMDA antagonists [73]. Natural progesterone also rapidly and reversibly potentiates the kainate-induced current in a dose-dependent manner *via* interaction with an extracellular binding site [231]. Further studies are required to address the biological relevance of these effects.

2.2.3. G-protein-coupled receptors to endogenous chemical compounds other than natural progesterone

Page 11 of 47

### **Current Neuropharmacology**

In addition to the modulation of ligand-gated ion channels, steroids are also able to modulate the activity of G-protein-coupled receptors (GPCRs) for other chemical compounds. For example, progesterone can disrupt oxytocin receptor-mediated signaling [24, 32]. It was proposed that natural progesterone specifically interacts with recombinant rat oxytocin receptors expressed on CHO cells and acts as a negative allosteric modulator by reducing the binding capacity of the specific ligand without affecting binding affinity [75]. This prevents oxytocin induced inositol phosphate production and calcium mobilization. This effect was not altered when natural progesterone was bound to albumin, excluding the possibility of a cytoplasmic site of action. Progesterone-induced repression of binding capacity has been postulated to be i) receptor specific, since natural progesterone had no effect on the closely related human oxytocin receptor and a related GPCR, vasopressin 1a receptor, and ii) steroid specific, as the progesterone metabolite  $5\beta$ -dihydroprogesterone, which does not alter the binding capacity of rat oxytocin, negatively modulated the activity of the human oxytocin receptor [75]. This was the first study to highlight the existence of cross-talk between steroids and peptide-mediated signaling. Nevertheless, several observations do not support this assumption and it has been proposed that steroids have non-specific effects on oxytocin signaling [40, 72, 226]. Indeed, due to their structural properties, natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins are able to overload the plasma membrane, altering membrane fluidity and preventing the receptor from interacting with the G-protein [40, 226]. These regulatory mechanisms of progesterone shown in peripheral tissues probably occur in the CNS, where the oxytocin receptor is expressed [56, 79].

# **3.** FACILITATION OF THE CENTRAL RESPIRATORY DRIVE BY NATURAL PROGESTERONE AND SYNTHETIC PROGESTINS IN NON-PATHOLOGICAL SITUATIONS – MECHANISTIC APPROACHES

Studies have established that natural progesterone, its derivatives and synthetic progestins exert a stimulatory effect on the baseline respiratory drive as well as during gas challenges, even if the literature on humans is somewhat contradictory. In this section, we present the main essential elements which have already been extensively reviewed [19, 51, 113, 192].

### 3.1. The progesteronergic systems exert a stimulatory effect of the respiratory drive

Progesterone was first suggested to have a stimulatory effect on breathing in the early 1900s by Hasselbach *et al.* who reported a decrease in PaCO<sub>2</sub> during pregnancy, a physiological state in which plasma levels of progesterone are high [92, 93]. Later studies confirmed both the increase in baseline ventilation due to an effect on respiratory frequency [107] and hyperventilation and lower PaCO<sub>2</sub> during the luteal phase, when progesterone levels are higher than during the follicular phase [77, 121][143, 198]. Similarly, breathing changes related to reduced synthesis of female sexual hormones during menopause confirmed their stimulatory effect, as ventilation is lower and PaCO<sub>2</sub> higher in postmenopausal than premenopausal women [141, 179]. In addition, administration of synthetic progestin to healthy men leads to increased ventilation and decreased PaCO<sub>2</sub> [150, 197, 242].

The influence of natural progesterone on  $O_2$  and  $CO_2/H^4$  chemoreception has also been documented but the data for humans are contradictory. Women have been reported to have an increased response to hypoxia during the luteal phase, but no significant difference has been observed in response to hypercapnia between phases of the menstrual cycle [198, 228]. In addition, the analysis of breathing during a hyperoxic  $CO_2$  rebreathing procedure in pregnant women revealed a correlation between pregnancy and an increased chemoreflex to  $CO_2$ . Indeed, plasma progesterone levels negatively correlated with a decrease of the central chemoreflex ventilatory recruitment threshold for  $CO_2$ , and tended to be positively correlated with increased sensitivity of the chemoreflex to  $CO_2$  [107]. There is a gender effect for the respiratory response to hypoxia or hypercapnia than women [106, 228]. Some studies have shown a disappearance of this gender difference after corrections for height and body mass index [106], whereas it was maintained in others [1, 216]. This is unexpected because of the recognized stimulatory effect of progesterone that is found in women and minimal in men, and illustrate the

### **Current Neuropharmacology**

complexity of action of the progesterone on ventilation, for which the mechanisms are still poorly understood.

### 3.2. Progesteronergic systems stimulate respiration through genomic and non-genomic effects

The stimulatory effect of natural progesterone on the respiratory drive has been confirmed in animal studies that were also designed to decipher the mechanisms, including localization of the effect, and the genomic and/or non-genomic actions by which natural progesterone, its derivatives or synthetic progestins stimulate breathing. To date, progesteronergic systems are thought to stimulate the respiratory drive by both directly affecting neurons of the respiratory network, including the neurons of the respiratory rhythm generators, and indirectly affecting structures and/or chemical systems that modulate the respiratory generators or other neurons of the respiratory network [19, 51, 113, 192]. In particular, progesteronergic systems are thought to influence breathing by acting mainly on the medulla and hypothalamus and by interfering with the modulation of breathing by serotonin. Intravenous administration or microinjection of progesterone into the nucleus of the solitary tract, a structure of the respiratory network located in the dorsal medulla, of anaesthetized and chemodenervated cats led to facilitation of phrenic nerve activity in both sexes that was abolished by pretreatment with RU486, an PR antagonist [12, 13]. These observations led the authors to conclude that the effect of progesterone on breathing, mediated through this structure, depends on genomic mechanisms. However, progesterone exposure induced a rapid reversion of the hypoxic neuronal response in 2-3 minutes in ex vivo medullary slices containing the nucleus of the solitary tract, suggesting that non-genomic mechanisms independent of the PR are involved [173]. Thus, the influence of mPR on the baseline respiratory drive and its adaptation to gas challenges has been recently evaluated in mice [35]. Small interfering RNA against mPR, leading to lower expression of mPR in the nucleus of the solitary tract, were applied to female and male mice. The occurrence of apnea in normoxia increased, the hypoxic ventilatory response was abolished, and the hypercapnic ventilatory response decreased, irrespective of the sex of the animals. Thus, natural progesterone or its derivatives may participate in the control of baseline respiration and hypoxia

and hypercapnia chemoreflex loops via genomic and non-genomic mechanisms in the nucleus of the solitary tract. Another example of the action of natural progesterone on the medulla is its ability to stimulate hypoglossal motoneurons during long-term facilitation induced by serotonindependent intermittent hypoxia. Indeed, such long-term facilitation is enhanced during the diestrus phase, when the level of progesterone is high [238]. Published studies also suggest that the stimulatory effect of progesteronergic systems on breathing acts through the hypothalamus. The facilitating influence of natural progesterone is depressed in decerebrated cats, whereas it is maintained at a level similar to that in intact animals in decorticated cats in which the diencephalon is intact [12]. The authors of this study also reported that the increase in phrenic nerve activity following administration of natural progesterone was attenuated, but not abolished, in animals pretreated with anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, or actinomycin-D, an inhibitor of RNA synthesis in the hypothalamus. These data suggest that at least part of the stimulatory effect of progesterone on breathing depends on gene expression in the hypothalamus. To date, there is no direct evidence that natural progesterone stimulates breathing via non-genomic mechanisms in this region of the brain. However, this possibility is supported by the presence of mPRs in the hypothalamus [146, 169, 241]. Mechanistically, the action of progesterone may be similar to that of serotoninergic systems that are critically involved in the neural control of breathing [19, 99]. Indeed, the serotoninergic systems are sexually dimorphic at the level of respiratory motor nuclei, where fluctuating ovarian hormone levels are reflected by serotonin levels [19]. Similarly, exogenous administration of natural progesterone modifies the serotonin content in brain regions that influence the respiratory drive, such as the hypothalamus. Injection of natural progesterone leads to an increase in extracellular serotonin content in the hypothalamus [44], and mRNA levels of monoamine oxidase A, the enzyme involved in the catabolism of serotonin, decreases in the hypothalamus following the administration of natural progesterone [82].

In conclusion, progesteronergic systems facilitate breathing in healthy subjects by genomic and non-genomic mechanisms that include the modulation of neurotransmission systems, such

#### **Current Neuropharmacology**

as the serotoninergic systems. Finally, natural progesterone appears to influence breathing by its actions in the medullary and hypothalamic areas of the brain.

# 4. RECENT CLINICAL AND ANIMAL DATA SUGGEST THAT GONANES ENHANCE VENTILATION IN CCHS UNLIKE NATURAL PROGESTERONE, PREGNANES, OR ESTRANES

# 4.1. CCHS is the most highly documented CHS and is related to a mutation of the *PHOX2B* gene and characterized by a severe diminished $CO_2/H^+$ chemoreflex

CCHS is the subject of many active clinical and experimental studies, making it the most highly documented CHS. It is also called Ondine's curse syndrome in reference to the story of a water sprite from European lore who cursed her unfaithful lover to lose all autonomic functions and therefore stop breathing when he fell asleep [157]. It is a rare disorder, first described by Mellins and collaborators in 1970, with a very poor prognosis and high mortality during infancy. Children with CCHS typically present during the newborn period a documented failure of the autonomic control of breathing and various findings of autonomic nervous system dysfunction [184]. CCHS is diagnosed by hypoventilation linked to a severely diminished  $CO_2/H^+$  chemoreflex (increase in central respiratory drive caused by elevation of CO<sub>2</sub> levels) in the absence of perceived respiratory discomfort and primary pulmonary, cardiac, and neuromuscular disorders or brain lesions that may account for the entire phenotype. In the most severe forms, mortality is high during the early postnatal period and hypoventilation is present during both sleep and wakefulness [181]. It occurs throughout the world, with an estimated incidence of 1 per 200,000 live births in France [42, 68, 214]. It is related to a heterozygous mutation in the PHOX2B gene [5]. The PHOX2B gene mutation consists of a polyalanine repeat expansion (from 4 to 13) in 90% of cases and missense, nonsense, or frameshift mutations in the remaining 10%. Introduction of the most frequent PHOX2B gene mutation in mice results in the dysfunction of PHOX2B-positive neurons of a medullary region called the retrotrapezoid/parafacial respiratory group (RTN/pFRG), a pivotal group for CO<sub>2</sub> chemoreception [5, 54, 55, 83, 159, 160, 182]. The existence of the RTN/pFRG in humans has not been clearly established. However, based on

immunohistochemical studies [128, 161, 190], CCHS is considered to mostly, if not completely, result from a dysfunction of the PHOX2B-positive and  $CO_2/H^+$  sensing cells of the RTN/pFRG [181].

4.2. Recent clinical and animal data suggest that the gonane class of progestins may be of great clinical interest for treating CCHS patients

4.2.1. Recovery of CO<sub>2</sub> chemosensitivity in CCHS under desogestrel treatment

In the regular clinical follow-up of a CCHS patient from the French cohort [214], we were surprised to observe a respiratory response to CO<sub>2</sub> during a test using the rebreathing method [185, 202]. The patient was a 19-year-old woman carrying the five-alanine expansion mutation of the PHOX2B gene. She had been completely unresponsiveness to such stimulation since birth as illustrated in Figure 2A, obtained less than three years before the observation of a respiratory response to CO<sub>2</sub>. The patient exhibited a 2-3-fold increase in ventilation in two tests: breathing through a one-way valve in an open circuit of which the inspiratory arm was connected to a bag containing a 7% CO<sub>2</sub>-93% O<sub>2</sub> gas mixture and two days later with the rebreathing method (Figure 2A). Extensive questioning of the patient allowed the physicians to suggest that the use of a progestin, desogestrel (75 $\mu$ g daily) as a contraceptive may have been involved in this beneficial effect. We tested this hypothesis, by assessing the ventilatory response of another patient, a 30-year-old woman carrying the sixalanine expansion mutation of the PHOX2B gene, to hypercaphia after the initiation of contraceptive treatment with desogestrel (75µg daily). The absence of ventilatory and sensory responses to hypercapnia by the rebreathing method had been documented several times for the second patient, as for the first, before the administration of desogestrel. Three weeks after the beginning of desogestrel treatment, she displayed a respiratory response to CO<sub>2</sub>, with respiratory sensation and a marked anxiety that she had never experienced previously during such test. Given the known effect of natural progesterone on the central ventilatory drive, these observations led us to hypothesize that desogestrel, a progestin of the gonane group, was responsible for restoring the ventilatory response to CO<sub>2</sub>, despite the

### **Current Neuropharmacology**

absence of a known effect of natural progesterone or progestin from other molecular families in CCHS [19, 201]. However, shortly after this first study, another research group presented contradictory results. In this second clinical study, a unique patient, a 23-old-year woman carrying the seven-alanine expansion mutation of the PHOX2B gene, was deliberately treated for two weeks with 150 µg desogestrel and 30 µg ethinyl estradiol daily and did not display a recovery of CO<sub>2</sub> chemosensitivity [130]. These contradictory findings may be due to the complex nature of the actions of progestins on breathing control. As previously discussed, natural progesterone, its metabolites, and therefore synthetic progestins, are known to possess a wide range of targets within the CNS (Figure 1) [9, 75, 151, 194, 215, 222, 229, 232]. These contrary results may also be idiosyncratic. The action of desogestrel, or rather its metabolite 3-ketodesogestrel (etonogestrel), a synthetic progestin derived from testosterone and belonging to the gonane family [194, 196], may involve multiple pathways. Gonane progestins may exert their ventilatory effect, as natural progesterone and its derivatives (Figure 1), by acting on the hypothalamus or brainstem [12, 173] through both genomic [194] and non-genomic mechanisms [21, 169, 173, 186]. In such a scenario, the gonanes may be more potent than natural progesterone and other synthetic progestins, explaining why gonanes can have an effect on CCHS patients, whereas other drugs do not. Another possibility is that the gonanes exert a specific action, distinct from that of natural progesterone, its derivatives, or progestins other than gonane. In both cases, gonanes could activate or over-activate one or more central mechanisms controlling CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity outside of the main chemosensitive central site, the RTN/pFRG, which is dysfunctional in CCHS due to the PHOX2B mutation.

4.2.2. The desogestrel metabolite enhances the respiratory response to acidosis in presence of supramedullary areas

Extensive knowledge of the exact effect and modalities of action of desogestrel or its active metabolite, etonogestrel, on the central respiratory network is necessary for both evaluating the conditions under which these progestins could be used to treat CSH patients

and determining the origin of the responsiveness of the CCHS patients to these drugs. These considerations led to studies on ex vivo preparations of CNS from rodents [8], making it possible to focus on the actions of progestin that target the CNS. Ex vivo preparations of CNS tissue from newborn rodents is a classical model used in central respiratory drive studies (Figure 3). These preparations are minimally composed of the medulla oblongata and spinal cord (MS preparations). They contain the neuronal groups of the medulla oblongata, essential for the elaboration of the respiratory rhythm *i.e.* the respiratory generators [165, 199], as well as other groups involved in the modulation of the respiratory rhythm, such as raphe nuclei [41, 52, 101, 126, 180, 237]. The rhythmic activity recorded at the level of the fourth ventral cervical root of the spinal cord is recognized as respiratory-like activity since the seminal study of Suzue (Figure 3) [206]. This has led researchers to use this preparation for many years for both pharmacological and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> respiratory adaptation studies [8, 28, 29, 31, 38, 43, 47, 89, 112, 191, 218-220]. Using ex vivo preparations containing encephalic regions more rostral than the medulla oblongata, diencephalonbrainstem-spinal cord preparations (DBS), permits the study of the influence of these rostral encephalic regions on the central respiratory drive [163, 219]. We assessed the effect of desogestrel/etonogestrel by comparing the respiratory-like activity of MS and DBS preparations subjected to a metabolic acidosis challenge in the presence or absence of etonogestrel [135]. Metabolic acidosis is an experimental situation that models hypercapnia [71, 89]. In accordance with the literature, metabolic acidosis induced an increase in the frequency of the respiratory-like activity by approximately 30% in the absence of progestin (Figure 3) [71, 89, 90, 164]. Etonogestrel exposure increased the respiratory response to metabolic acidosis of DBS but not MS preparations. This led us to propose that the gonane progestin may at least partially compensate for the neuronal deficit in CCHS patients through a mechanism involving encephalic regions rostral to the medulla oblongata. These observations suggest that CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-activated cells of supramedullary regions, such as those of the locus coeruleus [111, 167, 176], the periaqueductal gray matter [123, 136], and the caudal hypothalamus [102, 174], all reported to be progesterone-sensitive [7, 108], may be

### **Current Neuropharmacology**

activated or over-activated by the gonane progestin. Further experiments are clearly necessary to identify the cell populations involved and characterize the etonogestrel-activated mechanisms at the cellular and molecular levels.

4.2.3. The beneficial effect of desogestrel extends beyond  $CO_2/H+$  chemosensitivity in baseline ventilation

Given the effects of natural progesterone and other progesteronergic drugs on basal ventilation, it seemed potentially informative to analyze the effects of these gonane progestins outside of a CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> challenge to explore other effects on respiratory control. We thus carried out a retrospective analysis of the data recorded during baseline ventilation in the two CCHS patients who had a respiratory response to  $CO_2$  under desogestrel [202]. The review of the dynamically collected data (before, during, and after desogestrel exposure) showed that the respiratory frequency was higher and PETCO<sub>2</sub> lower in the presence than absence of the progestin, whereas the tidal volume did not change (Figure 2B) [114]. This suggests that the ventilatory effect of desogestrel may extend beyond CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity. We thus carried out a translational study on mice to dissect the action of etonogestrel on the baseline respiratory drive. First, we established that the facilitatory effect of etonogestrel on the respiratory frequency observed in humans was also present in mice. Using whole body plethysmography [10], we observed an increase in basal respiratory frequency in mice induced by etonogestrel at a similar proportion to that observed in humans, at a concentration near that of human exposure, given its bioavailability [213] (Figure 4A) [114]. Using mouse ex vivo CNS preparations that contained only the medulla oblongata and the spinal cord (MS preparations, Figure 3), we showed that the medulla oblongata is sufficient for the observed increase in respiratory frequency induced by etonogestrel (Figure 4B) [114]. Moreover, etonogestrel did not induce changes in the amplitude of the respiratory-like activity, similar to our observations in CCHS patients (increased respiratory frequency with no change of  $V_T$ ). These observations suggest that the acceleration of the respiratory frequency by etonogestrel in CCHS patients, as well as in

 mice *in vivo*, may at least in part be mediated by medullary mechanisms. The RTN/pFRG, the medullary oscillator that is probably missing in CCHS patients because of the *PHOX2B* mutation [5, 54], did not seem to be involved in the accelerating effect of etonogestrel, as suggested by the absence of an increase in the number of cells positive for c-FOS, a marker of neuronal activity under etonogestrel exposure [114]. This histological observation in rodents is consistent with the increase in respiratory frequency observed in CCHS patient lacking *a priori* a functional RTN/pFRG.

4.2.4. The desogestrel metabolite modulates the  $GABA_A$  and NMDA regulation of the respiratory drive

We assumed that the action of etonogestrel depended, at least in part, on the interaction with membrane receptors, as reported for natural progesterone or its derivatives (Figure 1), because the acceleration of the respiratory frequency observed in mice in vivo and ex vivo was visible after a single acute application. We tested this hypothesis by using of ex vivo MS preparations to assess the influence of etonogestrel on the modulation of the respiratory-like frequency by the GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors, as both are involved in the modulation of the central respiratory drive [66, 76, 87] and are influenced by steroids [21, 122, 171]. First, blocking the GABA<sub>A</sub> receptors with bicuculline reduced the accelerating effect of etonogestrel at a low concentration (0.05  $\mu$ M) and suppressed it at higher a concentration (2 $\mu$ M; Figure **4C**) suggesting that part of the effect of etonogestrel may depend on the interaction of the progestin with GABA<sub>A</sub> receptors. These results are consistent with published data establishing steroid-dependent negative and/or positive allosteric modulation of GABA<sub>A</sub>, as indicated above [171, 186]. The differential effect of etonogestrel may be due to a concentration-dependent effect on several subunits of GABA<sub>A</sub> receptors. Indeed, the GABA<sub>A</sub>dependent response mediated by receptors containing  $\alpha_{1/3}$  subunits is enhanced by low steroid concentrations, whereas receptors composed of  $\alpha_{2/4/6}$  subunits require higher steroid concentrations [21]. The reduction or total suppression of the etonogestrel effect by bicuculline may depend on the overall efficiency of different types of GABA<sub>A</sub> receptors as  $\alpha_{1/3}$ 

### **Current Neuropharmacology**

and  $\alpha_{2/4}$  GABA<sub>A</sub> subunits are both present in medullary respiratory areas [131, 137]. In addition, in the presence of etonogestrel, a GABA<sub>A</sub> agonist, muscimol at IC<sub>50</sub>, induced a greater decrease in respiratory frequency than in its absence, suggesting that the gonane progestin positively modulates GABA<sub>A</sub> (**Figure 4D**). This was supported by the fact that gonanes such as etonogestrel are derived from testosterone (**Figure 1**), a positive modulator of GABA<sub>A</sub> [171] and that etonogestrel has a keto-group at C3, but not a negative charge shared by negative modulators of GABA<sub>A</sub> [171]. Concerning a possible interaction with the NMDA receptor, blocking of NMDA by the antagonist MK-801 completely suppressed the accelerating action of etonogestrel on respiratory frequency at low etonogestre in the presence of etonogestrel than in its absence. Both observations suggest that etonogestrel modulates the NMDA-mediated regulation of respiratory frequency.

4.2.5. The desogestrel metabolite increases the baseline respiratory drive by a medullary serotoninergic pathway

Taking into account several lines of evidence from the literature, it is plausible that the acceleration of the baseline respiratory drive by etonogestrel involves serotoninergic systems. Indeed, i) medullary serotoninergic neurons modulate the baseline central respiratory drive [98, 126, 152-154, 180], ii) part of the acceleration of the respiratory drive by natural progesterone depends on an interaction with serotoninergic systems [18, 59], and iii) medullary serotoninergic neurons are thought to be influenced by GABA/GABA<sub>A</sub> and NMDA signaling [14, 15, 70, 105, 133, 138]. Thus, we used a functional immunohistochemical approach to search for an eventual change of activity in the medullary *raphe* nuclei, *raphe pallidus* and *raphe obscurus*, two areas known to play a role in respiratory control [41, 45, 52]. Using c-FOS and dual c-FOS/serotonin immunohistochemical detection, we observed increased activity of cells in the caudal part of the *raphe pallidus* and *raphe obscurus* nuclei in the presence of etonogestrel (**Figure 5A**), with many of the c-FOS-positive cells also positive for serotonin (**Figure 5A**) [114]. In addition, blockade of the serotoninergic

modulation of the respiratory drive by methysergide, a 5-HT<sub>1,2,7</sub> receptor antagonist [30, 43, 152, 166], completely suppressed the accelerating effect of etonogestrel on the respiratorylike frequency in MS preparations (**Figure 5B**) [114]. These convergent results suggest the existence of a new interaction pathway between progesteronergic and serotoninergic systems, as the effects of steroids on the release of serotonin depends on supramedullary regions [59, 189]. The gonane-serotonin medullary interaction that affects the respiratory drive is likely specific to this progestin family.

### 5. CONCLUSION

In conclusion, among progesteronergic drugs, gonanes, such as desogestrel or its active metabolite etonogestrel, are of great potential interest in the context of CHS neurorespiratory pathologies. Gonane progestins can increase the respiratory drive at baseline. They also seem able to restore the respiratory response to CO<sub>2</sub> in CCHS patients who lack this chemosensitivity. Animal studies suggest that acceleration of the baseline respiratory drive by gonane progestins is related, at least in part, to a medullary serotoninergic pathway and that the recovery of the CO<sub>2</sub> chemoreflex depends on supramedullary action(s). The mechanisms likely involve the interaction of gonane with GABA<sub>A</sub> and NMDA membrane receptors. Further experiments are necessary to completely understand the central actions of these progestins, in particular regarding the complexity of the action of progesteronergic drugs in the context of patients who respond [202] or not [130] to the gonane.

 List of abbreviations

### **FIGURE LEGENDS**

### FIGURE 1

### Natural progesterone, progesterone derivatives, and families of synthetic progestin and their genomic and non-genomic modes of action within the CNS

The upper part of the figure shows the chemical structures of natural progesterone, its derivatives, and synthetic progestins. The enzymes required for the biosynthesis of natural progesterone and its derivatives are indicated. The two members of the gonane family, desogestrel and etonogestrel, which are the focus of this review, are highlighted by a gray rectangle. The lower part of the figure shows the receptors targeted by neuroactive steroids and synthetic progestins. The left-hand side shows the cognate nuclear and membrane receptors of progesterone that mediate their genomic and non-genomic effects, respectively. The right-hand side shows the receptors which belong to other neurotransmitter systems that are targets of neuroactive steroids and synthetic progestins. For nuclear receptors, the canonical mature mRNA is represented with its 5' and 3' untranslated regions. The scheme of the canonical mature mRNA is composed of boxes containing numbers which correspond to the exon from which they were transcribed. The various protein isoforms translated from the mature mRNA are represented with their functional domains located just below the representation of the mature mRNA. For the nuclear progesterone receptor isoforms PR-S and PR-T, boxes S and T represent nucleotide sequences that are translated from intronicexons not represented in the canonical mature mRNA. Abbreviations: steroid 17-alphahydroxylase/17,20 lyase precursor (P450c17), untranslated region (UTR), activation function (AF), inhibition factor (IF), DNA binding domain (DBD), nuclear location signal (h), ligand binding domain (LBD), intronic-exons (T and S), N-terminal domain (NTD), nuclear progesterone receptor (PR), nuclear glucocorticoid receptor (GR), nuclear mineralocorticoid receptor (MR), nuclear androgen receptor (AR).

### FIGURE 2

### Consequences of desogestrel exposure on the ventilation of a CCHS patient

(A) Ventilatory response of a CCHS patient during a  $CO_2$  rebreathing test [202]. The left panel shows the change in ventilation (V<sub>E</sub>) with the increase in end tidal  $CO_2$  partial pressure assessed before desogestrel exposure. The right panel shows the same assessment after approximately 18 months of treatment with desogestrel. *Reprinted from Respiratory Physiology & Neurobiology, 171(2), C Straus, H Trang,M-H Becquemin, P Touraine, T Similowski, Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel, 171-174, Copyright (2010), with permission from Elsevier.* 

**(B)** Box plot showing the median breath-by-breath respiratory frequency and median breathby breath end tidal CO<sub>2</sub> partial pressure of the CCHS patient at baseline [114].  $\dagger$  indicates a significant difference between before and after desogestrel treatment and during desogestrel exposure. One-way ANOVA – post hoc Bonferroni correction. <sup>††</sup>p < 0.01, <sup>†††</sup>p < 0.001. *Abbreviation:* desogestrel (DSG). *Reprinted from Neuropharmacology, 107, F Joubert, A-S Perrin-Terrin, E Verkaeren, P Cardot, M-N Fiamma, A Frugière, I Rivals, T Similowski, C Straus, L Bodineau, Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotoninergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.* 

FIGURE 3:

## *Ex vivo* CNS preparations in an electrophysiological recording chamber and the effect of etonogestrel on respiratory frequency under conditions of metabolic acidosis on these preparations

(A) Schematic representation of an *ex vivo* preparation of the CNS from a newborn rodent placed in an electrophysiological recording chamber. After the surgical procedure, *ex vivo* preparations were placed in a recording chamber and superfused either with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) corresponding to normal pH (pH 7.4 aCSF: 129.0 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1.15 mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.58 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 21.0 mM

### **Current Neuropharmacology**

NaHCO<sub>3</sub>, 30.0 mM D-glucose) or metabolic acidosis (pH 7.23 aCSF: 129.0 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1.15 mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.58 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 15.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 30.0 mM D-glucose), both saturated with O<sub>2</sub> and adjusted to pH by bubbling with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Pharmacological agents can be added to aCSF according to the experimental conditions. The illustrated *ex vivo* preparation contains the medulla oblongata and supramedullary regions up to the diencephalon. Dotted lines show the levels of transection: the rostral extremity for diencephalon-brainstem-spinal cord (DBS) preparations (1) and medullary-spinal cord (MS) preparations (2) and the caudal extremity for both MS and DBS preparations (3). A typical electrophysiological respiratory-like activity recording at the level of ventral C4 and its integration is presented to the right.

(B) Experimental protocol performed to test the effect of etonogestrel on CNS preparation from newborn rat under conditions of metabolic acidosis [135]. After a stabilization period (30 min superfused with normal pH aCSF without drug), preparations were pre-incubated 15 min either with etonogestrel (1 µM) or dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.01%, the solvent for etonogestrel) *i.e* pre-metabolic acidosis period, before being superfused for 30 min with metabolic acidosis aCSF containing the same drugs *i.e.* metabolic acidosis period. Premetabolic acidosis and metabolic acidosis values were defined as the mean calculated over the last 5 min of the pre-metabolic acidosis and metabolic acidosis periods, respectively. The scatter plot shows the percentage change in respiratory frequency ( $f_{\rm R}$ ) between respective pre-metabolic acidosis and metabolic acidosis values obtained in MS and DBS preparations exposed to DMSO (dark gray circles) or etonogestrel (light gray circles). All values are expressed as the mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni correction were performed. Differences were considered to significant for p < 0.05. # significant increase in mean f<sub>R</sub> compared to control values; \* significant difference between etonogestrel and DMSO exposures. # p < 0.05, ### p < 0.001, \*\*\* p < 0.001, n.s.: nonsignificant. Abbreviations: artificial cerebrospinal fluid (aCSF); integrated activity of the C4 ventral nerve root ([C4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (C4); dimethyl sulfoxide (DMSO); etonogestrel (ETO); respiratory frequency ( $f_R$ ), medullary-spinal cord (MS);

diencephalon-brainstem-spinal cord (DBS). Adapted from [135]. *Reprinted from Neuroscience Letters, 567, C Loiseau, D Osinski, F Joubert, C Straus, T Similowski, L Bodineau, The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures, 63-67, Copyright (2014), with permission from Elsevier.* 

### FIGURE 4

### *Effect of etonogestrel on baseline respiratory frequency on in vivo newborn mice and ex vivo medullary-spinal cord preparations. Implication of* GABA<sub>A</sub>*-receptors*

(A) Effect of etonogestrel on baseline respiratory frequency ( $f_R$ ) on *in vivo* newborn mice. Newborn mice received *per os* either etonogestrel (ETO; 10<sup>-3</sup> mg/kg; concentration equivalent to that of t human exposure) dissolved in oil or oil alone. The  $f_R$  was recorded by whole body plethysmography. Traces illustrate ventilation after oil or etonogestrel exposure. The scatter plot shows the baseline  $f_R$  obtained after oil (dark gray circles) or etonogestrel (light gray circles) exposure.

(B) Effect of etonogestrel on  $f_R$  of *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were exposed to etonogestrel (0.05, 0.5, 1, or 2  $\mu$ M) or dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.01%, etonogestrel solvent). The respiratory-like activity was recorded at the level of the fourth cervical ventral root (**Figure 1**). The scatter plot shows the percentage change of the mean  $f_R$  during DMSO (dark gray circles) or etonogestrel (light gray circles) exposure.

(C) Effect of etonogestrel under conditions of GABA<sub>A</sub> receptor blockade on *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were pre-incubated with bicuculline (GABA<sub>A</sub> antagonist) before etonogestrel exposure. The scatter plot shows the percentage change of the  $f_R$  during etonogestrel exposure (0.05  $\mu$ M and 2  $\mu$ M) in the absence and presence of 3  $\mu$ M bicuculline (a concentration previously shown to be sufficient to block the effect of GABA on GABA<sub>A</sub>-mediated regulation of respiration [186].

(D) Effect of etonogestrel on GABA<sub>A</sub> modulation of *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were first exposed to etonogestrel (0.05  $\mu$ M and 2  $\mu$ M) or DMSO

### **Current Neuropharmacology**

(0.01%) and then DMSO/muscimol (0.14  $\mu$ M; EC<sub>50</sub>, as determined in [114]) or etonogestrel/muscimol (0.14  $\mu$ M). The scatter plot shows the percentage change of the f<sub>R</sub> during DMSO/muscimol (dark gray circles) or etonogestrel /muscimol (light gray circles) exposure.

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The student t-test or two-way ANOVA, followed by post hoc Bonferroni correction were performed as appropriate. Differences were considered to be significant for p < 0.05. # significant increase in mean f<sub>R</sub> relative to pre-DMSO and pre- etonogestrel values as appropriate; \* significant difference between etonogestrel and DMSO or oil exposures or between the absence and presence of bicuculline. ## p < 0.01, ### p < 0.001, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, n.s.: non-significant. *Abbreviations*: bicuculline (BIC); dimethyl sulfoxide (DMSO); etonogestrel (ETO); respiratory frequency (f<sub>R</sub>); muscimol (MUS). Adapted from [114]. *Reprinted from Neuropharmacology, 107, F Joubert, A-S Perrin-Terrin, E Verkaeren, P Cardot, M-N Fiamma, A Frugière, I Rivals, T Similowski, C Straus, L Bodineau, Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotoninergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.* 

### FIGURE 5

### The effect of etonogestrel on respiration implies the medullary serotoninergic systems

(A) Effect of etonogestrel on *c-fos* expression in medullary respiratory structures containing serotoninergic neurons. On the left, gray photomicrographs illustrate c-FOS immunoreactivity in the caudal parts of the pallidus and obscurus raphe nuclei after dimethyl sulfoxide (DMSO) or etonogestrel exposure. Scale bar: 100  $\mu$ m. On the right, photomicrographs illustrate the serotoninergic character of c-FOS-immunoreactive cells in these two structures. Scale bars: 100  $\mu$ m

**(B)** Effect of etonogestrel under conditions of blockade of serotoninergic respiratory influence on *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were first exposed to methysergide (a 5-HT<sub>1/2/7</sub> receptor antagonist; 5  $\mu$ M, the lowest concentration that completely

https://mc04.manuscriptcentral.com/crn

antagonizes the effect of 5-HT, as determined in [114]) and then etonogestrel (0.05  $\mu$ M). The scatter plot shows the percentage change of the f<sub>R</sub> during etonogestrel exposure in the absence or presence of methysergide.

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The Kruskal-Wallis test was performed. Differences were considered to be significant for p < 0.05. # significant increase in mean f<sub>R</sub> relative to pre-ETO values; \* significant difference between the presence and absence of methysergide. ### p < 0.001, \*\*\* p < 0.001, n.s.: non-significant. *Abbreviations:* etonogestrel (ETO); inferior olives (IO); respiratory frequency (f<sub>R</sub>); methysergide (MET). Adapted from [114]. *Reprinted from Neuropharmacology, 107, F Joubert, A-S Perrin-Terrin, E Verkaeren, P Cardot, M-N Fiamma, A Frugière, I Rivals, T Similowski, C Straus, L Bodineau, Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotoninergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.* 

LIST OF ABBREVIATIONS	LIST	OF A	Авв	REV	ATI	ONS
-----------------------	------	------	-----	-----	-----	-----

- 5-HT, serotonin
- CCHS, Congenital Central alveolar Hypoventilation Syndrome
- CHS, Central alveolar hypoventilation syndromes
- CNS, central nervous system
- DBS, diencephalon-brainstem-spinal cord preparations
- DSG, desogestrel
- ETO, etonogestrel
- GABA,
- GABA<sub>A</sub>,
- mPR, progesterone membrane receptor
- MS, medullary-spinal cord preparations
- NMDA,
- PGRMC1, progesterone receptor membrane component 1
- PR, nuclear progesterone receptors
- PRE, progesterone responsive element
- RTN/pFRG, retrotrapezoid/parafacial respiratory group

### REFERENCES

[1] Aitken, M.L.; Franklin, J.L.; Pierson, D.J.; Schoene, R.B. Influence of body size and gender on control of ventilation. *J Appl Physiol (1985)*, **1986**, *60*(6), 1894-1899.

[2] Akhondzadeh, S.; Stone, T.W. Potentiation by neurosteroids of muscimol/adenosine interactions in rat hippocampus. *Brain Res*, **1995**, 677(2), 311-318.

[3] Alonso, G.; Phan, V.; Guillemain, I.; Saunier, M.; Legrand, A.; Anoal, M.; Maurice, T. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, **2000**, *97*(1), 155-170.

[4] Amiel, J.; Dubreuil, V.; Ramanantsoa, N.; Fortin, G.; Gallego, J.; Brunet, J.F.; Goridis, C. PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. *Respir.Physiol Neurobiol.*, **2009**, *168*(1-2), 125-132.

[5] Amiel, J.; Laudier, B.; ttie-Bitach, T.; Trang, H.; de, P.L.; Gener, B.; Trochet, D.; Etchevers, H.; Ray, P.; Simonneau, M.; Vekemans, M.; Munnich, A.; Gaultier, C.; Lyonnet, S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat. Genet.*, **2003**, *33*(4), 459-461.

[6] Anderson, T.M.; Garcia, A.J., 3rd; Baertsch, N.A.; Pollak, J.; Bloom, J.C.; Wei, A.D.; Rai, K.G.; Ramirez, J.M. A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature*, **2016**, *536*(7614), 76-80.

[7] Arbogast, L.A.; Voogt, J.L. Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*, **2002**, *75*(5), 273-281.

[8] Ballanyi, K. Neuromodulation of the perinatal respiratory network *Current Neuropharmacology*, **2004**, *2*, 221-243

[9] Barann, M.; Gothert, M.; Bruss, M.; Bonisch, H. Inhibition by steroids of [14C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT3 receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **1999**, *360*(3), 234-241.

[10] Bartlett, D.; Tenney, S.M. Control of breathing in experimental anemia. *Respir.Physiol*, **1970**, *10*(3), 384-395.

[11] Baulieu, E.E. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell*, **1991**, *71*(1-2), 3-10.

[12] Bayliss, D.A.; Cidlowski, J.A.; Millhorn, D.E. The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. *Endocrinology*, **1990**, *126*(1), 519-527.

[13] Bayliss, D.A.; Millhorn, D.E.; Gallman, E.A.; Cidlowski, J.A. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **1987**, *84*(21), 7788-7792.

[14] Becquet, D.; Hery, M.; Deprez, P.; Faudon, M.; Fache, M.P.; Giraud, P.; Hery, F. N-methyl-D-aspartic acid/glycine interactions on the control of 5-hydroxytryptamine release in raphe primary cultures. *J Neurochem*, **1993**, *61*(5), 1692-1697.

[15] Becquet, D.; Hery, M.; Francois-Bellan, A.M.; Giraud, P.; Deprez, P.; Faudon, M.; Fache, M.P.; Hery, F. Glutamate, GABA, glycine and taurine modulate serotonin synthesis and release in rostral and caudal rhombencephalic raphe cells in primary cultures. *Neurochem Int*, **1993**, *23*(3), 269-283.

[16] Behan, M.; Kinkead, R. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Compr Physiol*, **2011**, *1*(4), 2101-2139.

[17] Behan, M.; Thomas, C.F. Sex hormone receptors are expressed in identified respiratory motoneurons in male and female rats. *Neuroscience*, **2005**, *130*(3), 725-734.

[18] Behan, M.; Wenninger, J.M. Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol*, **2008**, *164*(1-2), 213-221.

[19] Behan, M.; Zabka, A.G.; Thomas, C.F.; Mitchell, G.S. Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir.Physiol Neurobiol.*, **2003**, *136*(2-3), 249-263.

2 Belelli, D.; Casula, A.; Ling, A.; Lambert, J.J. The influence of subunit composition on [20] 3 the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. Neuropharmacology, 2002, 43(4), 4 651-661. 5 6 [21] Belelli, D.; Lambert, J.J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) 7 receptor. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(7), 565-575. Bertrand, D.; Valera, S.; Bertrand, S.; Ballivet, M.; Rungger, D. Steroids inhibit 8 [22] nicotinic acetylcholine receptors. Neuroreport, 1991, 2(5), 277-280. 9 10 Betz, H.; Laube, B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization [23] and functional diversity. J Neurochem, 2006, 97(6), 1600-1610. 11 12 [24] Bishop, C.V.; Stormshak, F. Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-13 induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F2alpha secretion in the ovine 14 endometrium. Endocrinology, 2006, 147(2), 937-942. 15 Blackmore, P.F.; Neulen, J.; Lattanzio, F.; Beebe, S.J. Cell surface-binding sites for [25] 16 progesterone mediate calcium uptake in human sperm. J Biol Chem, 1991, 266(28), 18655-17 18659. 18 [26] Bleakman, D. Kainate receptor pharmacology and physiology. Cell Mol Life Sci, 1999, 19 56(7-8), 558-566. 20 Bloom, F.E.; Morales, M. The central 5-HT3 receptor in CNS disorders. Neurochem [27] 21 Res, 1998, 23(5), 653-659. 22 [28] Bodineau, L.; Cavetanot, F.; Frugiere, A. Possible role of retrotrapezoid nucleus and 23 parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an in vitro study in neonatal rat. 24 Neurosci Lett., 2000, 295(1-2), 67-69. 25 Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Frugiere, A. Fos study of ponto-medullary areas involved [29] 26 in the in vitro hypoxic respiratory depression. Neuroreport, 2001, 12(18), 3913-3916. 27 Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Marlot, D.; Collin, T.; Gros, F.; Frugiere, A. Endogenous [30] 28 5-HT(1/2) systems and the newborn rat respiratory control. A comparative in vivo and in vitro 29 study. Respir. Physiol Neurobiol., 2004, 141(1), 47-57. 30 Bodineau, L.; Cavetanot, F.; Sadani-Makki, F.; Bach, V.; Gros, F.; Lebleu, A.; Collin, [31] 31 T.; Frugiere, A. Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in 32 normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on 33 brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. Pediatr.Res., 2003, 53(2), 34 266-273. 35 [32] Bogacki, M.; Silvia, W.J.; Rekawiecki, R.; Kotwica, J. Direct inhibitory effect of 36 progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F(2alpha) from bovine 37 endometrial tissue. Biol Reprod, 2002, 67(1), 184-188. 38 Borovska, J.; Vyklicky, V.; Stastna, E.; Kapras, V.; Slavikova, B.; Horak, M.; [33] 39 Chodounska, H.; Vyklicky, L., Jr. Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. Br 40 J Pharmacol, 2012, 166(3), 1069-1083. 41 Boukari, R.; Marcouiller, F.; Joseph, V. Relative Contribution of Nuclear and [34] 42 Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. Adv Exp Med Biol, 2015, 860, 43 261-267. 44 Boukari, R.; Rossignol, O.; Baldy, C.; Marcouiller, F.; Bairam, A.; Joseph, V. [35] 45 Membrane progesterone receptor-beta, but not -alpha, in dorsal brain stem establishes sex-46 specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. J Appl Physiol 47 (1985), **2016**, 121(3), 781-791. 48 Bowlby, M.R. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor [36] 49 channels in hippocampal neurons. Mol Pharmacol, 1993, 43(5), 813-819. 50 [37] Brinton, R.D.; Thompson, R.F.; Foy, M.R.; Baudry, M.; Wang, J.; Finch, C.E.; Morgan, 51 T.E.; Pike, C.J.; Mack, W.J.; Stanczyk, F.Z.; Nilsen, J. Progesterone receptors: form and 52 function in brain. Front Neuroendocrinol, 2008, 29(2), 313-339. 53 [38] Brockhaus, J.; Ballanyi, K.; Smith, J.C.; Richter, D.W. Microenvironment of respiratory 54 neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. J Physiol, 1993, 462, 421-445. 55 Bullock, A.E.; Clark, A.L.; Grady, S.R.; Robinson, S.F.; Slobe, B.S.; Marks, M.J.; [39] 56 Collins, A.C. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and 57 thalamic synaptosomes. J Neurochem, 1997, 68(6), 2412-2423. 58 59 60

Current Neuropharmacology

Burger, K.; Fahrenholz, F.; Gimpl, G. Non-genomic effects of progesterone on the [40] signaling function of G protein-coupled receptors. FEBS Lett, 1999, 464(1-2), 25-29. Cao, Y.; Matsuyama, K.; Fujito, Y.; Aoki, M. Involvement of medullary GABAergic and [41] serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. Neurosci Res, 2006, 56(3), 322-331. Carroll, M.S.; Patwari, P.P.; Weese-Mayer, D.E. Carbon dioxide chemoreception and [42] hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. J.Appl. Physiol, 2010, 108(4), 979-988. Cavetanot, F.; Bodineau, L.; Frugiere, A. 5-HT acting on 5-HT(1/2) receptors does not [43] participate in the in vitro hypoxic respiratory depression. Neurosci Res., 2001, 41(1), 71-78. [44] Centeno, M.L.; Reddy, A.P.; Smith, L.J.; Sanchez, R.L.; Henderson, J.A.; Salli, N.C.; Hess, D.J.; Pau, F.K.; Bethea, C.L. Serotonin in microdialysate from the mediobasal hypothalamus increases after progesterone administration to estrogen primed macagues. Eur J Pharmacol, 2007, 555(1), 67-75. Cerpa, V.J.; Aylwin Mde, L.; Beltran-Castillo, S.; Bravo, E.U.; Llona, I.R.; Richerson, [45] G.B.; Eugenin, J.L. The Alteration of Neonatal Raphe Neurons by Prenatal-Perinatal Nicotine. Meaning for Sudden Infant Death Syndrome. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 53(4), 489-499. [46] Cielo, C.; Marcus, C.L. Central Hypoventilation Syndromes. Sleep Med Clin, 2014, 9(1), 105-118. Clarac, F.; Pearlstein, E.; Pflieger, J.F.; Vinay, L. The in vitro neonatal rat spinal cord [47] preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2004, 190(5), 343-357. Collop, N.A. Medroxyprogesterone acetate and ethanol-induced exacerbation of [48] obstructive sleep apnea. Chest, 1994, 106(3), 792-799. Compagnone, N.A.: Mellon, S.H. Neurosteroids: biosynthesis and function of these [49] novel neuromodulators. Front Neuroendocrinol, 2000, 21(1), 1-56. Conti, F.; Minelli, A.; DeBiasi, S.; Melone, M. Neuronal and glial localization of NMDA [50] receptors in the cerebral cortex. Mol Neurobiol, 1997, 14(1-2), 1-18. Dempsey, J.A.O., E.B.; Skatrud, J.B. Hormones and neurochemicals in the regulation [51] of breathing. In: Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Control of Breathing, Part 1, Cherniack, N.S., Widdicombe, J.G., Ed.; American Physiological Society: Washington, DC; 1986; Vol. vol. II, pp. pp. 181-221. [52] Depuy, S.D.; Kanbar, R.; Coates, M.B.; Stornetta, R.L.; Guyenet, P.G. Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. J Neurosci, 2011, 31(6), 1981-1990. Deutch, A.Y.; Holliday, J.; Roth, R.H.; Chun, L.L.; Hawrot, E. Immunohistochemical [53] localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A, **1987**, 84(23), 8697-8701. Dubreuil, V.; Ramanantsoa, N.; Trochet, D.; Vaubourg, V.; Amiel, J.; Gallego, J.; [54] Brunet, J.F.; Goridis, C. A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2008, 105(3), 1067-1072. Dubreuil, V.; Thoby-Brisson, M.; Rallu, M.; Persson, K.; Pattyn, A.; Birchmeier, C.; [55] Brunet, J.F.; Fortin, G.; Goridis, C. Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. J Neurosci., 2009, 29(47), 14836-14846. [56] Dumais, K.M.; Veenema, A.H. Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. Front Neuroendocrinol, **2016**, *40*, 1-23. [57] Edwards, D.P.; DeMarzo, A.M.; Onate, S.A.; Beck, C.A.; Estes, P.A.; Nordeen, S.K. Mechanisms controlling steroid receptor binding to specific DNA sequences. Steroids, 1991, 56(5), 271-278.

59 60

1 2

3

3

4

5 6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

Falkenstein, E.; Meyer, C.; Eisen, C.; Scriba, P.C.; Wehling, M. Full-length cDNA [58] sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 229(1), 86-89. [59] Farmer, C.J.; Isakson, T.R.; Coy, D.J.; Renner, K.J. In vivo evidence for progesterone dependent decreases in serotonin release in the hypothalamus and midbrain central grey: relation to the induction of lordosis. Brain Res., 1996, 711(1-2), 84-92. Feldman, J.L.; Del Negro, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on [60] respiratory rhythm. Nat. Rev. Neurosci., 2006, 7(3), 232-241. Feldman, J.L.; Del Negro, C.A.; Gray, P.A. Understanding the rhythm of breathing: so [61] near, yet so far. Annu Rev Physiol, 2013, 75, 423-452. [62] Feldman, J.L.; Kam, K. Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: taking a few breaths may help. J Physiol, 2015, 593(1), 3-23. Fiamma, M.N.; Samara, Z.; Baconnier, P.; Similowski, T.; Straus, C. Respiratory [63] inductive plethysmography to assess respiratory variability and complexity in humans. Respir Physiol Neurobiol, 2007, 156(2), 234-239. Fiamma, M.N.: Straus, C.: Thibault, S.: Wysocki, M.: Baconnier, P.: Similowski, T. [64] Effects of hypercapnia and hypocapnia on ventilatory variability and the chaotic dynamics of ventilatory flow in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(5), R1985-1993. Filardo, E.J.; Quinn, J.A.; Bland, K.I.; Frackelton, A.R., Jr. Estrogen-induced activation [65] of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol, 2000, 14(10), 1649-1660. Funk, G.D.; Johnson, S.M.; Smith, J.C.; Dong, X.W.; Lai, J.; Feldman, J.L. Functional [66] respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. J Neurophysiol. 1997, 78(3), 1414-1420. Furuta, M.; Fukushima, A.; Chiba, S.; Sano, A.; Akema, T.; Kimura, F.; Funabashi, T. [67] Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. Neuroreport, 2010, 21(11), 777-781. Gallego, J. Genetic diseases: congenital central hypoventilation, Rett, and Prader-[68] Willi syndromes. Compr Physiol, 2012, 2(3), 2255-2279. Ganapathy, M.E.; Prasad, P.D.; Huang, W.; Seth, P.; Leibach, F.H.; Ganapathy, V. [69] Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 289(1), 251-260. Gao, B.; Fritschy, J.M.; Benke, D.; Mohler, H. Neuron-specific expression of GABAA-[70] receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. Neuroscience, 1993, 54(4), 881-892. Gestreau, C.; Heitzmann, D.; Thomas, J.; Dubreuil, V.; Bandulik, S.; Reichold, M.; [71] Bendahhou, S.; Pierson, P.; Sterner, C.; Peyronnet-Roux, J.; Benfriha, C.; Tegtmeier, I.; Ehnes, H.; Georgieff, M.; Lesage, F.; Brunet, J.F.; Goridis, C.; Warth, R.; Barhanin, J. Task2 channels central respiratory CO2 potassium set and 02 sensitivity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2010, 107(5), 2325-2330. Gimpl, G.; Wiegand, V.; Burger, K.; Fahrenholz, F. Cholesterol and steroid hormones: [72] modulators of oxytocin receptor function. Prog Brain Res, 2002, 139, 43-55. Giuliani, F.A.; Yunes, R.; Mohn, C.E.; Laconi, M.; Rettori, V.; Cabrera, R. [73] Allopregnanolone induces LHRH and glutamate release through NMDA receptor modulation. Endocrine, 2011, 40(1), 21-26. [74] Gozal, D. Congenital central hypoventilation syndrome: an update. Pediatr.Pulmonol., **1998**, 26(4), 273-282. Grazzini, E.; Guillon, G.; Mouillac, B.; Zingg, H.H. Inhibition of oxytocin receptor [75] function by direct binding of progesterone. Nature, 1998, 392(6675), 509-512. Greer, J.J.; Smith, J.C.; Feldman, J.L. Role of excitatory amino acids in the [76] generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. J Physiol, 1991, 437, 727-749.
Griffith, F.R.P., G.W.;Brownell,K.A.;Klein,J.D.;Carmer,M.E. Studies [77] in huan physiology, alveolar air and blood gas capacity. Am.J. Physiol, **1929**, 89, 449-470. [78] Griffiths, J.; Lovick, T. Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periagueductal gray matter in female Wistar rats. J Comp Neurol, 2005, 486(1), 89-97. Grinevich, V.; Knobloch-Bollmann, H.S.; Eliava, M.; Busnelli, M.; Chini, B. Assembling [79] the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. Biol Psychiatry, 2016, 79(3), 155-164. Guerra-Araiza, C.; Reyna-Neyra, A.; Salazar, A.M.; Cerbon, M.A.; Morimoto, S.; [80] Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. Brain Res Bull, 2001, 54(1), 13-17. Gulinello, M.; Gong, Q.H.; Li, X.; Smith, S.S. Short-term exposure to a neuroactive [81] steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. Brain Res, 2001, 910(1-2), 55-66. Gundlah, C.; Lu, N.Z.; Bethea, C.L. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-[82] A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. Psychopharmacology (Berl), 2002, 160(3), 271-282. Guyenet, P.G. Novel two-rhythm generator theory of breathing in mammals. J [83] Physiol, 2005. Guyenet, P.G.; Bayliss, D.A. Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. [84] Neuron, 2015, 87(5), 946-961. Guyenet, P.G.; Stornetta, R.L.; Bayliss, D.A.; Mulkey, D.K. Retrotrapezoid nucleus: a [85] litmus test for the identification of central chemoreceptors. Experimental Physiology, 2005, 90(3), 247-253, Haddad, G.G.; Mazza, N.M.; Defendini, R.; Blanc, W.A.; Driscoll, J.M.; Epstein, M.A.; [86] Epstein, R.A.; Mellins, R.B. Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. Medicine (Baltimore), 1978, 57(6), 517-526. Haji, A.; Takeda, R.; Okazaki, M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm [87] and pattern in mature mammals. Pharmacol. Ther., 2000, 86(3), 277-304. Hanner, M.; Moebius, F.F.; Flandorfer, A.; Knaus, H.G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; [88] Glossmann, H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1binding site. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(15), 8072-8077. Harada, Y.; Kuno, M.; Wang, Y.Z. Differential effects of carbon dioxide and pH on [89] central chemoreceptors in the rat in vitro. J. Physiol, 1985, 368, 679-693. Harada, Y.; Wang, Y.Z.; Kuno, M. Central chemosensitivity to H+ and CO2 in the rat [90] respiratory center in vitro. Brain Res, 1985, 333(2), 336-339. Harper, R.M.; Kumar, R.; Macey, P.M.; Woo, M.A.; Ogren, J.A. Affective brain areas [91] and sleep-disordered breathing. Prog Brain Res, 2014, 209, 275-293. Hasselbach, K.A.G., S.A. Ein Betrag zur Respirationsphysiologie der graviditat. [92] Skand Arch Physiol **1912**, 27, 1-12. Hasselbach, K.A.G., S.A. Die Neutralitätsregulation des graviden Organismus. [93] Biochem. Z., 1915, 68, 206-264. Haywood, S.A.; Simonian, S.X.; van der Beek, E.M.; Bicknell, R.J.; Herbison, A.E. [94] Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. Endocrinology, 1999, 140(7), 3255-3263. Healy, F.; Marcus, C.L. Congenital central hypoventilation syndrome in children. [95] Paediatr Respir Rev, 2011, 12(4), 253-263. [96] Helena, C.; Gustafsson, J.A.; Korach, K.; Pfaff, D.; Anselmo-Franci, J.A.; Ogawa, S. Effects of estrogen receptor alpha and beta gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the locus coeruleus in female mice. Endocrine, 2009, 36(1), 169-177. Hellewell, S.B.; Bowen, W.D. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma [97] (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. Brain Res, 1990, 527(2), 244-253.

1 2

3

4

5 6

7

8

9 10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

1 2

3

4

5

6

7

8

9

Hilaire, G.; Bou, C.; Monteau, R. Serotonergic modulation of central respiratory [98] activity in the neonatal mouse: an in vitro study. Eur.J Pharmacol., 1997, 329(2-3), 115-120. Hilaire, G.; Duron, B. Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol Rev.*, [99] **1999**, 79(2), 325-360. [100] Hirata, S.; Shoda, T.; Kato, J.; Hoshi, K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(3), 124-129. [101] Hodges, M.R.; Richerson, G.B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in 10 respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO2 chemoreception, and thermoregulation. J Appl Physiol (1985), 2010, 108(5), 1425-1432. 11 12 [102] Horn, E.M.; Waldrop, T.G. Suprapontine control of respiration. *Respir. Physiol*, **1998**, 13 114(3), 201-211. [103] Hosie, A.M.; Wilkins, M.E.; da Silva, H.M.; Smart, T.G. Endogenous neurosteroids 14 15 regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature, 2006, 16 444(7118), 486-489. 17 [104] Intlekofer, K.A.; Petersen, S.L. Distribution of mRNAs encoding classical progestin 18 receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, 19 and progestin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. Neuroscience, 20 **2011**, *172*, 55-65. 21 [105] Inyushkin, A.N.; Merkulova, N.A.; Orlova, A.O.; Inyushkina, E.M. Local GABAergic 22 modulation of the activity of serotoninergic neurons in the nucleus raphe magnus. Neurosci 23 Behav Physiol, 2010, 40(8), 885-893. 24 [106] Jensen, D.; Wolfe, L.A.; O'Donnell, D.E.; Davies, G.A. Chemoreflex control of 25 breathing during wakefulness in healthy men and women. J Appl Physiol (1985), 2005, 98(3), 26 822-828. 27 [107] Jensen, D.; Wolfe, L.A.; Slatkovska, L.; Webb, K.A.; Davies, G.A.; O'Donnell, D.E. 28 Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. Am J 29 Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288(5), R1369-1375. 30 [108] Jin, X.; Zhong, W.; Jiang, C. Time-dependent modulation of GABAA-ergic synaptic 31 transmission by allopregnanolone in locus coeruleus neurons of Mecp2-null mice. 32 Am.J.Physiol Cell Physiol, 2013, 305(11), C1151-C1160. 33 [109] Jin, X.T.; Smith, Y. Localization and functions of kainate receptors in the basal 34 ganglia. Adv Exp Med Biol. 2011. 717. 27-37. 35 [110] Johannessen, M.; Fontanilla, D.; Mavlyutov, T.; Ruoho, A.E.; Jackson, M.B. 36 Antagonist action of progesterone at sigma-receptors in the modulation of voltage-gated 37 sodium channels. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(2), C328-337. 38 [111] Johnson, S.M.; Haxhiu, M.A.; Richerson, G.B. GFP-expressing locus ceruleus 39 neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO2/H+ responses in primary cell culture. J Appl 40 Physiol (1985), 2008, 105(4), 1301-1311. 41 [112] Johnson, S.M.; Turner, S.M.; Huxtable, A.G.; Ben-Mabrouk, F. Isolated in vitro 42 brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology. Respir 43 Physiol Neurobiol, 2012, 180(1), 1-7. 44 [113] Joseph, V.; Behan, M.; Kinkead, R. Sex, hormones, and stress: how they impact 45 development and function of the carotid bodies and related reflexes. Respir Physiol 46 Neurobiol, 2013, 185(1), 75-86. 47 [114] Joubert, F.; Perrin-Terrin, A.S.; Verkaeren, E.; Cardot, P.; Fiamma, M.N.; Frugiere, A.; 48 Rivals, I.; Similowski, T.; Straus, C.; Bodineau, L. Desogestrel enhances ventilation in ondine 49 patients: Animal data involving serotoninergic systems. Neuropharmacology, 2016, 107, 339-50 350. 51 [115] Kastrup, Y.; Hallbeck, M.; Amandusson, A.; Hirata, S.; Hermanson, O.; Blomqvist, A. 52 Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. Neurosci Lett, 1999, 53 275(2), 85-88. 54 [116] Kato, J.; Hirata, S.; Nozawa, A.; Yamada-Mouri, N. Gene expression of progesterone 55 receptor isoforms in the rat brain. Horm. Behav., 1994, 28(4), 454-463. 56 57 58 59 60

[117] Ke, L.; Lukas, R.J. Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurochem*, **1996**, 67(3), 1100-1112.

[118] Kelder, J.; Azevedo, R.; Pang, Y.; de Vlieg, J.; Dong, J.; Thomas, P. Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists. *Steroids*, **2010**, *75*(4-5), 314-322.

[119] Kimura, H.; Hayashi, F.; Yoshida, A.; Watanabe, S.; Hashizume, I.; Honda, Y. Augmentation of CO2 drives by chlormadinone acetate, a synthetic progesterone. *J.Appl.Physiol*, **1984**, *56*(6), 1627-1632.

[120] Kitaichi, K.; Chabot, J.G.; Moebius, F.F.; Flandorfer, A.; Glossmann, H.; Quirion, R. Expression of the purported sigma(1) (sigma(1)) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. *J Chem Neuroanat*, **2000**, *20*(3-4), 375-387.

[121] Knobil, E.N., J.D. *The physiology of Reproduction*. Raven Press: New-York, **1994**.

[122] Korinek, M.; Kapras, V.; Vyklicky, V.; Adamusova, E.; Borovska, J.; Vales, K.; Stuchlik, A.; Horak, M.; Chodounska, H.; Vyklicky, L., Jr. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*, **2011**, *76*(13), 1409-1418.

[123] Kramer, J.M.; Nolan, P.C.; Waldrop, T.G. In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res.*, **1999**, *835*(2), 197-203.

[124] Kumar, R.; Macey, P.M.; Woo, M.A.; Alger, J.R.; Harper, R.M. Diffusion Tensor Imaging Demonstrates Brainstem and Cerebellar Abnormalities in Congenital Central Hypoventilation Syndrome. *Pediatr Res.*, **2008**.

[125] Labombarda, F.; Meffre, D.; Delespierre, B.; Krivokapic-Blondiaux, S.; Chastre, A.; Thomas, P.; Pang, Y.; Lydon, J.P.; Gonzalez, S.L.; De Nicola, A.F.; Schumacher, M.; Guennoun, R. Membrane progesterone receptors localization in the mouse spinal cord. *Neuroscience*, **2010**, *166*(1), 94-106.

[126] Lalley, P.M. Responses of phrenic motoneurones of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. *J Physiol*, **1986**, 380, 349-371.

[127] Lauber, A.H.; Romano, G.J.; Pfaff, D.W. Sex difference in estradiol regulation of progestin receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization. *Neuroendocrinology*, **1991**, *53*(6), 608-613.

[128] Lavezzi, A.M.; Weese-Mayer, D.E.; Yu, M.Y.; Jennings, L.J.; Corna, M.F.; Casale, V.; Oneda, R.; Matturri, L. Developmental alterations of the respiratory human retrotrapezoid nucleus in sudden unexplained fetal and infant death. *Auton Neurosci*, **2012**, *170*(1-2), 12-19.

[129] Leonhardt, S.A.; Boonyaratanakornkit, V.; Edwards, D.P. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*, **2003**, *68*(10-13), 761-770.

[130] Li, D.C., C.I.H; Kato, R.; Ward,S.L.D; Keens, T.G. *Does Desogestrel Improve Ventilatory Control In Congenital Central Hypoventilation Syndrome?: ATS 2013, Philadelphia, 2013*; ATS society.

[131] Liu, Q.; Lowry, T.; Wong-Riley, M.T.T. Postnatal changes in ventilation during normoxia and acute hypoxia: implication for a sensitive period. *The Journal of Physiology Online*, **2006**, jphysiol.

[132] Liu, Z.; Patino, R. High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of Xenopus oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod*, **1993**, *49*(5), 980-988.

[133] Llewellyn-Smith, I.J.; Mueller, P.J. Immunoreactivity for the NMDA NR1 subunit in bulbospinal catecholamine and serotonin neurons of rat ventral medulla. *Auton Neurosci*, **2013**, *177*(2), 114-122.

1 2

3

4

5

6 7

8 9

[134] Loftis, J.M.; Janowsky, A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. Pharmacol Ther, 2003, 97(1), 55-85. [135] Loiseau, C.; Osinski, D.; Joubert, F.; Straus, C.; Similowski, T.; Bodineau, L. The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. Neurosci.Lett., 2014, 567, 63-67. [136] Lopes, L.T.; Patrone, L.G.; Bicego, K.C.; Coimbra, N.C.; Gargaglioni, L.H. 10 Periagueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. *Pflugers Arch.*, 11 12 2012, 464(2), 155-166. 13 [137] Loria, C.J.; Stevens, A.M.; Crummy, E.; Casadesus, G.; Jacono, F.J.; Dick, T.E.; 14 Siegel, R.E. Respiratory and behavioral dysfunction following loss of the GABAA receptor 15 alpha4 subunit. Brain Behav, 2013, 3(2), 104-113. 16 [138] Lovick, T.A. Involvement of GABA in medullary raphe-evoked modulation of neuronal 17 activity in the periaqueductal grey matter in the rat. Exp Brain Res, 2001, 137(2), 214-218. 18 [139] Low, C.M.; Wee, K.S. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-19 aspartate receptor: localization, structure, and function. Mol Pharmacol, 2010, 78(1), 1-11. 20 [140] Luntz-Leybman, V.; Freund, R.K.; Collins, A.C. 5 alpha-Pregnan-3 alpha-ol-20-one 21 blocks nicotine-induced seizures and enhances paired-pulse inhibition. Eur J Pharmacol, 22 **1990**, *185*(2-3), 239-242. 23 [141] Luthi, M.; Roach, D.E.; Beaudin, A.E.; Debert, C.T.; Sheldon, R.S.; Poulin, M.J. 24 Effects of ovarian hormones and aging on respiratory sinus arrhythmia and breathing 25 patterns in women. Clin Auton Res, 2008, 18(3), 134-144. 26 [142] Lynch, J.W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. 27 Physiol Rev, 2004, 84(4), 1051-1095. 28 [143] Macnutt, M.J.; De Souza, M.J.; Tomczak, S.E.; Homer, J.L.; Sheel, A.W. Resting and 29 exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle. J Appl Physiol (1985), 30 **2012**, *112*(5), 737-747. 31 [144] Maguire, J.; Mody, I. Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. 32 Psychoneuroendocrinology, 2009, 34 Suppl 1, S84-90. 33 [145] Maurice, T. Neurosteroids and sigma1 receptors, biochemical and behavioral 34 relevance. Pharmacopsychiatry, 2004, 37 Suppl 3, S171-182. 35 [146] Meffre, D.; Labombarda, F.; Delespierre, B.; Chastre, A.; De Nicola, A.F.; Stein, D.G.; 36 Schumacher, M.: Guennoun, R. Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the 37 male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. Neuroscience, 2013, 38 231, 111-124. 39 [147] Mellon, S.H.; Griffin, L.D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. 40 Trends Endocrinol Metab, 2002, 13(1), 35-43. 41 [148] Meyer, C.; Schmid, R.; Scriba, P.C.; Wehling, M. Purification and partial sequencing 42 of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. Eur J Biochem, 43 **1996**, 239(3), 726-731. 44 [149] Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; 45 Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone 46 receptor via cross-talk with estrogen receptor. EMBO J, 1998, 17(7), 2008-2018. 47 [150] Mikami, M.; Tatsumi, K.; Kimura, H.; Honda, Y.; Kuriyama, T. Respiration effect of 48 synthetic progestin in small doses in normal men. Chest, **1989**, 96(5), 1073-1075. 49 [151] Monnet, F.P.; Mahe, V.; Robel, P.; Baulieu, E.E. Neurosteroids, via sigma receptors, 50 modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat 51 hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(9), 3774-3778. 52 [152] Morin, D.; Hennequin, S.; Monteau, R.; Hilaire, G. Serotonergic influences on central 53 respiratory activity: an in vitro study in the newborn rat. Brain Res, 1990, 535(2), 281-287. 54 [153] Morin, D.; Monteau, R.; Hilaire, G. 5-Hydroxytryptamine modulates central respiratory 55 activity in the newborn rat: an in vitro study. Eur J Pharmacol, 1991, 192(1), 89-95. 56 57 58 59 60

[154] Morin, D.; Monteau, R.; Hilaire, G. Serotonin and cervical respiratory motoneurones: intracellular study in the newborn rat brainstem-spinal cord preparation. *Exp Brain Res*, **1991**, *84*(1), 229-232.

[155] Moussatche, P.; Lyons, T.J. Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. *Biochem Soc Trans*, **2012**, *40*(1), 200-204.

[156] Mulkey, D.K.; Stornetta, R.L.; Weston, M.C.; Simmons, J.R.; Parker, A.; Bayliss, D.A.; Guyenet, P.G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci*, **2004**, *7*(12), 1360-1369.

[157] Muzumdar, H.; Arens, R. Central Alveolar Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med.Clin.*, **2008**, *3*(4), 601-615.

[158] Nashmi, R.; Lester, H.A. CNS localization of neuronal nicotinic receptors. J Mol Neurosci, 2006, 30(1-2), 181-184.

[159] Nattie, E.E.; Fung, M.L.; Li, A.; St John, W.M. Responses of respiratory modulated and tonic units in the retrotrapezoid nucleus to CO2. *Respir.Physiol*, **1993**, *94*(1), 35-50.

[160] Nattie, E.E.; Li, A. Retrotrapezoid nucleus lesions decrease phrenic activity and CO2 sensitivity in rats. *Respir.Physiol*, **1994**, *97*(1), 63-77.

[161] Nobuta, H.; Cilio, M.R.; Danhaive, O.; Tsai, H.H.; Tupal, S.; Chang, S.M.; Murnen, A.; Kreitzer, F.; Bravo, V.; Czeisler, C.; Gokozan, H.N.; Gygli, P.; Bush, S.; Weese-Mayer, D.E.; Conklin, B.; Yee, S.P.; Huang, E.J.; Gray, P.A.; Rowitch, D.; Otero, J.J. Dysregulation of locus coeruleus development in congenital central hypoventilation syndrome. *Acta Neuropathol*, **2015**, *130*(2), 171-183.

[162] 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*, **2002**, 93(2), 427-439.

[163] Okada, Y.; Kawai, A.; Muckenhoff, K.; Scheid, P. Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respir.Physiol*, **1998**, *111*(1), 55-63.

[164] Okada, Y.; Muckenhoff, K.; Scheid, P. Hypercapnia and medullary neurons in the isolated brain stem-spinal cord of the rat. *Respir Physiol*, **1993**, *93*(3), 327-336.

[165] Onimaru, H.; Homma, I. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci*, **2003**, *23*(4), 1478-1486.

[166] Onimaru, H.; Shamoto, A.; Homma, I. Modulation of respiratory rhythm by 5-HT in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Pflugers Arch.*, **1998**, *435*(4), 485-494.

[167] Oyamada, Y.; Ballantyne, D.; Muckenhoff, K.; Scheid, P. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*, **1998**, *513 (Pt 2)*, 381-398.

[168] Oz, M.; Zhang, L.; Spivak, C.E. Direct noncompetitive inhibition of 5-HT(3) receptormediated responses by forskolin and steroids. *Arch Biochem Biophys*, **2002**, *404*(2), 293-301.

[169] Pang, Y.; Dong, J.; Thomas, P. Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and {epsilon} (mPRdelta and mPR{epsilon}) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, **2013**, *154*(1), 283-295.

[170] Pardridge, W.M.; Mietus, L.J. Transport of protein-bound steroid hormones into liver in vivo. *Am.J.Physiol*, **1979**, 237(4), E367-E372.

[171] Park-Chung, M.; Malayev, A.; Purdy, R.H.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res.*, **1999**, *830*(1), 72-87.

[172] Park-Chung, M.; Wu, F.S.; Purdy, R.H.; Malayev, A.A.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol*, **1997**, *52*(6), 1113-1123.

[173] Pascual, O.; Morin-Surun, M.P.; Barna, B.; avit-Saubie, M.; Pequignot, J.M.; Champagnat, J. Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J Physiol*, **2002**, *544*(Pt 2), 511-520.

1 2

3

4

5 6

7

8

9

[174] Peano, C.A.; Shonis, C.A.; Dillon, G.H.; Waldrop, T.G. Hypothalamic GABAergic mechanism involved in respiratory response to hypercaphia. Brain Res. Bull., **1992**, 28(1), 107-113. [175] Pena, F.; Garcia, O. Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. Curr Med Chem, 2006, 13(22), 2681-2693. [176] Pineda, J.; Aghajanian, G.K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. Neuroscience, 1997, 77(3), 723-743. 10 [177] Pratt, W.B. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction 11 12 from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(4), 13 420-434. 14 [178] Pratt, W.B.; Toft, D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the 15 hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med (Maywood), 2003, 228(2), 111-133. 16 [179] Preston, M.E.; Jensen, D.; Janssen, I.; Fisher, J.T. Effect of menopause on the 17 chemical control of breathing and its relationship with acid-base status. Am J Physiol Regul 18 Integr Comp Physiol, 2009, 296(3), R722-727. 19 [180] Ptak, K.; Yamanishi, T.; Aungst, J.; Milescu, L.S.; Zhang, R.; Richerson, G.B.; Smith, 20 J.C. Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via 21 endogenously released serotonin and substance P. J Neurosci, 2009, 29(12), 3720-3737. 22 [181] Ramanantsoa, N.; Gallego, J. Congenital central hypoventilation syndrome. Respir 23 Physiol Neurobiol, 2013, 189(2), 272-279. 24 [182] Ramanantsoa, N.; Hirsch, M.R.; Thoby-Brisson, M.; Dubreuil, V.; Bouvier, J.; Ruffault, 25 P.L.; Matrot, B.; Fortin, G.; Brunet, J.F.; Gallego, J.; Goridis, C. Breathing without CO(2) 26 chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. Journal of Neuroscience, 2011, 31(36), 27 12880-12888. 28 [183] Ramirez, J.M. The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology. 29 and neurobiology. Prog Brain Res, 2014, 209, 91-129. 30 [184] Rand, C.M.; Patwari, P.P.; Rodikova, E.A.; Zhou, L.; Berry-Kravis, E.M.; Wilson, R.J.; 31 Bech-Hansen, T.; Weese-Mayer, D.E. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, 32 hypoventilation, and autonomic dysregulation: analysis of hypothalamic and autonomic 33 candidate genes. Pediatr.Res., 2011, 70(4), 375-378. 34 [185] Read, D.J.; Leigh, J. Blood-brain tissue Pco2 relationships and ventilation during 35 rebreathing. J Appl Physiol, 1967, 23(1), 53-70. 36 [186] Ren, J.; Greer, J.J. Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the 37 perinatal period. J.Physiol, 2006, 574(Pt 2), 535-546. 38 [187] Richerson, G.B. Response to CO2 of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. J 39 Neurophysiol, 1995, 73(3), 933-944. 40 [188] Richter, D.W.; Smith, J.C. Respiratory rhythm generation in vivo. Physiology 41 (Bethesda), 2014, 29(1), 58-71, 42 [189] Robichaud, M.; Debonnel, G. Modulation of the firing activity of female dorsal raphe 43 nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids. J Endocrinol, 2004, 182(1), 11-21. 44 [190] Rudzinski, E.; Kapur, R.P. PHOX2B immunolocalization of the candidate human 45 retrotrapezoid nucleus. Pediatr Dev Pathol, 2010, 13(4), 291-299. 46 [191] Saadani-Makki, F.; Frugiere, A.; Gros, F.; Gavtan, S.; Bodineau, L. Involvement of 47 adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in 48 newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord 49 preparations isolated from newborn rats. Neuroscience, 2004, 127(2), 505-518. 50 [192] Saaresranta, T.; Polo, O. Hormones and breathing. *Chest*, **2002**, *122*(6), 2165-2182. 51 [193] Schindler, A.E.; Campagnoli, C.; Druckmann, R.; Huber, J.; Pasqualini, J.R.; 52 Schweppe, K.W.; Thijssen, J.H. Classification and pharmacology of progestins. Maturitas, 53 2003. 46 Suppl 1. S7-S16. 54 [194] Schumacher, M.; Guennoun, R.; Ghoumari, A.; Massaad, C.; Robert, F.; El-Etr, M.; 55 Akwa, Y.; Rajkowski, K.; Baulieu, E.E. Novel perspectives for progesterone in hormone 56 replacement therapy, with special reference to the nervous system. Endocr. Rev., 2007, 57 28(4), 387-439. 58 59 60

[195] Singh, M.; Su, C.; Ng, S. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. Front Neurosci, 2013, 7, 159. [196] Sitruk-Ware, R. Pharmacological profile of progestins. Maturitas, 2008, 61(1-2), 151-157. [197] Skatrud, J.B.; Dempsey, J.A.; Kaiser, D.G. Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. J.Appl.Physiol, 1978, 44(6), 393-344. [198] Slatkovska, L.; Jensen, D.; Davies, G.A.; Wolfe, L.A. Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. Respir. Physiol Neurobiol., 2006, 154(3), 379-388. [199] Smith, J.C.; Ellenberger, H.H.; Ballanyi, K.; Richter, D.W.; Feldman, J.L. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. Science, 1991, 254(5032), 726-729. [200] Smith, J.L.; Kupchak, B.R.; Garitaonandia, I.; Hoang, L.K.; Maina, A.S.; Regalla, L.M.; Lyons, T.J. Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in veast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. Steroids, 2008. 73(11), 1160-1173. [201] Sritippayawan, S.; Hamutcu, R.; Kun, S.S.; Ner, Z.; Ponce, M.; Keens, T.G. Motherdaughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(3), 367-369. [202] Straus, C.; Trang, H.; Becquemin, M.H.; Touraine, P.; Similowski, T. Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. Respir. Physiol Neurobiol., 2010, 171(2), 171-174. [203] Su, T.P. Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphineinaccessible sites in guinea-pig brain. J Pharmacol Exp Ther, 1982, 223(2), 284-290. [204] Su. T.P.: London, E.D.: Jaffe, J.H. Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. Science, 1988, 240(4849), 219-221. [205] Su, T.P.; Su, T.C.; Nakamura, Y.; Tsai, S.Y. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. Trends Pharmacol Sci. 2016, 37(4), 262-278. [206] Suzue, T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. J Physiol, 1984, 354, 173-183. [207] Tan, W.; Sherman, D.; Turesson, J.; Shao, X.M.; Janczewski, W.A.; Feldman, J.L. Reelin demarcates a subset of pre-Botzinger complex neurons in adult rat. J Comp Neurol, **2012**, *520*(3), 606-619. [208] Tang, Y.T.; Hu, T.; Arterburn, M.; Boyle, B.; Bright, J.M.; Emtage, P.C.; Funk, W.D. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. J Mol Evol, 2005, 61(3), 372-380. [209] Teppema, L.J.; Veening, J.G.; Kranenburg, A.; Dahan, A.; Berkenbosch, A.; Olievier, C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. J Comp Neurol., **1997**, 388(2), 169-190. [210] Thomas, P. Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. Front Neuroendocrinol, 2008, 29(2), 292-312. [211] Thomas, P.; Pang, Y. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. Neuroendocrinology, 2012, 96(2), 162-171. [212] Thomas, P.; Pang, Y.; Dong, J.; Groenen, P.; Kelder, J.; de Vlieg, J.; Zhu, Y.; Tubbs, C. Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. Endocrinology, 2007, 148(2), 705-718. [213] Timmer, C.J.; Srivastava, N.; Dieben, T.O.; Cohen, A.F. Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: Cerazette and Liseta. Eur.J.Drug Metab Pharmacokinet., 1999, 24(4), 335-343.

58 59 60

1 2

3

4

5 6

7

8

9 10

11 12

13

14 15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

[214] Trang, H.; Dehan, M.; Beaufils, F.; Zaccaria, I.; Amiel, J.; Gaultier, C. The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: general data, phenotype, and genotype. Chest, 2005, 127(1), 72-79. [215] Valera, S.; Ballivet, M.; Bertrand, D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(20), 9949-9953. [216] van Klaveren, R.J.; Demedts, M. Determinants of the hypercapnic and hypoxic response in normal man. Respir Physiol, 1998, 113(2), 157-165. [217] Verkaeren, E.; Brion, A.; Hurbault, A.; Chenivesse, C.; Morelot-Panzini, C.; Gonzalez-Bermejo, J.; Attali, V.; Similowski, T.; Straus, C. Health-related quality of life in young adults with congenital central hypoventilation syndrome due to PHOX2B mutations: a crosssectional study. Respir Res, 2015, 16, 80. [218] Voituron, N.; Frugiere, A.; Champagnat, J.; Bodineau, L. Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. J Physiol, 2006, 577(Pt 1), 55-68. [219] 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, 2005, 132(3), 843-854. [220] Voituron, N.; Frugiere, A.; Mc Kay, L.C.; Romero-Granados, R.; Dominguez-del-Toro. E.; Saadani-Makki, F.; Champagnat, J.; Bodineau, L. The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. Neuroscience, 2011. [221] Wang, C.; Marx, C.E.; Morrow, A.L.; Wilson, W.A.; Moore, S.D. Neurosteroid modulation of GABAergic neurotransmission in the central amygdala: a role for NMDA receptors. Neurosci Lett, 2007, 415(2), 118-123. [222] Weaver, C.E., Jr.; Park-Chung, M.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. Brain Res, **1997**, 761(2), 338-341. [223] Webb, T.I.; Lynch, J.W. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. Curr Pharm Des, 2007, 13(23), 2350-2367. [224] Weese-Mayer, D.E.; Berry-Kravis, E.M. Genetics of congenital central hypoventilation syndrome: lessons from a seemingly orphan disease. Am.J Respir.Crit Care Med., 2004, *170*(1), 16-21. [225] Weese-Mayer, D.E.; Berry-Kravis, E.M.; Ceccherini, I.; Keens, T.G.; Loghmanee, D.A.; Trang, H. An official ATS clinical policy statement: Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. Am.J.Respir.Crit Care Med., 2010, 181(6), 626-644. [226] Wenz, J.J.; Barrantes, F.J. Steroid structural requirements for stabilizing or disrupting lipid domains. Biochemistry, 2003, 42(48), 14267-14276. [227] Wetzel, C.H.; Hermann, B.; Behl, C.; Pestel, E.; Rammes, G.; Zieglgansberger, W.; Holsboer, F.; Rupprecht, R. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5hydroxytryptamine type 3 receptor. Mol Endocrinol, 1998, 12(9), 1441-1451. [228] White, D.P.; Douglas, N.J.; Pickett, C.K.; Weil, J.V.; Zwillich, C.W. Sexual influence on the control of breathing. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983, 54(4), 874-879. [229] Wu, F.S.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acidand glycine-induced currents by progesterone. Mol Pharmacol, 1990, 37(5), 597-602. [230] Wu, F.S.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. Mol Pharmacol, 1991, 40(3), 333-336. [231] Wu, F.S.; Yu, H.M.; Tsai, J.J. Mechanism underlying potentiation by progesterone of the kainate-induced current in cultured neurons. Brain Res, 1998, 779(1-2), 354-358. [232] Wu, K.I.; Bacon, R.A.; Al-Mahroug, H.A.; Kempson, S.A. Nicotinamide as a rapidacting inhibitor of renal brush-border phosphate transport. Am J Physiol, 1988, 255(1 Pt 2), F15-21.

[233] Wuyts, R.; Vlemincx, E.; Bogaerts, K.; Van Diest, I.; Van den Bergh, O. Sigh rate and respiratory variability during normal breathing and the role of negative affectivity. *Int J Psychophysiol*, **2011**, *82*(2), 175-179.

[234] Wysocki, M.; Fiamma, M.N.; Straus, C.; Poon, C.S.; Similowski, T. Chaotic dynamics of resting ventilatory flow in humans assessed through noise titration. *Respir Physiol Neurobiol*, **2006**, *153*(1), 54-65.

[235] Wysocki, M.; Fiamma, M.N.; Straus, C.; Sang Poon, C.; Similowski, T. Chaotic dynamics of ventilatory flow in humans. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, **2005**, *1*, 759-762.

[236] Xu, J.; Zeng, C.; Chu, W.; Pan, F.; Rothfuss, J.M.; Zhang, F.; Tu, Z.; Zhou, D.; Zeng, D.; Vangveravong, S.; Johnston, F.; Spitzer, D.; Chang, K.C.; Hotchkiss, R.S.; Hawkins, W.G.; Wheeler, K.T.; Mach, R.H. Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat Commun*, **2011**, *2*, 380.

[237] Yu, S.Y.; Wang, G.M.; Wang, H.; Zhang, H.; Li, Q. Raphe pallidus modulates Botzinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rats. *Eur J Neurosci*, **2011**, *34*(7), 1113-1120.

[238] Zabka, A.G.; Behan, M.; Mitchell, G.S. Selected contribution: Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are influenced by age and by the estrus cycle. *J.Appl.Physiol*, **2001**, *91*(6), 2831-2838.

[239] Zhu, Y.; Bond, J.; Thomas, P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, *100*(5), 2237-2242.

[240] Zhu, Y.; Rice, C.D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, *100*(5), 2231-2236.

[241] Zuloaga, D.G.; Yahn, S.L.; Pang, Y.; Quihuis, A.M.; Oyola, M.G.; Reyna, A.; Thomas, P.; Handa, R.J.; Mani, S.K. Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor-beta in the female rat brain. *Endocrinology*, **2012**, *153*(9), 4432-4443.

[242] Zwillich, C.W.; Natalino, M.R.; Sutton, F.D.; Weil, J.V. Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. *J Lab Clin Med.*, **1978**, *92*(2), 262-269.

### Figure 1



Figure 2

**Current Neuropharmacology** 



### Figure 2



В



Fig4+164-5



Chapitre III : Implication de la signalisation orexinergique dans le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel. Une potentielle piste thérapeutique pour le traitement des hypoventilations centrales

L'objectif de cette étude était de déterminer plus précisément les mécanismes centraux mis en jeu par l'ETO lui permettant de renforcer la réponse respiratoire à l'acidose métabolique. Pour cela nous avons cherché à identifier dans un premier temps la ou les régions encéphaliques impliquées puis plus précisément la ou les structures centrales mises en jeu et enfin nous avons focalisé notre attention sur une population neuronale particulière, les neurones orexinergiques. Les expériences ont été réalisées sur différents types de préparations *ex vivo* contenant différentes subdivisions encéphaliques à savoir des préparations : bulbe rachidien-moelle épinière (MS), pont-bulbe rachidien-moelle épinière (PMS), tronc cérébral-moelle épinière (BS) et diencéphale-tronc cérébral-moelle épinière (DBS). Sur ces préparations l'enregistrement de la CCR a permis d'analyser les effets de l'ETO en acidose métabolique (et également en normopH). Ces résultats ont ensuite été mis en perspective avec l'analyse de l'expression de *c-fos* combinée ou non à la détection de l'orexine ainsi qu'avec les expériences de co-applications pharmacologiques réalisées sur d'autres préparations *ex vivo*.

## I- Effet d'une exposition aigüe à l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique et en condition de normopH

En utilisant le modèle de préparation *ex vivo* sur lequel nous avons mis en évidence que l'ETO renforçait la réponse respiratoire à l'acidose métabolique *i.e.* les préparations DBS, l'effet d'une exposition aigüe à l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique a été testé à plusieurs concentrations  $(5 \cdot 10^{-2}, 5 \cdot 10^{-1}, 1 \text{ et } 2 \mu\text{M})$ . A l'issu de ces expériences il est apparu que l'ETO à  $5 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}$  est d'autant plus capable de renforcer la réponse respiratoire à l'acidose métabolique qu'à 1  $\mu$ M. En conséquence, les expériences qui ont suivi cette constatation ont été effectuées à  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M. A noter qu'à cette concentration d'ETO ( $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M), l'effet sur la f<sub>R</sub> en condition de normopH a également été testé sur les préparations DBS et montre de façon cohérente avec les résultats obtenus à 1  $\mu$ M que l'ETO n'induit pas d'augmentation significative de la f<sub>R</sub> en normopH (*cf* : *Résultats, Chapitre I*). De nouveau, ces résultats mis en perspective avec ceux obtenu précédemment dans le laboratoire (Joubert et al., 2016) suggèrent que l'effet facilitateur bulbaire observé sur des préparations MS de souris pourrait être minimisé en cas d'activation de mécanismes suprabulbaires ; ou que les mécanismes bulbaires normalement mis en jeu par l'ETO chez la souris soient moins efficaces ou absent chez le rat nouveau-né.

## II- Le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel dépend de la présence de structures diencéphaliques

Ensuite la réponse respiratoire à l'acidose métabolique en présence ou non d'ETO à  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M a été analysée sur différents types de préparations *ex vivo* contenant différentes subdivisions encéphaliques à savoir des préparations MS, PMS et BS. De façon intéressante cette série d'expériences a permis de montrer qu'en l'absence du diencéphale l'ETO ne parvient pas à exercer son effet facilitateur sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique. En effet sur les préparations MS, PMS et BS l'augmentation de la f<sub>R</sub> en réponse à l'acidose métabolique est équivalente à celle développée par les préparations témoins exposées au DMSO, suggérant que l'effet de l'ETO nécessite l'activation d'un mécanisme qui dépend du diencéphale. De plus, nos résultats suggèrent que le fait d'ajouter des subdivisions encéphaliques en absence de progestatif ne modifie pas l'augmentation de la f<sub>R</sub> induite par l'acidose métabolique dans la mesure où cette réponse est équivalente entre toutes les préparations : DBS, BS, PMS et MS.

# III- L'étonogestrel modifie l'expression de c-fos induite par l'acidose métabolique dans des structures impliquées dans l'élaboration et/ou la régulation de la commande centrale respiratoire

Sur les préparations DBS soumises au protocole d'exposition au DMSO et à l'ETO à  $5 \cdot 10^{-1} \,\mu\text{M}$  en normopH ainsi qu'en acidose métabolique, une étude de l'expression de *c-fos* a été effectuée pour permettre d'identifier les structures impliquées dans l'effet de l'ETO. De façon cohérente avec les résultats obtenus sur la commande respiratoire en normopH l'analyse de l'expression de *c-fos* n'a révélé aucune différence significative du nombre moyen de neurones c-FOS positifs, entre les préparations exposées à l'ETO ou au DMSO. En outre, en analysant l'expression de c-fos entre les préparations exposées au DMSO en normopH et celles exposées en acidose métabolique, nous avons été en mesure de déterminer quelles étaient les structures qui augmentent leurs nombre de neurones c-FOS positifs en réponse à l'acidose métabolique, à savoir : le noyau réticulaire bulbaire ventrolatéral (VLM), le noyau du tractus solitaire ventrolatéral (vINTS), le groupe parapyramidal (PP), le noyau rétrotrapézoïde (RTN), le locus coeruleus (LC), la subdivision ventrolatérale de la substance grise périaqueducale (vIPAG), l'aire peri-fornicale (PeF). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui ont décrit ces structures comme étant chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Miles, 1983, Coates et al., 1993, Oyamada et al., 1998, Kramer et al., 1999, Nattie and Li, 2002a, Mulkey et al., 2004, Ribas-Salgueiro et al., 2006, Li et al., 2013).

De façon intéressante au regard de notre problématique, l'analyse de l'expression de *c-fos* sur les préparations DBS exposées à l'ETO  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M a révélé que de nombreuses structures ont augmenté leur nombre moyen de neurones c-FOS positifs en réponse à l'ETO à savoir : la VLM, le vINTS, le LC, la vIPAG, la PeF, le noyau du tractus solitaire commissural (cNTS), le noyau du tractus solitaire médian (mNTS), le raphé pallidus (RPa), le raphé obscurus (ROb), la subdivision latérale de la substance grise periaqueducale (IPAG). Ces résultats mis en perspective avec ceux obtenus concernant les structures qui ont augmenté l'expression de *c*-*fos* en réponse à l'acidose métabolique nous ont permis de d'établir que certaines structures sont suractivées par l'ETO *i.e.* VLM, vINTS, LC et vIPAG et que d'autres sont activées *de novo* par l'ETO *i.e.* cNTS, mNTS, RPa, Rob et IPAG. Au vu de ces résultats nous posons l'hypothèse que l'effet de l'ETO, à savoir le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique est sous-tendu par la suractivation et l'activation de structures qui exercent une influence cumulative facilitatrice sur la CCR.

## IV- Implication des systèmes orexinergiques dans le renforcement de la réponse respiratoire à l'acidose métabolique par l'étonogestrel

Au vu des données de la littérature et du fait que l'effet de l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique requière la présence du diencéphale nous avons ensuite axé nos recherches sur les neurones orexinergiques. Ainsi des doubles détections c-FOS/orexine ont été réalisées sur les préparations DBS exposées au DMSO et à l'ETO à 5  $10^{-1}$  µM en acidose métabolique afin de déterminer si les neurones orexinergiques avaient modifié leur expression de *c-fos* en réponse à l'ETO. Cette quantification a révélé que le nombre de neurones double-positifs dans l'hypothalamus caudal était augmenté en réponse à l'ETO et suggère donc que ce progestatif a été en mesure d'activer ces neurones.

Pour valider l'hypothèse selon laquelle la signalisation orexinergique est impliquée dans les effets de l'ETO des co-applications pharmacologiques d'ETO à 5  $10^{-1}$  µM et d'un antagoniste spécifique des récepteurs 1 et 2 à l'orexine, OX1R et OX2R : l'almorexant, ont été réalisées sur les préparations DBS. Nos résultats suggèrent que le blocage de la signalisation orexinergique ne modifie pas la réponse respiratoire à l'acidose métabolique sur notre modèle déafférenté, dans la mesure où cette réponse est équivalente sur les préparations exposées au DMSO en présence ou non d'almorexant. Ensuite il résulte de ces expériences qu'en cas d'antagonisation des récepteurs OX1R et OX2R, l'ETO ne parvient pas à renforcer la réponse respiratoire à l'acidose métabolique sur les préparations exposées au DMSO et à l'acidose métabolique. En effet la réponse respiratoire est alors équivalente à ce qui est observé sur les préparations co-exposées au DMSO et à l'almorexant.

A l'issu de ces protocoles une analyse du nombre de neurones c-FOS positifs a été réalisée sur les préparations exposées à l'almorexant avec soit du DMSO soit de l'ETO. De façon cohérente avec les résultats obtenus lors des enregistrements électrophysiologiques des préparations DBS, il ressort de cette analyse qu'en cas de co-incubation avec l'almorexant l'ETO ne parvient pas à entrainer une modification de l'expression de *c-fos* dans la quasitotalité des structures précédemment décrites comme suractivées *i.e.* VLM, vINTS, LC, vIPAG et comme activées *i.e.* cNTS, mNTS, IPAG. De façon intéressante, en présence d'almorexant le RPa et le ROb présentent toujours une plus grande quantité de neurones c-FOS positifs sous ETO que sous DMSO, suggérant que l'ETO activerait ces structures indépendamment de l'effet qu'il semble exercer sur les neurones orexinergiques. Cependant, dans la mesure où le blocage de la signalisation orexinergique ne permet pas à l'ETO de renforcer l'adaptation de la CCR à

l'acidose métabolique, son effet stimulateur sur les neurones du ROb et du RPa ne semble pas être suffisant pour enclencher cette adaptation.

Collectivement, nos résultats suggèrent que le mécanisme par lequel l'ETO induit un renforcement de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  s'appuie sur l'activation de neurones orexinergiques de l'hypothalamus caudal. Nous posons l'hypothèse que l'activation des neurones orexinergiques par l'ETO induit une libération d'orexine sur plusieurs structures du tronc cérébral (cNTS, vINTS, mNTS, VLM, LC, IPAG et vIPAG) ; par la suite, la liaison de l'orexine sur OX1R et OX2R conduirait à activer ou à augmenter l'activité de ces structures du tronc cérébral. Une action indépendante de l'orexine sur le ROb et le RPa peut également participer à l'action de l'ETO. Ces structures exerceraient ensemble une influence facilitatrice cumulative sur la CCR, ce qui entraînerait un renforcement de l'augmentation de la f<sub>R</sub> induite par l'acidose métabolique.

En conclusion, nos résultats permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes centraux par lesquels les progestatifs appartenant à la famille des gonanes ont pu provoquer une récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chez des patientes CCHS. Ces travaux, ainsi que l'étude antérieure sur les mécanismes bulbaires de l'ETO impliqués dans la ventilation de base (Joubert et al., 2016), constituent un socle de connaissances sur les effets ventilatoires des progestatifs de la famille des gonanes et fournissent des pistes de réflexions sur la façon dont ils pourraient constituer une piste thérapeutique pour le traitement des CHS en général et CCHS en particulier.

# Manuscrit mis en forme pour une soumission prochaine à la revue : Journal of Physiology (London)

TITLE: Involvement of orexin in the strengthening of respiratory response to acidosis by etonogestrel. A potential issue for central hypoventilations

AUTHORS: Camille LOISEAU, Besma BARKA, Laurence BODINEAU\*

RUNNING TITLE: Respiratory interaction between orexin and etonogestrel under acidosis

KEY POINTS

- 1. Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is a neurorespiratory disease characterised by life-threatening hypoventilation associated with the absence of respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>.
- 2. Serendipitous finding has shown in two adult women with CCHS a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity concomitant with oral consumption of desogestrel, a potent synthetic progestin.
- 3. Using electrophysiological and immunohistochemical approaches on *ex vivo* preparations of central nervous system, we investigated the physiological basis of how etonogestrel, the active metabolite of desogestrel, may has induced this recovery.
- 4. Obtained results shown that under acidosis, etonogestrel, by interacting with orexinergic systems, strengthened the respiratory response to metabolic acidosis by over-activating and activating brainstem respiratory-related structures.
- 5. This study constitutes a fund of knowledge about the respiratory effects of etonogestrel and provide pieces of reflexion concerning how gonane progestins can constitute a therapeutic issue for CCHS.

\* CORRESPONDING AUTHOR: Laurence BODINEAU, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, INSERM, UMR\_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75013, Paris, France.

Tel 33 1 40 77 97 15, Fax: 33 1 40 77 97 89. E-mail: <u>laurence.bodineau@upmc.fr</u>

KEYWORDS: Congenital central hypoventilation syndrome, CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity, etonogestrel

ABSTRACT:

Central hypoventilation syndromes are neurorespiratory diseases characterized by a dysfunction of the central respiratory CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity that induced lifethreatening hypoventilation. To date, no pharmacological treatment is available. In the most documented of these syndromes, the congenital central hypoventilation syndrome or CCHS, a serendipitous finding suggests that desogestrel, a potent progestin, may allow recovery of the respiratory response to CO<sub>2</sub> but mechanisms are unknown. Here, we use ex vivo preparations of central nervous system from newborn rats to test, with pharmacological exposures, the hypothesis that desogestrel, or rather its biologically active metabolite etonogestrel, activates or over-activates central respiratory-related structures exerting a facilitatory influence on the respiratory drive under hypercaphic conditions. First, by the recording of central respiratory drive, our results indicated that the respiratory response to metabolic acidosis, as a model of hypercapnia, was strengthened by a diencephalic-dependent mechanism stimulated by etonogestrel in a small range of concentration close to the CCHS clinical exposure. Second, the analysis of the *c*-fos expression both revealed that the diencephalic orexinergic neurons constitute a key neuronal population for the etonogestrel effect and suggested that the progestin over-activates and activates respiratory-related brainstem structures. As to date the revealed respiratory-related structures do not seem to be deficient in CCHS patients, we assume that our results highlighted, at least in part, the neuronal pathway used by etonogestrel to induce a recovery of the CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in CCHS patients. Thus, our data open up pieces of reflexion about conditions of use of etonogestrel to enhance ventilation in CCHS patients.

#### ABBREVIATIONS LIST:

- ABC: avidin-biotin-peroxidase complex
- aCSF: artificial cerebrospinal fluid
- ASIC1a: acid-sensing ion channels 1a
- BS: brainstem-spinal cord preparation
- C4: fourth cervical ventral nerve root
- CamKII: Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II
- CCHS: congenital central hypoventilation syndrome
- CHS: central hypoventilation syndrome
- CNS: central nervous system
- cNTS: commissural part of the nucleus tractus solitaries
- CRD: central respiratory drive
- DBS: diencephalon-brainstem-spinal cord preparations
- dIPAG: dorsolateral part of the periaqueductal gray
- DMH: dorsomedial hypothalamic nucleus
- dPAG: dorsal part of the periaqueductal gray
- DMSO: dimethyl sulfoxide
- ETO: etonogestrel
- f<sub>R</sub>: respiratory frequency
- LC: locus coeruleus
- LH: lateral hypothalamic area
- IPAG: lateral part of the periaqueductal gray
- IPB: lateral subnucleus of the parabrachial nucleus
- mNTS: median part of the nucleus tractus solitarius
- mPB/KF: medial subnucleus of the parabrachial nucleus/ kölliker-fuse nucleus
- MS: medullary-spinal cord preparation
- NMDA: N-methyl-D-aspartate
- NTS: nucleus tractus solitarius
- OXR1: orexin receptor 1
- OXR2: orexin receptor 2
- PAG: periaqueductal gray matter
- PeF: perifornical region
- pFRG: parafacial respiratory group
- PH: posterior hypothalamic area
- PHOX2B: paired-like homeobox 2B
- PMS: ponto-medullary-spinal cord preparation
- PP: parapyramidal group
- preBotC: pre-Bötzinger Complex
- RMg: raphe magnus nucleus
- ROb: raphe obscurus nucleus
- RPa: raphe pallidus nucleus
- RTN: retrotrapezoid nucleus
- VLM: ventrolateral medullary reticular nucleus
- vINTS: ventrolateral part of the nucleus tractus solitarius
- vIPAG: ventrolateral part of the periaqueductal gray

#### INTRODUCTION

Elaboration of a central respiratory drive (CRD), able to match both metabolic demand in O<sub>2</sub> and clearance of CO<sub>2</sub>, relies on central and peripheral structures that generate, integrate, encode, and convey relevant information from the entire body (Feldman et al., 2003; Guyenet, 2014). The core rhythm-generating circuit is constituted of two coupled-oscillators located in the ventrolateral medulla: the pre-Botzinger Complex (preBotC) and the parafacial respiratory group (pFRG), which drive inspiration and active expiration respectively (Smith et al., 1991; Mellen et al., 2003; Onimaru & Homma, 2003; Janczewski & Feldman, 2006). The central respiratory chemosensitivity refers to the ability of cellular and molecular sensors to detect CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> variations within the brain and to initiate the appropriate adjustments in ventilation (Jiang et al., 2005; Chernov et al., 2010; Goridis & Brunet, 2010; Guyenet et al., 2010; Guyenet, 2014; Guyenet & Bayliss, 2015). The paired-like homeobox 2B (phox2b)expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus (RTN) that overlaps with pFRG constituting the RTN/pFRG region, are considered as the main CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive neurons (Mulkey et al., 2004; Dubreuil et al., 2008; Onimaru et al., 2008; Amiel et al., 2009). Additionally, there is general agreement that other neuronal structures distributed along the brainstem and the diencephalon contribute to the respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> challenges (Biancardi et al., 2008; Lopes et al., 2012; Song et al., 2012; Li et al., 2013; Guyenet, 2014).

Central Hypoventilation Syndromes (CHS) are neurorespiratory diseases that result from dysfunction of sensory receptors, respiratory rhythm generators or other central respiratory structures (Cielo & Marcus, 2014). Among these diseases, the congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is the most documented. CCHS

is a life-threatening sleep-related hypoventilation syndrome associated with the absence or a blunted respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Carroll et al., 2010; Weese-Mayer et al., 2010; Ramanantsoa & Gallego, 2013). In 2003, the PHOX2B gene was identified as the disease-defining gene for CCHS (Amiel et al., 2003). By analogy with investigations performed on genetically engineered mice, the loss of respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> in CCHS is supposed, at least partially, caused by the dysfunction of the CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive PHOX2B-positive neurons of the RTN (Dubreuil et al., 2008; Amiel et al., 2009; Dubreuil et al., 2009; Ramanantsoa et al., 2011). To date, no pharmacological treatment is available and the inherent mechanisms whereby PHOX2B mutation results in the CCHS phenotype remain to be fully elucidated. In 2010, a serendipitous finding revealed that two adult women with CCHS have presented a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity concomitant with oral consumption for contraceptive purpose of desogestrel, a potent synthetic progestin belonging to the gonane family (Schindler et al., 2003; Sitruk-Ware, 2008; Straus et al., 2010). Following this observation and because data of the literature have established that progesterone and synthetic progestins exert a stimulant effect on the respiratory adaptation to gas challenges and on baseline respiratory drive in both humans and animal model (Zwillich et al., 1978; Bayliss et al., 1987; Bayliss et al., 1990; Bayliss & Millhorn, 1992; Wagenaar et al., 2000; Jensen et al., 2005; Slatkovska et al., 2006; Joubert et al., 2016), it has been suggested that desogestrel may have been involved in the recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in CCHS. Nonetheless, this recovery under desogestrel, does not appear to be systematic as suggest by the non-improvement of the respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> observed in a CCHS patient deliberately placed under desogestrel (Li, 2013). This discrepancy may rely on the idiosyncrasies and/or on the complex action of progestin and confirmed the pressing necessity to elucidate the mechanisms involved in the gonane progestin effect.

In such a context, we hypothesized that desogestrel or rather its biologically active metabolite 3-ketodesogestrel (etonogestrel, ETO; (Verhoeven *et al.*, 1998; Timmer *et al.*, 1999)) is able to induce a recovery of  $CO_2/H^+$  chemosensitivity, at least in some CCHS patients, by activating or over-activating one or more central structures displaying  $CO_2/H^+$  sensitivity and remaining functional in CCHS patients. Indeed, evidences have emerged that natural or synthetic steroids are neuroactive by initiating genomic and non-genomic pathways (Baulieu, 1991; Barann *et al.*, 1999; Rupprecht & Holsboer, 1999; Behan & Wenninger, 2008; Brinton *et al.*, 2008; Behan & Kinkead, 2011). Identify and understand the physiological basis of the recovery of  $CO_2/H^+$  chemosensitivity induced by ETO is a crucial prerequisite to be able to evaluate the conditions under which it can constitute a therapeutic issue for the treatment of CCHS and even CHS in general. In this context, in a first exploratory study, we have shown that acute exposure to ETO led to a strengthening of the increase in respiratory frequency (f<sub>R</sub>) induced by metabolic acidosis through a mechanism involving supramedullary encephalic regions (Loiseau *et al.*, 2014).

The present study was designed to decipher central mechanisms implicated in the strengthening of respiratory response to metabolic acidosis induced by ETO. In *ex vivo* central nervous system (CNS) preparations from newborn rats with different rostral extensions, we demonstrated that the diencephalon was an encephalic subdivision essential to the enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis by the progestin. In parallel, the pattern of *c-fos* expression, the most effective marker of neuronal activation (Lanteri-Minet *et al.*, 1994), revealed that the strengthening of respiratory response to metabolic acidosis by ETO is associated with

over-activation and activation of brainstem respiratory structures. Finally, we demonstrated that the diencephalic orexinergic neurons constitute a key neuronal population in the ETO effect, since blocking the orexinergic signalisation results in the loss of both the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis and the over-activation or activation of brainstem respiratory structures.

#### MATERIALS AND METHODS

#### **Ethical Approval**

Experiments were performed on both male and female newborn Sprague-Dawley rats (n=299, 0-3 days old;  $8.1 \pm 0.06$  g, Janvier Labs; Le Genest Saint Isle, France) in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and French law (2013/118). All protocols were approved by the Ethic Committee and the French Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et la Recherche de (APAFIS#2210-2015100812195835v2). Animals were kept at a 12 H light-dark cycle with free access to food and water. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

#### Drugs

The following pharmacological drugs were used: dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), ETO (3-ketodesogestrel, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) prepared in DMSO (Ren & Greer, 2006), orexin A (O6012, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and almorexant (ACT-078573, (2R) - 2 - { (1S) - 6,7 – dimethoxy - 1 - [2 - (4 - trifluoromethylphenyl) -

ethyl] - 3,4 – dihydro - 1Hisoquinolin- 2 - yl } - N-methyl – 2 - phenyl-acetamide) both prepared in saline. Almorexant is a specific competitive antagonist of orexin receptor 1 (OXR1) and orexin receptor 2 (OXR2), supplied generously by the pharmaceutical company Actelion (Li & Nattie, 2010). Drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) to the required concentration just prior to the experiment.

#### Ex vivo preparations of isolated central nervous system

#### Surgery

Under deep cold anaesthesia (Danneman & Mandrell, 1997), medullary-spinal cord (MS), ponto-medullary-spinal cord (PMS), brainstem-spinal cord (BS) and diencephalon-brainstem-spinal cord (DBS) preparations were isolated as previously described (Suzue, 1984; Okada *et al.*, 1998; Voituron *et al.*, 2005; Loiseau *et al.*, 2014). In all cases, a caudal section was made between the seventh and eighth cervical spinal nerve roots. Among type of preparations, the level of the rostral section differed: at the level of the anterior inferior cerebellar arteries just caudal to the VIII cranial nerve exit points for MS preparations, rostral to the fifth cranial nerves at the level of the superior cerebellar arteries and caudal edge of inferior colliculi for PMS preparations, at the level of the intersection between posterior cerebral and posterior communicating arteries for BS preparations and at the level of the rostral extremity of the optic chiasm for DBS preparations.

#### Electrophysiological recording

Preparations were placed in a recording chamber (ventral surface facing upward), superfused at 10 mL·min<sup>-1</sup> with aCSF (in mM: 129 NaCl, 3.35 KCl, 1.15 MgCl<sub>2</sub>

6H<sub>2</sub>O, 0.58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 30 D-glucose, 1.26 CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O and NaHCO<sub>3</sub> at different concentrations according to the experimental condition (Murakoshi et al., 1985)) maintained at 26  $\pm$  1 °C, saturated with O<sub>2</sub> and adjusted to pH by bubbling with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Normal pH-aCSF (pH 7.4) and metabolic acidosis-aCSF (pH 7.23) differ from each other in terms of NaHCO3 concentration (21 mM and 15 mM respectively) (Loiseau et al., 2014). The electrical activity of a fourth cervical ventral nerve root (C4) was recorded using a suction electrode, filtered (300-1000 Hz), amplified (x10000; Differential AC Amplifier Model 1700; A-M systems), integrated (time constant 100 ms) and digitized through a PowerLab 4SP, with a sampling frequency of 2500 Hz, visualized and analysed through LabChart 7.2 data acquisition and analysis software (ADInstruments, Castle Hill, Australia). As previously reported, the f<sub>R</sub> was defined as the burst frequency recorded from C4 over 1 minute (burst min<sup>-</sup> <sup>1</sup>) (Suzue, 1984; Loiseau *et al.*, 2014; Joubert *et al.*, 2016). In a first set of experiments, consistently with previous observations (Straus et al., 2010; Joubert et al., 2016), we did not observe any qualitative change in integrated C4 burst activity, which was regarded as an index of inspiratory activity, and thus decide to focalize our analysis on f<sub>R</sub>.

#### **Experimental protocols**

Once performing the surgery, all preparations were stabilised for 30 min in normal pH-aCSF. Baseline values were defined as the mean value over the last 10 min of this period.

Determination of etonogestrel effect on the respiratory response to metabolic acidosis on MS, PMS, BS and DBS ex vivo preparations

After stabilisation and prior to exposition to metabolic acidosis-aCSF, preparations were superfused 15 min with normal pH-aCSF without drugs or supplemented with either DMSO (at 0.01%, according to ETO solubility in DMSO) or ETO (at  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-1}$ , 1 or 2  $\mu$ M in 0.01% DMSO) to overcome a potential drugs effect in normal pH condition. The mean f<sub>R</sub> value obtained during the last 5 min of this period was referenced as pre-metabolic acidosis value. Then, preparations were superfused with metabolic acidosis-aCSF without drugs or supplemented with either DMSO or ETO for 30 min, *i.e.* metabolic acidosis test period. The calculated mean f<sub>R</sub> over the last 5 min of the metabolic acidosis test period was referenced as metabolic acidosis test period.

As a control, preparations were superfused, after stabilisation, with either DMSO (0.01%) or ETO at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M in normal pH condition for 30 min *i.e.* normal pH test period. The mean value obtained during the last 5 min of the normal pH test period was expressed relative to baseline values.

### Determination of the potential involvement of orexinergic systems in etonogestrel effect on the respiratory response to metabolic acidosis

In order to determine the necessary and sufficient concentration of antagonist (almorexant), which suppresses the effect of the agonist (orexin), we firstly have appreciated orexin effect on  $f_R$  at different concentrations on the most complete preparations, DBS. Based on data of the literature, orexin A was applied at 5·10<sup>-4</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> and 10<sup>-1</sup>  $\mu$ M (Sugita *et al.*, 2014; Umezawa *et al.*, 2015). The  $f_R$  was analysed over 1 min after 15 min of exposure and expressed relative to baseline values

(Sugita *et al.*, 2014; Umezawa *et al.*, 2015). Because the optimal effect was observed at  $10^{-2} \mu$ M this concentration was selected for subsequent experiments.

Also on DBS preparations, almorexant effect on  $f_R$  in normal pH condition was analysed at  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-1}$ , and 5  $\mu$ M. The choice of the tested concentration was made on the basis of data of the literature (Brisbare-Roch *et al.*, 2007). The effect on  $f_R$  was assessed by comparing the mean  $f_R$  over 1 min after 15 min of exposition to baseline values. The concentration of  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M was selected for subsequent experiments to avoid non-specific effect of the molecule.

To determine if almorexant at  $5 \cdot 10^{-2} \ \mu$ M completely blocked orexinergic signalling, co-application of almorexant and orexin A ( $10^{-2} \mu$ M) were performed on DBS preparations. After stabilisation, the preparations were preincubated with normal pH-aCSF containing almorexant for 15 min before being exposed to normal pH-aCSF containing both almorexant and orexin A for 15 min. The effect of orexin A exposure under almorexant was assessed by comparing the mean f<sub>R</sub> calculated over the last min of the period of co-application to both baseline values and the values obtained under orexin A alone. Based on our observations, the concentration of  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M of almorexant was chosen as the concentration necessary and sufficient to eliminate orexin A effect on f<sub>R</sub>.

ETO effect on the respiratory response to metabolic acidosis under antagonization of orexinergic signalling was evaluated by co-applying almorexant  $5 \cdot 10^{-2}$  µM and ETO  $5 \cdot 10^{-1}$  µM. After stabilisation, DBS preparations were exposed for 15 min to almorexant in normal pH-aCSF. Afterwards, preparations were superfused during 15 min with normal pH-aCSF containing almorexant with either DMSO or ETO. This period was followed by 30 min of superfusion under metabolic acidosis-aCSF containing the same pharmacological agents *i.e.* almorexant and DMSO or almorexant

and ETO. The effect on  $f_R$  of the co-application almorexant/DMSO or almorexant/ETO under normal pH condition was assessed by comparing the mean calculated over the last 5 min of these exposures *i.e* pre-metabolic acidosis value to baseline values. ETO effect on the metabolic acidosis response under almorexant was assessed by comparing the mean calculated over the last 5 min of metabolic acidosis period to pre-metabolic acidosis value. These results were then compared to those obtained in absence of almorexant.

#### Immunohistochemistry

#### Immunohistochemical procedures

To identify ETO-induced change in cell activity, immunohistochemical detection of c-FOS was performed on DBS preparations exposed to normal pH or metabolic acidosis conditions under DMSO alone or ETO  $5 \cdot 10^{-1}$  µM alone. After protocol completion, preparations were fixed by immersion in a solution of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 48 H at 4 °C, before being cryoprotected for 72 H in 30% sucrose in phosphate buffer 0.1 M. C-FOS immunohistochemical detection was performed on serial free-floating coronal sections (40 µm) obtained using a cryostat (Leica CM 1510S, Heidelberg, Germany). The sections were processed as follows: they were incubated (48 H, 4 °C) with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-253; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA, 1:10000, in 1% BSA) before being incubated at room temperature 2 H, with a biotinylated goat anti-rabbit IGg antibody (Vector Laboratories, Burlington, Canada, 1:500) and then 1 H with an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Novostain Super ABC kit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK, 1:250). Peroxidase activity was detected using a solution containing 0.02% 3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride,

0.04% nickel ammonium sulfate and 0.01%  $H_2O_2$  in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), which results in a gray/blue chromogen.

To specifically analyse changes in cell activity in orexin neurons, dual detection of c-FOS and orexine A was made on DBS preparations exposed to metabolic acidosis conditions under DMSO alone, ETO  $5 \cdot 10^{-1}$  µM alone, almorexant/DMSO and almorexant/ETO  $5 \cdot 10^{-1}$  µM exposure. After the c-FOS detection as described above, sections were incubated (48 H, 4 °C) with a goat polyclonal antibody against orexin A (sc-8070, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA, 1:2000, in 1% BSA), followed by an incubation at room temperature for 2 H with a biotinylated rabbit anti-goat IGg antibody (Vector Laboratories, Burlington, Canada, 1:500) and then 1 H with ABC (1:250). Peroxidase activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris buffer (pH 7.6) resulting in a brown chromogen.

For single or dual detections, control sections were processed in parallel, but with the omission of primary or secondary antibodies. No labelling was observed on control sections.

Sections were mounted in sequential caudo-rostral order on silanized slides, air-dried and coverslipped with Entellan (VWR, International S.A.S).

#### Cell counting

C-FOS and c-FOS/orexin immunolabeled cells were visually counted under a light microscope (Leica DM 2000; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) at high magnification (X200, X400) in brainstem and diencephalic structures involved in CRD elaboration or adaptation using standard landmarks (Paxinos & Watson, 1998). Illustrations of the distribution of immunolabelled cells were made by

microphotographies realised with a digital camera (Leica DFC450C, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Along the medulla oblongata, c-FOS positive cells were counted in the commissural, medial and ventrolateral parts of the nucleus tractus solitarius (cNTS, mNTS and vINTS respectively), parapyramidal group (PP, at the lateral edge of the pyramidal tract extending from the pyramidal decussation to the caudal edge of the facial nucleus (Voituron et al., 2006)), medullary raphe nuclei *i.e.* raphe pallidus (RPa), raphe obscurus (ROb) and raphe magnus (RMg) nuclei, medial and lateral part of the RTN/pFRG region and in the ventrolateral medullary reticular nucleus (VLM; a neuronal column ventral to the nucleus ambiguus extending from the pyramidal decussation to the caudal edge of the facial nucleus that encompass the preBotC and A1C1 group of neurons (Voituron et al., 2011)). In the pons, c-FOS positive cells were counted in the locus coeruleus (LC), A5 region, lateral subnuclei of the parabrachial nucleus (IPB) and in the medial subnuclei of the parabrachial nucleus and Kölliker-Fuse nucleus (mPB/KF). In the mesencephalon, c-FOS positive cells were counted in the dorsomedian, dorsolateral, lateral and ventrolateral parts of the periaqueductal gray matter (dPAG, dIPAG, IPAG and vIPAG respectively). In the diencephalon, single-labeled (c-FOS) or double-labeled (c-FOS/orexin) cells were counted in the lateral and posterior hypothalamic area (LH and PH, respectively), dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and in the perifornical region (PeF). For each structure the mean number of c-FOS positive cells and c-FOS/orexin positive cells per section have been quantified.

#### **Statistics**

Data were expressed as mean ( $\pm$  SEM) and analysed with GraphPad (GraphPad Prism5 San Diego California USA). For f<sub>R</sub>, c-FOS and c-FOS/orexin values,

the normality of data distribution was appreciated using the d'Agostino & Pearson omnibus normality test. Depending on normality, parametric or non-parametric tests were made. Effect on  $f_R$  induced intragroup by an experimental condition was appreciated using a one-sample t test or a Wilcoxon signed rank test. Comparison of the effect on  $f_R$  between 2 groups were performed using two-tailed unpaired t test. In order to highlight differences induced by experimental conditions between more than 2 groups, the  $f_R$  or the percentage of change of  $f_R$  were compared intergroup using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, or using Kruskal-Wallis follow by Dunn's multiple comparison test. The mean number of c-FOS positive cells and c-FOS/orexin cells per section were compared between two conditions using Mann Whitney one-tailed or two-tailed depending on the stated hypothesis. Differences were considered significant for p<0.05.

#### RESULTS

#### **Baseline respiratory frequency**

Baseline  $f_R$  was at 7.35 ± 0.23 bursts·min<sup>-1</sup> for DBS (n=206), 5.47 ± 0.59 bursts·min<sup>-1</sup> for BS (n=30), 4.51 ± 0.50 bursts·min<sup>-1</sup> for PMS (n=30) and 8.87 ± 0.30 bursts·min<sup>-1</sup> for MS (n=33) preparations. The  $f_R$  of DBS preparations was significantly higher than the  $f_R$  developed by BS (p<0.01) and PMS (p<0.001) preparations but it was significantly lower than that of MS preparations (p<0.01).

Etonogestrel strengthened the respiratory response to metabolic acidosis in a in a small range of concentration close to that encountered during clinical exposure

In response to metabolic acidosis, DBS preparations superfused without drugs or exposed to DMSO have exhibited a similar significant increase in f<sub>R</sub> (+30.80 ± 7.87 %, n=9, p<0.01 and +31.57 ± 4.65 %, p<0.0001, respectively). In preparations exposed to ETO at  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M, 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M, the increase in f<sub>R</sub> induced by metabolic acidosis (+39.88 ± 6.45 %, p<0.001, +64.20 ± 19.31, p<0.05 and +33.60 ± 12.50 %, p<0.05, respectively) was not significant from that observed in preparations exposed to DMSO even if it tended to be increased under 1  $\mu$ M of ETO (Fig 1). In contrast, the increase in f<sub>R</sub> induced by metabolic acidosis under ETO at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M (+110.80 ± 26.52 %, p<0.01) was significantly more important than that observed in preparations exposed to DMSO (approximately +79 %, p<0.01) (Fig 1). This strengthening of the increase in f<sub>R</sub> was also significantly more important than that was observed on preparations exposed to ETO at  $5 \cdot 10^{-2}$  and 2  $\mu$ M (approximately: +71 %, p<0.05 and + 77 %, p<0.01 respectively) (Fig 1). Note that ETO at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M under normal pH condition didn't induce a significant increase in f<sub>R</sub> (DMSO: +17.50 ± 11.20 %, n=24 *vs* ETO: +36.50 ± 8.1 %, n=12).

In view of these results, subsequent experiments involving ETO were performed at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M, the effective dose of the progestin.

# The strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel depended on the presence of the diencephalon

As observed above in DBS preparations, without drug exposure metabolic acidosis induced a significant increase in  $f_R$  in BS (+23.80 ± 6.51 %, n=10, p<0.01),

PMS (+13.1 ± 4.19 %, n=10, p<0.05) and MS (+21.30 ± 6.52 %, n=8, p<0.05) preparations, which was equivalent to those observed under DMSO (BS: +33.90 ± 12.98 %, p<0.05; PMS: +36.4 ± 8.58 %, p<0.01; MS: +34.00 ± 5.76 %, p<0.01) (Fig 2). The comparison of the increases in f<sub>R</sub> developed by all the types of preparations (DBS, BS, PMS, MS) under metabolic acidosis in presence of DMSO shown that the respiratory response to metabolic acidosis was of the same magnitude whatever the rostral extension of the studied preparations (Fig 2). In addition, at the concentration under which ETO strengthened the respiratory response to metabolic acidosis in DBS preparations ( $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M), the progestin did not produce such an effect in preparations lacking diencephalic structures. Indeed BS, PMS, and MS displayed a significant increase in f<sub>R</sub> in response to metabolic acidosis under ETO (BS: +29.10 ± 10.58 %, p<0.05; PMS: +48.40 ± 17.96 %, p<0.05; MS +22.30 ± 7.04 %, p<0.05) similar to that observed in their respective control group exposed to DMSO (Fig 2).

Etonogestrel modified the *c-fos* expression induced by metabolic acidosis in central structures involved in the elaboration and/or regulation of the central respiratory drive

Under normal pH condition etonogestrel did not induce any changes in c-fos expression

As a first step, the quantification of the number of c-FOS positive cells was performed on DBS preparations superfused with either DMSO or ETO ( $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M) in normal pH condition in order to determine the potential ETO-induced changes of cell activity independent from the metabolic acidosis stimulation. In accordance with the fact that f<sub>R</sub> under normal pH condition was not significantly modified by ETO, the
quantification revealed no significant difference in the number of c-FOS positive cells between DMSO or ETO exposure (Table 1).

Without etonogestrel, metabolic acidosis induced an increase in number of c-FOS positive cells

As a second step, we analysed whether metabolic acidosis has stimulated *c-fos* expression in brainstem and diencephalic structures. It resulted from this analyse that, compared to normal pH condition, metabolic acidosis induced a significant increase in the number of c-FOS positive cells at the level of the *medulla oblongata* in the VLM ( $25.28 \pm 1.96 \text{ vs} 13.75 \pm 1.70, \text{ p} < 0.01$ ), vINTS ( $5.02 \pm 0.72 \text{ vs} 1.72 \pm 0.35, \text{ p} < 0.05$ ), PP ( $6.08 \pm 0.35 \text{ vs} 2.67 \pm 0.59, \text{ p} < 0.01$ ) and medial part of the RTN/pFRG region ( $23.05 \pm 2.36 \text{ vs} 14.68 \pm 2.68, \text{ p} < 0.05$ ), at the level of the pons in the LC ( $22.40 \pm 7.30 \text{ vs} 2.99 \pm 0.65, \text{ p} < 0.05$ ), at the level of the diencephalon in the vIPAG ( $7.34 \pm 7.30 \text{ vs} 1.28 \pm 0.38, \text{ p} < 0.05$ ) and at the level of the diencephalon in the PeF ( $3.95 \pm 1.14 \text{ vs} 0.73 \pm 0.15, \text{ p} < 0.05$ ) (Table 1). Additionally, although not significant, the number of c-FOS positive cells of the mPB/KF in the pons and the diencephalic PH tended to be increased under metabolic acidosis compared to normal pH ( $10.41 \pm 2.29 \text{ vs} 0.82 \pm 0.2 \text{ and } 14.79 \pm 3.08 \text{ vs} 4.82 \pm 1.08, \text{ respectively}; Table 1$ ).

Etonogestrel strengthened the metabolic acidosis-induced increase in number of c-FOS positive cells in some brainstem respiratory structures

DBS preparations exposed to ETO at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M displayed a number of c-FOS positive cells under metabolic acidosis more important than that observed under DMSO without the progestin at the *medulla oblongata* level, in the VLM (59.21 ± 10.33)

 $vs 25.28 \pm 1.96$ , p<0.01) and vINTS (34.18  $\pm 3.02 vs 5.02 \pm 0.72$ , p<0.001), at the pontine level in the LC (67.63  $\pm 10.02 vs 22.40 \pm 7.03$ , p<0.05), and at the mesencephalon level, in the vIPAG (22.67  $\pm 4.92 vs 7.34 \pm 1.96$ , p<0.05) (Fig 3 and 4, Table 1).

Etonogestrel induced increase in the number of c-FOS positive cells under metabolic acidosis in central structures not activated without the progestin

Exposure to ETO also induced under metabolic acidosis a significant increase in the number of c-FOS positive cells compared to DMSO exposure in structures not activated by metabolic acidosis without the progestin: at the *medulla oblongata* level in the cNTS (78.13 ± 11.25 vs 17.89 ± 2.08, p<0.001), mNTS (103.06 ± 15.04 vs 8.45 ± 1.60, p<0.001), RPa (15.88 ± 2.79 vs 7.03 ± 0.87, p<0.05) and ROb (18.7 ± 3.46 vs 4.8 ± 1.04, p<0.01) and at the mesencephalon level in the IPAG (29.24 ± 7.76 vs 6.01 ± 1.74, p<0.05) (Fig 3 and 4, Table 1).

Etonogestrel increased the number of orexin neurons c-FOS positive under metabolic acidosis condition

The analysis of ETO effect under metabolic acidosis performed on the different types of *ex vivo* preparations suggested that the ETO effect on respiratory response depended on the presence of the diencephalon. Surprisingly, as stated above, we did not observe a change of number of c-FOS positive cells induced by ETO in the caudal hypothalamus, which encompass DMH, LH, PH and PeF (Table 1). Based on data of the literature having demonstrated that first orexin neurons are CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive (Williams *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013) and second that they projected to all of the brainstem structures displaying an increase or over-increase in the number

of c-FOS positive cells (Peyron *et al.*, 1998; Date *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Ohno & Sakurai, 2008; Huang *et al.*, 2010; Shahid *et al.*, 2012; Darwinkel *et al.*, 2014), we searched for a specific effect of ETO on orexinergic neurons that are scattered in these areas (Williams *et al.*, 2007). By this way, we observed that ETO induced an increase in the proportion of the number of co-positive neurones for c-FOS and orexin compared to DMSO under metabolic acidosis in the caudal hypothalamus (11.91  $\pm$  3.0 % *vs* 4.85  $\pm$  1.38 %, p<0.05) (Fig 5).

## Orexinergic systems were involved in the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel

In order to further investigate the involvement of orexinergic systems in the ETO effect, we analysed the effect of ETO whereas orexinergic systems were blocked by the OX1R/OX2R antagonist almorexant. Before this experimental set, it had first been necessary to determine the orexinergic influence on f<sub>R</sub> for thereafter determining the sufficient and necessary concentration of almorexant able to abolished the orexinergic respiratory influence.

#### Orexin A induced an increase in $f_R$ on DBS under normal pH condition

DBS preparations presented a significant rise of the f<sub>R</sub> when exposed to orexin A at  $10^{-3}$  (+47.62 ± 7.23 %, p<0.05) and  $10^{-2}$  µM (+48.9 ± 7.14 %, p<0.05) (Fig 6A). At the opposite, orexin A failed to induce an increase in f<sub>R</sub> at  $10^{-4}$  (+10.32 ± 7.31 %), 5·10<sup>-4</sup> (+3.50 ± 9.69 %) and  $10^{-1}$  µM (+13.40 ± 4.40 %) (Fig 6A). In the following, the

concentration of orexin A selected as the concentration so that the entire effect operates was  $10^{-2} \,\mu$ M.

# Almorexant completely blocked orexin A-induced increase in $f_R$ in DBS under normal pH condition

Exposing DBS preparations to almorexant at  $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M did not induce change of f<sub>R</sub> (+9.90 ± 6.27 %, n=8). In contrast at higher concentrations, it led to a significantly increase f<sub>R</sub> (5 \cdot 10<sup>-1</sup>  $\mu$ M: +19.60 ± 7.66 %, n=7, p<0.05; and 5 $\mu$ M: +32.70 ± 9.37 %, n=9, p<0.01). In view of these results and according to data of the literature (Brisbare-Roch *et al.*, 2007; Li & Nattie, 2010), subsequent experiments involving almorexant were performed at 5 \cdot 10<sup>-2</sup>  $\mu$ M.

Under blocking of OX1R and OX2R by almorexant ( $5 \cdot 10^{-2} \mu$ M), orexin A at  $10^{-2} \mu$ M failed to induce the significant increase in f<sub>R</sub> observed in absence of the antagonist (+1.80 ± 5.14 % *vs* +48.9 ± 7.14 %, p<0.001, respectively) (Fig 6B). Exposing DBS preparations to almorexant at 5  $10^{-2} \mu$ M was thus considered to be sufficient for abolishing orexin A respiratory effect.

### Blocking the orexinergic systems by almorexant totally suppressed the strengthening of respiratory response to metabolic acidosis induced by etonogestrel

DBS preparations superfused with normal pH-aCSF containing either almorexant/DMSO or almorexant/ETO  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M didn't display any change in their f<sub>R</sub> (+9.20 ± 5.18 % and +3.9 ± 6.58 %, respectively).

Under DMSO, almorexant did not change the increase in  $f_R$  induced by metabolic acidosis; DBS preparations exposed to almorexant/DMSO presented a

significant increase in f<sub>R</sub> (+28.97 ± 5.40 %, p<0.01) not significantly different to that observed in absence of almorexant (+31.57 ± 4.65 %; Fig 6C). On the other hand, under blocking of OX1R/OX2R receptors, the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by ETO was lost: DBS preparations exposed to almorexant/ETO at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M displayed an increase in f<sub>R</sub> similar to that observed under almorexant/DMSO exposure (+27.50 ± 9.70 %, p<0.05 *vs* +28.97 ± 5.40 %; Fig 6C). This increase in f<sub>R</sub> under almorexant/ETO exposure was significantly lower to that observed under ETO exposure at  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M (+110.80 ± 26.52, p<0.01; Fig 6C).

Blocking OX1R and OX2R by almorexant prevented the increase in c-fos expression induced by etonogestrel under metabolic acidosis in most of the structures modulated by the progestin

Under antagonization of orexinergic signalling, ETO failed to induce an increase in *c*-fos expression in most of the structures, which were over-activated or activated by ETO in absence of almorexant. Indeed under almorexant exposure, the number of c-FOS positive cells under ETO was no longer statistically different compared to that observed under DMSO at the *medulla oblongata* level in the cNTS ( $30.70 \pm 4.69 vs$  $30.87 \pm 1.19$ ), vINTS ( $5.41 \pm 1.10 vs 6.77 \pm 0.89$ ), mNTS ( $11.58 \pm 2.27 vs 6.25 \pm 1.37$ ) and VLM ( $27.97 \pm 2.14 vs 22.27 \pm 1.70$ ), at the pontine level in the LC ( $8.33 \pm 2.79 vs$  $1.67 \pm 0.70$ ), and at the mesencephalic level in the IPAG ( $2.77 \pm 0.33 vs 2.13 \pm 0.36$ ) and vIPAG ( $4.43 \pm 0.73 vs 2.13 \pm 0.36$ ) (Table 2). At the opposite, under almorexant/ETO exposure, both RPa and ROb, two structures activated by ETO while orexinergic systems were functional (Table 1), have presented a number of c-FOS positive cells still higher compared to almorexant/DMSO exposure: ROb ( $3.8 \pm 0.81 vs$  $1.61 \pm 0.11$ , p<0.05), RPa ( $15.29 \pm 0.53 vs 13.39 \pm 1.19$ , p<0.05) (Table 2).

206

Lastly, the proportion of orexin immunoreactive cells among the population of c-FOS positive cells in the caudal hypothalamus was significantly lower under almorexant/ETO compared to ETO alone ( $4.06 \pm 0.69 \% vs 11.91 \pm 3.00 \%$ , respectively).

#### DISCUSSION

This study was dedicated to the characterization of central mechanisms underlying the effect of ETO, a progestin of the gonane family, on the respiratory response to metabolic acidosis as a model of hypercapnia. The interest for this progestin provides from clinical serendipitous observation on CCHS patients suggesting that desogestrel, the prodrug of ETO, may have been involved in a recovery of the CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity (Straus *et al.*, 2010). By coupling electrophysiological recordings with ETO application on *ex vivo* CNS preparations, we obtained data suggesting that the progestin strengthens the respiratory response to metabolic acidosis first, in a small range of concentration and second, in the presence of the diencephalon. Furthermore, by the use of functional immunohistochemical approach, we demonstrated that orexinergic systems were involved in the strengthening by ETO of both the respiratory response to metabolic acidosis and the recruitment of respiratory brainstem structures known to exert a facilitatory influence on the CRD.

## In absence of etonogestrel, the metabolic acidosis induced an increase in $f_R$ and *c-fos* expression in medullary and supramedullary structures

Whatever the *ex vivo* preparation *i.e.* MS, PMS, BS and DBS, we observed an increase in  $f_R$  in response to metabolic acidosis similar to that previously described

(Harada *et al.*, 1985; Kawai *et al.*, 2006; Gestreau *et al.*, 2010; Voituron *et al.*, 2010; Corcoran *et al.*, 2015). This increase in  $f_R$  was concomitant to an increase in the number of c-FOS positive cells in the VLM. As already discussed in contexts others than metabolic acidosis, the increase in *c-fos* expression in this structure is consistent with an increase in the CRD (Okada *et al.*, 2002; Teppema *et al.*, 1997; Bodineau & Larnicol, 2001; Saadani-Makki *et al.*, 2004; Voituron *et al.*, 2005; Joubert *et al.*, 2016). Indeed, the VLM contains the ventral respiratory group, a neuronal functional unit controlling the CRD that includes the inspiratory generator preBotC, (Smith *et al.*, 1991; Bianchi *et al.*, 1995; Richter & Spyer, 2001). Changes of cell activity in the VLM suggested by *c-fos* expression may thus be involved in the observed changes of  $f_R$ under metabolic acidosis condition.

The origin of the increase in both  $f_R$  and c-FOS-positive numbers of cell in the VLM may be associated with the stimulation by metabolic acidosis of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive cells. In such a way, our analysis of the *c*-fos expression suggested an increase in activity in the RTN/pFRG region that is considered as the main CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive site (Mulkey *et al.*, 2004; Putnam *et al.*, 2004; Guyenet & Bayliss, 2015; Kumar *et al.*, 2015). Interestingly, in our analysis we have distinguished the medial and lateral parts of the RTN/pFRG region, and observed a significant increase in *c*-fos expression induced by metabolic acidosis only in the medial part that corresponds to the initial anatomical description of the RTN (Smith *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 1989). Such a specialization of the medial and lateral parts of the RTN/pFRG region has already be discussed in the literature under hypoxic and hypercapnic conditions (Voituron *et al.*, 2006; Huckstepp *et al.*, 2015). In addition to the medial part of RTN/pFRG region, others medullary and supramedullary structures displayed an increase in *c*-fos expression and thus may be involved in the increase in both f<sub>R</sub> and *c*-

fos expression in the VLM *i.e.* the vINTS, PP, LC, vIPAG and PeF. Indeed, all these structures contain CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitive neurons and have been demonstrated as delivering excitatory influence on the VLM (Coates et al., 1993; Ryan & Waldrop, 1995; Horn & Waldrop, 1998; Oyamada et al., 1998; Stornetta & Guyenet, 1999; Mellen et al., 2003; Janczewski & Feldman, 2006; Li & Nattie, 2006; Ribas-Salgueiro et al., 2006; Stornetta et al., 2006; Biancardi et al., 2008; Pagliardini et al., 2011; Li et al., 2013). But, surprisingly, present results shown that the addition of pontine, mesencephalic and diencephalic regions to the medulla oblongata did not modify the increase in fR induced by metabolic acidosis suggesting that LC, vIPAG and PeF did not participate. This result may be explained by the fact that in our deafferented model of newborn rat, the contribution of these encephalic regions to the respiratory response to metabolic acidosis was of a lesser extend compared to what happen in an afferented adult model (Berquin et al., 2000; Guyenet, 2014). In such a way, by investigating the developmental pattern of *c-fos* expression evoked by hypoxia in rats, it had been shown that the number of c-FOS positive neurons in CRD-related structures markedly increased during the 2 first postnatal weeks, suggesting that the immaturity of the CNS may underlie the lesser participation of respiratory structures in respiratory adaptations (Berquin *et al.*, 2000). Our hypothesis was thus that a such immaturity is responsible for a weak influence of activated supramedullary structures under acidosis conditions.

An enhancement of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel was observed in a small range of concentration close to that encountered during clinical exposure

In accordance with our exploratory study, we shown that ETO exposure induced a strengthening of the increase in  $f_R$  induced by metabolic acidosis on DBS

209

preparations (Loiseau et al., 2014). Interestingly, testing of different concentrations of the progestin shown that it was efficient to do so in a relatively small range of concentration with a significant increase at 5.10<sup>-1</sup>  $\mu$ M and a tendency at to 1  $\mu$ M. Based on the fact that CCHS patients who have presented a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity received daily 75 µg of desogestrel and considering the absolute biodisponibility and free fraction of ETO (approximately: 74 % and 2 %, respectively), we can therefore consider that 5.10<sup>-2</sup> µM is the nearest concentration of the human exposure (Back et al., 1987; Schindler et al., 2003; Straus et al., 2010). However this concentration is probably underestimated regarding the study of Pardridge and Mietus, which by investigating the transport of steroid hormones through the blood-brain barrier in rats have shown that the progesterone plasmatic fraction available for transport through the blood-brain barrier is not limited to the free fraction but also includes a portion of the progesterone-bound fraction (Pardridge & Mietus, 1979). Thus taking into account these data from the literature and our data, we suggest that in CCHS patient who did not have presented a recovery of the CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity under desogestrel (Li, 2013), the central dose of etonogestrel, the active molecule, must be inappropriate. At the opposite, in CCHS patients displaying a such recovery (Straus et al., 2010), the concentration of the progestin in the CNS was sufficient to produce an effect. In such a hypothesis, the difference in progestin effect between CCHS patients may be associated to differences in the ETO metabolism or in the brain-blood barrier permeability for the steroids. Although these hypotheses necessitate further investigations to be validate, present data suggest that the quantity of desogestrel to administer have to be adjust on a case by case to find the effective dose.

## Diencephalic orexinergic neurons were necessary to the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis induced by etonogestrel

Our exploratory study has shown that in absence of supramedullary structures, ETO did not increase the respiratory response to metabolic acidosis (Loiseau et al., 2014). In the present work, using an approach of CNS stepped sections, we show that ETO did not induce the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by interacting directly on pontine and mesencephalic structures; the ETO effect relied on activation of mechanisms, which required the presence of diencephalic structures. According to previous studies demonstrating the presence of hypercapnia-stimulated neurons independently of peripheral chemoreceptors (Cross & Silver, 1963; Dillon & Waldrop, 1993), we have assumed that these neurons were implicated in enhancing the increase in f<sub>R</sub> induced by ETO. In such a hypothesis, it is important to mention that it has been suggested that the diencephalon, and especially the hypothalamus, mediate the facilitating effects of progesterone on CRD (Bayliss et al., 1990; Bayliss & Millhorn, 1992). The analysis of *c-fos* expression in DMH, LH, PH and PeF, which together constitute the caudal hypothalamus, revealed that ETO did not induce a significant increase in the number of c-FOS positive neurons in these specific structures. We therefore focussed our analysis on orexinergic neurons that are scattered in these structures and whose data from the literature were in favour of their involvement (Williams et al., 2007; Song et al., 2012; Li et al., 2013)(Peyron et al., 1998; Date et al., 1999). The quantification of the proportion of c-FOS positive neurons, which were also immunoreactive for orexin, has revealed that the exposure to ETO led to a significant increase in the number of c-FOS/orexin-containing neurons. We therefore hypothesised that the diencephalic orexinergic neurons were the key

neuronal diencephalic population required for the ETO-induced strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis.

Electrophysiological recordings performed on DBS preparations in presence of almorexant, a specific competitive antagonist of OXR1 and OXR2 previously used in vivo to investigate the respiration-related effect of orexinergic signalling (Li & Nattie, 2010), consolidated the assumption of an involvement of orexinergic signalisation in ETO effect. The pharmacological co-applications revealed that in presence of almorexant ETO failed to induce a strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis, suggesting that ETO effect is mediated by orexinergic signalling through OX1R and OX2R. Obviously, the total dependence of the effect of ETO on orexinergic neurons needs to be demonstrated in a more complete model and the mechanism initiated by ETO to activate orexinergic neurons remains to be determined. On this subject, we hypothesised that ETO acts on an unidentified target expressed by orexinergic neurons and that metabolic acidosis is an essential co-factor. Since the discovery of orexinergic neurons, several lines of evidence have emerged about the fact that they display a CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity and contribute to the respiratory response to hypercapnia through OX1R and OX2R (Deng et al., 2007; Williams et al., 2007; Dias et al., 2009; Sunanaga et al., 2009; Dias et al., 2010; Li & Nattie, 2010; Song et al., 2012; Li et al., 2013; Vicente et al., 2016). It has been argued that the mechanism, which underpinned orexinergic neurons CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosentivity, involve the acid-sensing ion channels 1a (ASIC1a), an H<sup>+</sup>-gated neuronal voltage-insensitive cation channels permeable to both Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. Indeed ASIC1a are expressed in orexin-containing neuron and the increase in phrenic nerve discharge observed after by focal acidification of the LH is abolished both by specific destruction of orexinergic neurons and in the presence of an ASIC1a antagonist (Song et al., 2012). Within the

ASIC channel family, ASIC1a is the only one able to respond to pH fluctuations in a physiological range (Song et al., 2012). As exposure to ETO was brief (45 min), we assume that the observed effect on f<sub>R</sub> could be related to non-genomic rather than genomic effects. Furthermore, the hypothesis that ETO exerts its effect via cognate progesterone membrane receptors seems unlikely since it has been shown that progesterone and medroxyprogesterone (a progestin from the pregnane family) have not been able to improve ventilation and to induce a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in CCHS patients (Weese-Mayer et al., 1992; Sritippayawan et al., 2002 2144). ETO effect could therefore depend on an interaction with other cellular targets such as receptors to other neurotransmitters. To our knowledge no data are currently available about a possible regulation to ASIC1a by steroids. Based on data of the literature we suggested that ETO might act through NMDA receptor because (i) according to patch clamp recordings it have been suggested that orexinergic neurons express NMDA receptor (Yamanaka et al., 2003; Eyigor et al., 2012), (ii) endogenous and synthetic steroids have been described as allosteric modulators of the NMDA receptor (Wu et al., 1991 2127; Park-Chung et al., 1994 2254; Weaver et al., 2000 2255; Stastna et al., 2009 2256) and (Dean et al.) a previous study made in our laboratory has shown that ETO potentiate the NMDA-induced increase in fR on ex vivo preparations of newborn mice (Joubert et al., 2016). These data have to be put in perspective with a study describing a functional interaction between ASIC1a and NMDA receptors. It has been shown that following ASIC1a phosphorylation on serine 478 and 479, the currents mediated by ASIC1a in response to extracellular acidification were significantly increased. The ASIC1a phosphorylation relies on the activation of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II (CamKII), which is activated following NMDA receptors-induced Ca<sup>2+</sup> influx (Gao et al., 2005 2164). The increase in the

ASIC1a currents is no longer observable when the experiments are carried out in the presence of NMDA receptor antagonist, a CamKII inhibitor, or when serine 478 and 479 are replaced by alanine (Gao *et al.*, 2005 2164). By transposing these data to our results, we hypothesized that ETO activated orexinergic neurons by exerting a positive allosteric modulation of the NMDA receptor, which leads to strengthening the increase in the currents induced by ASIC1a stimulation in response to metabolic acidosis. Whether by this mechanism or by another, the activation of orexinergic neurons by ETO is therefore likely to cause the enhancement of the increase in f<sub>R</sub> under metabolic acidosis.

The strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel was accompanied by a *c-fos* over-expression or *de novo c-fos* expression in respiratory-related brainstem structures mediated or not by orexinergic signalling

The c-FOS analysis performed on the DBS preparations exposed to ETO under metabolic acidosis revealed that several respiratory-related brainstem structures have displayed an increase in *c-fos* expression. Among these structures some of them have been over-activated (vINTS, VLM, LC and vIPAG) in the way that exposition to ETO have induced a strengthening of the metabolic acidosis-induced increased in *c-fos* expression. Some other respiratory-related structures, for their part, have been activated (cNTS, mNTS, RPa, ROb and IPAG) in response to ETO since they have induced *de novo c-fos* expression. Our hypothesis is that the over-activation or *de novo* activation of totality or part of these structures were involved in the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by ETO. Indeed anatomical and or functional connexion have been described between VLM and all these structures

(Miles, 1983; Ross *et al.*, 1985; Connelly *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1990; Coates *et al.*, 1993; Ryan & Waldrop, 1995; Horn & Waldrop, 1998; Oyamada *et al.*, 1998; Viemari *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006; Li & Nattie, 2006; Biancardi *et al.*, 2008; Ptak *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2010; Depuy *et al.*, 2011). It is thus conceivable that their over-activation or activation by ETO had produced supplementary excitatory inputs to VLM, leading thus to an enhancement of the CRD. Note that according to our *c-fos* analysis, the PHOX2B-expressing neurons of the RTN/pFRG, which are probably missing in CCHS seems to not been involved in ETO effect since we did not observe an over-increase in the number of c-FOS positive cells in the RTN/pFRG region under ETO exposure. We thus assume that our results highlight, at least in part, the neuronal pathway potentially used by ETO to induce a recovery of the CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in some CCHS patients (Straus *et al.*, 2010).

We assume that the over-activation of vINTS, VLM, LC and vIPAG neurons and the activation of cNTS, mNTS, and IPAG neurons were dependent from OX1R and OX2R subsequently to ETO-induced orexin release by orexinergic neurons. Indeed, in presence of almorexant, ETO exposure no longer increased *c-fos* expression in these structures. Obviously, it is conceivable that the recruitment of these structures may also be indirectly or both directly and indirectly mediated by ETO-induced orexin release. In addition to its direct activation by orexin (if so) one structure (for instance the VLM) can be also indirectly activated by ETO-induced orexin release *via* the activation of another structure (for instance the c/mNTS). In such a way, connexions have been described between all the over-activated or activated structures and orexinergic neurons (Peyron *et al.*, 1998; Date *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Ohno & Sakurai, 2008; Huang *et al.*, 2010; Shahid *et al.*, 2012; Darwinkel *et al.*, 2014), between these structures and

the VLM as mentioned above, or for instance between PAG and NTS (Cameron *et al.*, 1995), LC and PAG (Luppi *et al.*, 1995), LC and NTS (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Luppi *et al.*, 1995).

In contrast, both ROb, and RPa still presented an increased number of c-FOS positive cells under almorexant/ETO compared to almorexant/DMSO exposure. This suggests that ETO may act on these structures independently from the activation of orexinergic neurons under metabolic acidosis condition. Nevertheless, this potential action of ETO on ROb and RPa was not sufficient on its own to induce a strengthening of the respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> since this response was not observed in MS preparations. These results have to be interpreted regarding our recent data showing that in MS preparations of newborn mice ETO significantly increased baseline  $f_R$  and that this effect may rely on a direct action of ETO on the serotoninergic neurons of RPa and ROb (Joubert et al., 2016). Contrastingly, present and former studies shown on DBS preparations of newborn rats that ETO in normal pH condition did not induce an increase in baseline f<sub>R</sub> (Loiseau et al., 2014). An observation endorsed by the present c-FOS analysis performed on DBS preparations in normal pH condition, which shown no differences in the number of c-FOS positive cells between ETO and DMSO at the level of ROb and RPa. This potential absence of the facilitating effect of ETO under normal pH condition by adding supramedullary structures suggests that ETO initiated a mechanism dependent on the presence of supramedullary structures, which counteracted its potential facilitating influence on serotoninergic neurons of ROb and RPa. Nevertheless, the fact that in ROb and RPa the increased number of c-FOS positive cells subsisted under co-application with almorexant suggests that the ability of ETO to interact with serotoninergic neuron of ROb and RPa remained in a lesser extent in DBS preparations of newborn rat. In such a hypothesis, the enhancement of the activation of ROb and RPa cells by ETO would be followed by the reinforcement of the ETO effect. Of course, on the other hand, we cannot exclude that the mechanism required by ETO to increase  $f_R$  through serotoninergic neurons activation in newborn mice is missing in newborn rat.

#### CONCLUSION

In conclusion, our results highlighted a possible central mechanism of action through which the gonane progestin desogestrel, or rather its metabolite ETO, may have induced a recovery of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemosensitivity in CCHS patients. Collectively our results suggest first that ETO strengthens the respiratory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> in a small range of concentration, and second that its effect rely mostly on the activation of orexinergic neurons that over-activate and activate several brainstem respiratory-related structures, which in turn could exert a facilitatory influence on the CRD. Additionally, our data suggest an activation of ROb and RPa neurons by a way independent from the orexinergic signalization that remains to be determined. This study, combined with former study on the medullary pathway involved in resting breath (Joubert *et al.*, 2016), constitute a fund of knowledge about the ventilatory effects of gonane progestins and provide pieces of reflexion concerning how they can constitute a therapeutic issue for CCHS.

217

### REFERENCES

- Amiel J, Dubreuil V, Ramanantsoa N, Fortin G, Gallego J, Brunet JF & Goridis C. (2009). PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. *RespirPhysiol Neurobiol* **168**, 125-132.
- Amiel J, Laudier B, ttie-Bitach T, Trang H, de PL, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C & Lyonnet S. (2003). Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *NatGenet* **33**, 459-461.
- Back DJ, Grimmer SF, Shenoy N & Orme ML. (1987). Plasma concentrations of 3-keto-desogestrel after oral administration of desogestrel and intravenous administration of 3-keto-desogestrel. *Contraception* **35**, 619-626.
- Barann M, Gothert M, Bruss M & Bonisch H. (1999). Inhibition by steroids of [14C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT3 receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 360, 234-241.
- Baulieu EE. (1991). Neurosteroids: a new function in the brain. Biol Cell 71, 3-10.
- Bayliss DA, Cidlowski JA & Millhorn DE. (1990). The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. *Endocrinology* **126**, 519-527.
- Bayliss DA & Millhorn DE. (1992). Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *JApplPhysiol* **73**, 393-404.
- Bayliss DA, Millhorn DE, Gallman EA & Cidlowski JA. (1987). Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *ProcNatlAcadSciUSA* **84**, 7788-7792.
- Behan M & Kinkead R. (2011). Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Compr Physiol* **1**, 2101-2139.
- Behan M & Wenninger JM. (2008). Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* **164**, 213-221.
- Berquin P, Cayetanot F, Gros F & Larnicol N. (2000). Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res* **877**, 149-159.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC & Gargaglioni LH. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. *Pflugers Arch* **455**, 1119-1128.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M & Champagnat J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1-45.
- Bodineau L & Larnicol N. (2001). Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Foslike immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience* **108**, 643-653.

- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk
  FZ & Nilsen J. (2008). Progesterone receptors: form and function in brain. Front Neuroendocrinol 29, 313-339.
- Brisbare-Roch C, Dingemanse J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, Mueller C, Nayler O, van Gerven J, de Haas SL, Hess P, Qiu C, Buchmann S, Scherz M, Weller T, Fischli W, Clozel M & Jenck F. (2007). Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med* **13**, 150-155.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN & Willis WD. (1995). The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. *J Comp Neurol* **351**, 585-601.
- Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y & Aoki M. (2006). Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci Res* **56**, 322-331.
- Carroll MS, Patwari PP & Weese-Mayer DE. (2010). Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *JApplPhysiol* **108**, 979-988.
- Cedarbaum JM & Aghajanian GK. (1978). Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol* **178**, 1-16.
- Chernov MM, Erlichman JS & Leiter JC. (2010). Ionic mechanisms of central CO(2) chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 298-304.
- Cielo C & Marcus CL. (2014). Central Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med Clin* 9, 105-118.
- Coates EL, Li A & Nattie EE. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *Journal* of Applied Physiology **75**, 5-14.
- Connelly CA, Ellenberger HH & Feldman JL. (1989). Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett* **105**, 34-40.
- Corcoran AE, Richerson GB & Harris MB. (2015). Functional link between the hypocretin and serotonin systems in the neural control of breathing and central chemosensitivity. *J Neurophysiol* **114**, 381-389.
- Cross BA & Silver IA. (1963). Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnia. *Exp Neurol* **7**, 375-393.
- Danneman PJ & Mandrell TD. (1997). Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab Anim Sci* **47**, 386-395.
- Darwinkel A, Stanic D, Booth LC, May CN, Lawrence AJ & Yao ST. (2014). Distribution of orexin-1 receptor-green fluorescent protein- (OX1-GFP) expressing neurons in the mouse brain stem and pons: Co-localization with tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* **278**, 253-264.

- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M & Nakazato M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 748-753.
- Dean JB, Bayliss DA, Erickson JT, Lawing WL & Millhorn DE. (1990). Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience* **36**, 207-216.
- Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA, III, Potter SJ & Putnam RW. (2004). Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of Applied Physiology* **96**, 784-791.
- Deng BS, Nakamura A, Zhang W, Yanagisawa M, Fukuda Y & Kuwaki T. (2007). Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *J Appl Physiol (1985)* **103**, 1772-1779.
- Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL & Guyenet PG. (2011). Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* **31**, 1981-1990.
- Dias MB, Li A & Nattie E. (2010). The orexin receptor 1 (OX1R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *RespirPhysiol Neurobiol* **170**, 96-102.
- Dias MB, Li A & Nattie EE. (2009). Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *JPhysiol* **587**, 2059-2067.
- Dillon GH & Waldrop TG. (1993). Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *ExpBrain Res* **96**, 260-272.
- Dubreuil V, Barhanin J, Goridis C & Brunet JF. (2009). Breathing with phox2b. *PhilosTransRSocLond B BiolSci* **364**, 2477-2483.
- Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet JF & Goridis C. (2008). A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *ProcNatlAcadSciUSA* **105**, 1067-1072.
- Ellenberger HH & Feldman JL. (1990). Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res* **513**, 35-42.
- Eyigor O, Minbay Z & Kafa IM. (2012). Glutamate and orexin neurons. Vitam Horm 89, 209-222.
- Feldman JL, Mitchell GS & Nattie EE. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *AnnuRevNeurosci* **26**, 239-266.
- Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L & Xu TL. (2005). Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* **48**, 635-646.
- Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet

JF, Goridis C, Warth R & Barhanin J. (2010). Task2 potassium channels set central respiratory CO2 and O2 sensitivity. *ProcNatlAcadSciUSA* **107**, 2325-2330.

- Goridis C & Brunet JF. (2010). Central chemoreception: lessons from mouse and human genetics. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 312-321.
- Guyenet PG. (2014). Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol* **4**, 1511-1562.
- Guyenet PG & Bayliss DA. (2015). Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. *Neuron* 87, 946-961.
- Guyenet PG, Stornetta RL & Bayliss DA. (2010). Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol* **518**, 3883-3906.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA & Upton N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10911-10916.
- Harada Y, Kuno M & Wang YZ. (1985). Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro. *JPhysiol* **368**, 679-693.
- Horn EM & Waldrop TG. (1998). Suprapontine control of respiration. *RespirPhysiol* **114**, 201-211.
- Huang SC, Dai YW, Lee YH, Chiou LC & Hwang LL. (2010). Orexins depolarize rostral ventrolateral medulla neurons and increase arterial pressure and heart rate in rats mainly via orexin 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **334**, 522-529.
- Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE & Feldman JL. (2015). Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci* **35**, 1052-1067.
- Janczewski WA & Feldman JL. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *The Journal of Physiology Online* **570**, 407-420.
- Jensen D, Wolfe LA, Slatkovska L, Webb KA, Davies GA & O'Donnell DE. (2005). Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1369-1375.
- Jiang C, Rojas A, Wang R & Wang X. (2005). CO2 central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules? *Respir Physiol Neurobiol* **145**, 115-126.
- Joubert F, Perrin-Terrin AS, Verkaeren E, Cardot P, Fiamma MN, Frugiere A, Rivals I, Similowski T, Straus C & Bodineau L. (2016). Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotoninergic systems. *Neuropharmacology* **107**, 339-350.
- Kawai A, Onimaru H & Homma I. (2006). Mechanisms of CO2/H+ chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. *JPhysiol* **572**, 525-537.

- Kobayashi S, Fujito Y, Matsuyama K & Aoki M. (2010). Raphe modulation of the pre-Botzinger complex respiratory bursts in in vitro medullary half-slice preparations of neonatal mice. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **196,** 519-528.
- Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, Weaver JL, Sen J, Abbott SB, Lazarenko RM, Ludwig MG, Perez-Reyes E, Mohebbi N, Bettoni C, Gassmann M, Suply T, Seuwen K, Guyenet PG, Wagner CA & Bayliss DA. (2015). PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO(2) requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science* 348, 1255-1260.
- Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C & Sachs G. (2006). Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol Genomics* **25**, 153-165.
- Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de PJ & Menetrey D. (1994). Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins. *Neuroscience* **58**, 287-298.
- Li A & Nattie E. (2006). Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *The Journal of Physiology Online* **570**, 385-396.
- Li A & Nattie E. (2010). Antagonism of rat orexin receptors by almorexant attenuates central chemoreception in wakefulness in the active period of the diurnal cycle. *J Physiol* **588**, 2935-2944.
- Li D, Chin, C., Kato, R., Ward, S., Keens, T.G.,. (2013). Does Desogestrel Improve Ventilatory Control in Congenital Central Hypoventilation Syndrome, p. A5194. In *American Thoracic Society International Conference*.
- Li N, Li A & Nattie E. (2013). Focal microdialysis of CO(2) in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* **185**, 349-355.
- Loiseau C, Osinski D, Joubert F, Straus C, Similowski T & Bodineau L. (2014). The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. *NeurosciLett* **567**, 63-67.
- Lopes LT, Patrone LG, Bicego KC, Coimbra NC & Gargaglioni LH. (2012). Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. *Pflugers Arch* **464**, 155-166.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G & Jouvet M. (1995). Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* **65**, 119-160.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM & Feldman JL. (2003). Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* **37**, 821-826.
- Miles R. (1983). Does low pH stimulate central chemoreceptors located near the ventral medullary surface? *Brain Res* **271**, 349-353.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA & Guyenet PG. (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* **7**, 1360-1369.

- Murakoshi T, Suzue T & Tamai S. (1985). A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Br J Pharmacol* **86**, 95-104.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M & Goto K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* **827**, 243-260.
- Ohno K & Sakurai T. (2008). Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* **29**, 70-87.
- Okada Y, Kawai A, Muckenhoff K & Scheid P. (1998). Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *RespirPhysiol* **111**, 55-63.
- Okada Y, Chen Z, Jiang W, Kuwana S & Eldridge FL. (2002). Anatomical arrangement of hypercapniaactivated cells in the superficial ventral medulla of rats. *J ApplPhysiol* **93**, 427-439.
- Onimaru H & Homma I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* **23**, 1478-1486.
- Onimaru H, Ikeda K & Kawakami K. (2008). CO2-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci* **28**, 12845-12850.
- Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff 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. *J Physiol* **513 ( Pt 2)**, 381-398.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K & Feldman JL. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* **31**, 2895-2905.
- Pardridge WM & Mietus LJ. (1979). Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest* **64**, 145-154.
- Park-Chung M, Wu FS & Farb DH. (1994). 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* **46**, 146-150.
- Paxinos G & Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed.* San Diego CA: Academic Press.
- Pearce RA, Stornetta RL & Guyenet PG. (1989). Retrotrapezoid nucleus in the rat. *NeurosciLett* **101**, 138-142.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG & Kilduff TS. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* **18**, 9996-10015.
- Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB & Smith JC. (2009). Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci* **29**, 3720-3737.
- Putnam RW, Filosa JA & Ritucci NA. (2004). Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1493-1526.

- Ramanantsoa N & Gallego J. (2013). Congenital central hypoventilation syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* **189**, 272-279.
- Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J & Goridis C. (2011). Breathing without CO(2) chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *Journal of Neuroscience* **31**, 12880-12888.
- Ren J & Greer JJ. (2006). Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period. *JPhysiol* **574**, 535-546.
- Ribas-Salgueiro JL, Matarredona ER, Ribas J & Pasaro R. (2006). Enhanced c-Fos expression in the rostral ventral respiratory complex and rostral parapyramidal region by inhibition of the Na+/H+ exchanger type 3. *Autonomic Neuroscience* **126-127**, 347-354.
- Richter DW & Spyer KM. (2001). Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* **24**, 464-472.
- Ross CA, Ruggiero DA & Reis DJ. (1985). Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* **242**, 511-534.
- Rupprecht R & Holsboer F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-416.
- Ryan JW & Waldrop TG. (1995). Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. *RespirPhysiol* **100**, 185-194.
- Saadani-Makki F, Frugiere A, Gros F, Gaytan S & Bodineau L. (2004). 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.
- Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW & Thijssen JH. (2003). Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* **46 Suppl 1**, S7-S16.
- Shahid IZ, Rahman AA & Pilowsky PM. (2012). Orexin and central regulation of cardiorespiratory system. *Vitam Horm* **89**, 159-184.
- Sitruk-Ware R. (2008). Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* **61**, 151-157.
- Slatkovska L, Jensen D, Davies GA & Wolfe LA. (2006). Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. *RespirPhysiol Neurobiol* **154**, 379-388.
- Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, Otto MR & Feldman JL. (1989). Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J Comp Neurol* **281**, 69-96.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL. (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726-729.
- Song N, Zhang G, Geng W, Liu Z, Jin W, Li L, Cao Y, Zhu D, Yu J & Shen L. (2012). Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. *PLoSOne* **7**, e39982.

- Sritippayawan S, Hamutcu R, Kun SS, Ner Z, Ponce M & Keens TG. (2002). Mother-daughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 367-369.
- Stastna E, Chodounska H, Pouzar V, Kapras V, Borovska J, Cais O & Vyklicky L, Jr. (2009). Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. *Steroids* **74**, 256-263.
- Stornetta RL & Guyenet PG. (1999). Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. *J Comp Neurol* **407**, 367-380.
- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA & Guyenet PG. (2006). Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. *Journal of Neuroscience* **26**, 10305-10314.
- Straus C, Trang H, Becquemin MH, Touraine P & Similowski T. (2010). Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. *RespirPhysiol Neurobiol* **171**, 171-174.
- Sugita T, Sakuraba S, Kaku Y, Yoshida K, Arisaka H & Kuwana S. (2014). Orexin induces excitation of respiratory neuronal network in isolated brainstem spinal cord of neonatal rat. *Respir Physiol Neurobiol* **200**, 105-109.
- Sunanaga J, Deng BS, Zhang W, Kanmura Y & Kuwaki T. (2009). CO2 activates orexin-containing neurons in mice. *Respir Physiol Neurobiol* **166**, 184-186.
- Suzue T. (1984). Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* **354**, 173-183.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A & Olievier C. (1997). Expression of cfos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* **388**, 169-190.
- Timmer CJ, Srivastava N, Dieben TO & Cohen AF. (1999). Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: Cerazette and Liseta. *EurJDrug Metab Pharmacokinet* **24**, 335-343.
- Umezawa N, Arisaka H, Sakuraba S, Sugita T, Matsumoto A, Kaku Y, Yoshida K & Kuwana S. (2015). Orexin-B antagonized respiratory depression induced by sevoflurane, propofol, and remifentanil in isolated brainstem-spinal cords of neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol* **205**, 61-65.
- Verhoeven CH, Krebbers SF, Wagenaars GN & Vos RM. (1998). In vitro and in vivo metabolism of desogestrel in several species. *Drug Metab Dispos* **26**, 927-936.
- Vicente MC, Dias MB, Fonseca EM, Bicego KC & Gargaglioni LH. (2016). Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO2 ventilatory response. *Pflugers Arch* **468**, 763-774.

- Viemari JC, Bevengut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC & Hilaire G. (2004). Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci* **24**, 928-937.
- Voituron N, Frugiere A, Champagnat J & Bodineau L. (2006). Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. *J Physiol* **577**, 55-68.
- Voituron N, Frugiere A, Gros F, Macron JM & Bodineau L. (2005). 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.
- Voituron N, Frugiere A, Mc Kay LC, Romero-Granados R, Dominguez-del-Toro E, Saadani-Makki F, Champagnat J & 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*.
- Voituron N, Shvarev Y, Menuet C, Bevengut M, Fasano C, Vigneault E, El Mestikawy S & Hilaire G. (2010). Fluoxetine treatment abolishes the in vitro respiratory response to acidosis in neonatal mice. *PLoS One* **5**, e13644.
- Wagenaar M, Teppema LJ, Berkenbosch A, Olievier CN & Folgering HT. (2000). Medroxyprogesterone acetate with acetazolamide stimulates breathing in cats. *Respir Physiol* **119**, 19-29.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT & Farb DH. (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 747-754.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA & Trang H. (2010). An official ATS clinical policy statement: Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. *AmJRespirCrit Care Med* **181**, 626-644.
- Weese-Mayer DE, Silvestri JM, Menzies LJ, Morrow-Kenny AS, Hunt CE & Hauptman SA. (1992). Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis, management, and long-term outcome in thirty-two children. *J Pediatr* **120**, 381-387.
- Williams RH, Jensen LT, Verkhratsky A, Fugger L & Burdakov D. (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10685-10690.
- Wu FS, Gibbs TT & Farb DH. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the Nmethyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* **40**, 333-336.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K & Sakurai T. (2003). Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 120-129.
- Young JK, Wu M, Manaye KF, Kc P, Allard JS, Mack SO & Haxhiu MA. (2005). Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. *J Appl Physiol (1985)* **98**, 1387-1395.
- Zhang W, Hayward LF & Davenport PW. (2005). Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1338-1347.

- Zheng H, Patterson LM & Berthoud HR. (2005). Orexin-A projections to the caudal medulla and orexininduced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. *J Comp Neurol* **485**, 127-142.
- Zwillich CW, Natalino MR, Sutton FD & Weil JV. (1978). Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. J Lab Clin Med **92**, 262-269.

### FIGURE LEGENDS

Figure 1. Etonogestrel strengthened the respiratory response to metabolic acidosis at a specific concentration. Histogram illustrating the mean percentage of change in  $f_R$  under metabolic acidosis condition in presence either of DMSO (white bar, n = 13) or ETO (gray bars) at  $5 \cdot 10^{-2}$  (n = 10),  $5 \cdot 10^{-1}$  (n = 13), 1 (n = 9) or 2  $\mu$ M (n = 12). Data are expressed as mean ± SEM. \* indicates a significant change intragroup (one-sample t test) in  $f_R$  compared to the values obtained just prior metabolic acidosis conditions. # indicates a significant difference (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) between groups. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.001, # p < 0.05, ## p < 0.01. ETO: etonogestrel.

Figure 2. The strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel depended on the presence of the diencephalon. Histogram showing the mean percentage of change of  $f_R$  under metabolic acidosis condition in presence either of DMSO (white bar) or ETO (gray bars) on DBS (n = 13 and n = 13, respectively), BS (n = 9 and n = 10, respectively), PMS (n = 10 and n = 10, respectively), and MS (n = 16 and n = 9, respectively) preparations. Data are expressed as mean ± SEM. \* indicates a significant change intragroup (one-sample t test) in  $f_R$  compared to the values obtained just prior metabolic acidosis condition. # indicates a significant difference (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) between groups. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001, # p < 0.05. ETO: etonogestrel, DBS: diencephalon-brainstem-spinal cord preparation, BS: brainstem-spinal cord preparation, PMS: ponto-medullary-spinal cord preparation, MS: medullary-spinal cord preparation. Figure 3. The metabolic acidosis *c-fos* expression was over-increased or increase by ETO in medullary respiratory-related areas. Photomicrographs illustrating the metabolic acidosis c-FOS immunoreactivity under DMSO (A-E) and ETO  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M (H-L) exposure in the cNTS (A and H), mNTS (B and I), and vINTS (A, B, H and I), ROb (C, D, J and K), RPa (D and K) and VLM (E and L). Scale bar 100  $\mu$ m. *Abbreviations*. Central canal (cc), commissural part of the nucleus of the tractus solitarius (cNTS), median part of the nucleus of the tractus solitarius (mNTS), ventrolateral part of the nucleus of the tractus solitarius (vINTS), dorsal motor nucleus of vagus (DMX), hypoglossal nucleus (XII), area postrema (AP), inferior olives (IO), obscurus (ROb) and pallidus (RPa) raphe nuclei, pyramidal tract (Py), ambiguus nucleus (Amb), ventrolateral medullary reticular nucleus (VLM), etonogestrel (ETO).

Figure 4. The metabolic acidosis *c-fos* expression was over-increased or increase by ETO in supra-medullary respiratory-related areas. Photomicrographs illustrating the metabolic acidosis c-FOS immunoreactivity under DMSO (A and B) and ETO  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M (C and D) exposure in the LC (A and C), the IPAG and the vIPAG (B and D). Scale bar 100  $\mu$ m. *Abbreviations*. Locus coeruleus (LC), aqueduct of Sylvius (Aq), dorsomedian part of the periaqueductal gray (dPAG), dorsolateral part of the periaqueductal gray (IPAG), ventrolateral part of the periaqueductal gray (vIPAG), dorsal raphe nucleus (DR), etonogestrel (ETO).

Figure 5. The metabolic acidosis *c-fos* expression was increase by ETO in orexinergic neurons of the caudal hypothalamus. Photomicrographs illustrating the

metabolic acidosis c-FOS and orexin immunoreactivities under DMSO (A) and ETO  $5 \cdot 10^{-1} \mu M$  (B) exposure in the caudal hypothalamus. Black arrows indicate double-immunolabelled neurons. Scale bar 100  $\mu m$ . *Abbreviation*. Etonogestrel (ETO).

Figure 6. Orexinergic systems were involved in the strengthening of the respiratory response to metabolic acidosis by etonogestrel. Histograms illustrating the mean percentage of change of f<sub>R</sub> under normal pH condition (A) in presence of orexin at  $10^{-4}$  (n = 6),  $5 \cdot 10^{-4}$  (n = 6),  $10^{-3}$  (n = 10),  $10^{-2}$  (n = 11) and  $10^{-1}$  $\mu$ M (n = 5); (B) in presence of either orexin alone (white bars, 10<sup>-2</sup>  $\mu$ M, n= 11) or almorexant (10<sup>-2</sup>  $\mu$ M) and orexin (10<sup>-2</sup>  $\mu$ M) (hatched white bars, n = 8). \* indicates a significant change (Wilcoxon signed rank test (A) and one-sample t test (B)) in mean f<sub>R</sub> compared to the baseline values. # indicates a significant difference (unpaired t-test (B)) between exposition to orexin alone and co-exposition to almorexant and orexin. (C) Histogram showing the mean percentage of change of f<sub>R</sub> under metabolic acidosis condition in presence either of DMSO (white bar) or ETO (gray bars) alone (DMSO n = 13 and ETO n = 13) with or without almorexant (hatched bars; DMSO n = 13 and ETO n = 10). \* indicates a significant change intragroup (one-sample t test) in mean  $f_R$ compared to the values obtained just prior metabolic acidosis conditions. # indicates a significant difference (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) between groups. Data are expressed as mean ± SEM. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001, ## p < 0.01, ### p < 0.001. ETO: etonogestrel.

Figure 1





Figure 3

### DMSO

ETO 5·10<sup>-1</sup> μM





A









Table 1: *c-fos* expression in brainstem and diencephalic structures of DBS *ex vivo* preparations under normal pH or metabolic acidosis conditions in presence of either DMSO or etonogestrel

		normal pH		metabolic acidosis	
		<b>DMSO</b> (n = 4)	<b>ETO</b> (n = 4)	<b>DMSO</b> (n = 8)	<b>ETO</b> (n = 8)
	cNTS	30.65 ± 5.67	36.04 ± 8.63	17.89 ± 2.08	78.13 ± 11.25 ###
	VINTS	1.72 ± 0.35	1.50 ± 0.54	5.02 ± 0.72 *	34.18 ± 3.02 ***
	mNTS	4.69 ± 1.16	4.92 ± 1.29	8.45 ± 1.6	103.06 ± 15.04 ###
	ROb	3.02 ± 0.44	$3.57 \pm 0.46$	4.8 ± 1.04	18.74 ± 3.46 ##
medulla	RPa	9.13 ± 1.53	6.58 ± 1.35	7.03 ± 0.87	15.88 ± 2.79 <sup>#</sup>
oblongata	RMg	14.81 ± 1.94	11.84 ± 0.96	13.85 ± 2.89	23.63 ± 5.01
	PP	2.67 ± 0.59	2.48 ± 0.37	6.08 ± 0.35 **	4.84 ± 0.43
	VLM	13.75 ± 1.7	13.96 ± 2.07	25.28 ± 1.96 **	59.21 ± 10.33 ##
m	edial RTN/pFRG	14.68 ± 2.68	$14.22 \pm 2.04$	23 05 + 2 36 *	23.62 ± 1.53
lateral RTN/pFRG		6.17 ± 1.76	4.27 ± 0.65	8.29 ± 1.08	$4.9 \pm 0.65$
pons	A5	15.35 ± 3.28	14.53 ± 0.83	16.96 ± 1.92	28.07 ± 4.81
	LC	2.99 ± 0.65	$0.98 \pm 0.3$	224+73*	67.63 ± 10.02 <sup>#</sup>
	IPB	$2.26 \pm 0.8$	$0.29 \pm 0.17$	$4.11 \pm 1.6$	$9.48 \pm 2.1$
	mPB/KF	$0.82 \pm 0.20$	$1.32 \pm 0.32$	10.41 ± 2.29	$20.29 \pm 4.11$
mesencephalon	dPAG	0.28 ± 0.08	0.3 ± 0.12	0.88 ± 0.65	0.96 ± 0.25
	dIPAG	$0.66 \pm 0.4$	2.28 ± 1.83	3.06 ± 1.83	$1.1 \pm 0.39$
	IPAG	3.1 ± 1.31	2.83 ± 0.77	6.01 ± 1.74	29.24 ± 7.76 <sup>#</sup>
	vIPAG	1.28 ± 0.38	1.49 ± 0.52	7.34 ± 1.96 *	22.67 ± 4.92 <sup>#</sup>
diencephalon	DMH	26.93 ± 3.06	28.82 ± 10.19	27.8 ± 4.42	28.71 ± 9.41
	LH	26.52 ± 2.62	22.28 ± 3.93	42.26 ± 10.38	27.89 ± 6.92
	PeF	0.73 ± 0.15	0.6 ± 0.15	3.95 ± 1.14 *	3.57 ± 0.86
	PH	4.82 ± 1.08	3.49 ± 1.82	14.79 ± 3.08	13.21 ± 3.25

Values are expressed as mean number of c-FOS positive cells per section  $\pm$  SEM. \* indicates a significant increase in mean number of c-FOS positive cells per structure under metabolic acidosis condition compared to normal pH condition both in presence of DMSO. # indicates a significant increase in mean number of c-FOS positive cells per structure under metabolic acidosis condition in presence of ETO (5  $\cdot 10^{-1} \mu$ M) compared to in presence of DMSO. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001. cNTS: commissural part of the nucleus tractus solitarius, vINTS: ventrolateral part of the nucleus tractus solitarius, ROb: raphe obscurus nucleus, RPa: raphe pallidus nucleus, RMg: raphe magnus nucleus, PP: parapyramidal group, VLM: ventrolateral medullary reticular nucleus, medial RTN/pFRG: medial part of the RTN/pFRG region, lateral RTN/pFRG: lateral part of the RTN/pFRG region, LC: locus coeruleus, IPB: lateral subnucleus of the parabrachial nucleus, mPB/KF: medial subnucleus of the parabrachial nucleus/kölliker-fuse nucleus, dPAG: dorsal part of the periaqueductal gray, vIPAG: ventrolateral part of the periaqueductal gray, pothalamic area, PeF: perifornical region, PH: posterior hypothalamic area.
Table 2: *c-fos* expression in brainstem and diencephalic structures of DBS *ex vivo* preparations under metabolic acidosis condition in presence of almorexant/DMSO or almorexant/etonogestrel

		metabolic acidosis	
		almorexant/DMSO (n = 4)	almorexant/ETO (n = 4)
	cNTS	30.87 ± 1.19	30.7 ± 4.69
	VINTS	6.77 ± 0.89	5.41 ± 1.1
	mNTS	6.25 ± 1.37	11.58 ± 2.27
	ROb	1.61 ± 0.11	3.8 ± 0.81*
medulla	RPa	11.18 ± 1.28	15.29 ± 0.53 *
oblongata	RMg	21.5 ± 0.26	21.55 ± 2.1
	PP	6.97 ± 0.75	4.64 ± 1.23
	VLM	22.27 ± 1.7	27.97 ± 2.14
	medial RTN/pFRG	23.04 ± 1.83	23.46 ± 1.83
	lateral RTN/pFRG	6.38 ± 1.14	7.49 ± 0.28
pons	A5	11.74 ± 1.66	17.15 ± 2.47
	LC	1.67 ± 0.7	8.33 ± 2.79
	IPB	5.46 ± 4.29	9.39 ± 2.34
	mPB/KF	3.66 ± 2.24	10.53 ± 3.20
mesencephalo	dPAG	1.13 ± 0.3	0.83 ± 0.15
	dIPAG	0.73 ± 0.11	1.13 ± 0.28
	n ipag	2.13 ± 0.36	2.77 ± 0.33
	vIPAG	2.74 ± 0.28	$4.43 \pm 0.73$
diencephalor	DMH	25.64 ± 7.51	17.61 ± 1.99
	LH	27.64 ± 5.85	20.76 ± 3.78
	PeF	2.09 ± 0.57	$1.26 \pm 0.53$
	PH	9.11 ± 3.39	$4.53 \pm 0.7$

Values are expressed as mean number of c-FOS positive cells per section  $\pm$  SEM. # indicates a significant increase in mean number of c-FOS positive cells per structure under both metabolic acidosis condition and almorexant (5·10<sup>-2</sup> µM) exposure in presence of ETO (5·10<sup>-1</sup> µM) compared to in presence of DMSO. # p < 0.05. cNTS: commissural part of the nucleus tractus solitarius, vINTS: ventrolateral part of the nucleus tractus solitarius, ROb: raphe obscurus nucleus, RPa: raphe pallidus nucleus, RMg: raphe magnus nucleus, PP: parapyramidal group, VLM: ventrolateral medullary reticular nucleus, medial RTN/pFRG: medial part of the RTN/pFRG region, lateral RTN/pFRG: lateral part of the RTN/pFRG region, LC: locus coeruleus, IPB: lateral subnucleus of the parabrachial nucleus, mPB/KF: medial subnucleus of the parabrachial nucleus/kölliker-fuse nucleus, dPAG: dorsal part of the periaqueductal gray, vIPAG: ventrolateral part of the periaqueductal gray, period the periaqueductal gray, DMH: dorsomedial hypothalamic area.

**DISCUSSION GENERALE** 

## I- Considérations méthodologiques

#### I.1- Exposition au désogestrel et à l'étonogestrel

I.1.1- Chez la femme sous traitement contraceptif

Les patientes CCHS qui ont présenté une récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  recevaient quotidiennement par voie orale une pilule contraceptive contenant 75 µg.de désogestrel. Une fois ingéré le désogestrel est ensuite rapidement métabolisé dans les microsomes hépatiques en plusieurs composés dont l'ETO, son principal métabolite biologiquement actif (Verhoeven et al., 1998, Verhoeven et al., 2001). La biodisponibilité absolue du désogestrel a été évaluée à environ 76 % (Back et al., 1987), on peut dès lors supputer que 57 µg d'ETO se retrouvent dans la circulation sanguine. L'étude de Pardridge et Mietus qui a entrepris d'analyser le transport des hormones stéroïdiennes à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez le rat suggère que la BHE est très perméable à la progestérone et que son passage au travers ne nécessite pas de transporteur saturable (Pardridge and Mietus, 1979). De plus l'étude suggère que la capacité d'un stéroïde à passer la BHE est inversement proportionnelle au nombre de liaison d'hydrogène qu'est capable de former la molécule et directement proportionnelle au coefficient de partition (rapport des concentrations d'un soluté entre deux phases : hydrophobe (octanol) et lipophobe (eau)). D'autre part, les auteurs ont également mis en évidence que la fraction de progestérone dans la circulation sanguine disponible pour le transport vers le système nerveux central (SNC) ne se limite pas à la fraction libre, mais comprend aussi une partie de la fraction liée à l'albumine (Pardridge and Mietus, 1979). De telles expériences in vivo n'ont pas, à notre connaissance, été entreprise pour l'ETO. En revanche en se basant sur les propriétés chimiques de la molécule d'ETO et notamment sur l'étude de Pardridge et Mietus, les éléments sont en faveur du fait que l'ETO est capable de passer la BHE. Au vu du manque d'informations disponibles nous nous cantonnerons à ne raisonner que sur la fraction libre d'ETO plasmatique à savoir 2% (Schindler et al., 2003). Ainsi, sur les 57 µg d'ETO qui se retrouvent dans la circulation sanguine on peut estimer que théoriquement 1,14 µg et donc 3,5 nmol sont susceptibles de traverser la BHE. Enfin en prenant en compte le volume moyen de liquide céphalorachidien (LCR) comme étant d'environ 140 mL, on peut estimer que la concentration d'ETO dans le LCR (même si probablement sous-estimée) est d'environ 2,5·10<sup>-2</sup> µM. En outre, il est important de noter qu'alors même que le temps de demi-vie de l'ETO a été estimé être aux alentours de 25 H, des données de la littérature montrent que la concentration plasmatique maximale d'ETO est similaire après une administration aigüe ou chronique de désogestrel (Timmer et al., 1999). Ainsi la concentration présumée d'ETO qui se retrouve dans le LCR devrait être stable pendant tout le temps de la prise du traitement contraceptif.

#### I.1.2- Sur les préparations ex vivo de système nerveux central isolé

Pour les expériences réalisées sur les préparations *ex vivo* de SNC isolé nous avons pris la décision d'appliquer la molécule testée directement mise en solution dans le liquide

céphalorachidien artificiel (LCRa) au vu du manque d'informations disponibles sur le métabolisme hépatique et sur les propriétés de passage à travers la BHE chez le rat nouveauné. Ainsi les expériences ayant pour but d'évaluer les effets centraux du désogestrel sur la commande centrale respiratoire (CCR) ont été réalisées avec l'ETO, le métabolite biologiquement actif du désogestrel. L'ETO a été mis en solution dans le LCRa à différentes concentrations  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-1}$ , 1 et 2  $\mu$ M. Ces concentrations sont d'une part du même ordre de grandeur que la concentration théorique d'ETO dans le LCR chez la femme adulte (2, $5 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ M) et voisine de celles choisies pour des études similaires impliquant d'autres stéroïdes (Ren and Greer, 2006). A noté que la concentration qui se rapproche le plus de cette quantité théorique est  $5 \cdot 10^{-2} \ \mu$ M, même si comme évoqué plus haut cette concentration est très probablement sous-estimée dans la mesure où elle ne tient pas compte du fait que potentiellement une partie de l'ETO circulant sous forme lié passe également la BHE. Ainsi la gamme de concentration la plus proche de l'exposition clinique dans nos expériences concerne  $5 \cdot 10^{-2} a \ 1 \ \mu$ M.

# I.2- Préparations *ex vivo* de système nerveux central isolées de rongeurs nouveau-nés

Suzue est le premier en 1984 à avoir publié, sur le rat nouveau-né, les procédures permettant l'obtention et l'enregistrement de l'activité électrophysiologique de préparation ex vivo de SNC isolé qui présente une activité rythmique assimilée à la CCR (Suzue, 1984). Depuis, ce modèle a permis de faire des avancées considérables dans le domaine de la neurophysiologie respiratoire. Le bloc de SNC isolé peut contenir, selon la question scientifique, différentes subdivisions encéphaliques en plus de la moelle épinière cervicale (Okada et al., 1998, Viemari et al., 2004b, Voituron et al., 2005). Cette préparation permet de préserver l'intégrité, d'une part des neurones responsables de l'élaboration de la CCR et d'autre part, l'essentiel des sorties motrices qui sont constituées des axones des motoneurones qui innervent les muscles impliqués dans l'inspiration. Sachant que les axones des motoneurones phréniques qui innervent le diaphragme transitent via la racine cervicale ventrale C4 (Hussain et al., 1990, Road, 1990, Malakhova and Davenport, 2001), les décharges qui sont enregistrées à ce niveau sont interprétées physiologiquement comme le reflet de la CCR. Ce modèle a permis d'apporter bon nombre de réponses, jusqu'alors insolubles quant au fonctionnement de la CCR car il rend possible, en s'affranchissant des afférences périphériques, l'étude exclusive des mécanismes centraux. Ainsi ce modèle permet et a permis d'avancer dans l'étude de la localisation spatiale des structures respiratoires et dans une moindre mesure dans la mise en évidence leurs connectivités (Onimaru et al., 1987, Onimaru and Homma, 1987, Smith et al., 1991, Mellen et al., 2003, Voituron et al., 2005). Ce modèle rend également accessible l'étude de l'effet de manipulations pharmacologiques restreintes au SNC en modifiant le milieu de superfusion ainsi que l'étude de l'influence de différentes subdivisions de l'encéphale en modulant l'extension rostrale (Suzue, 1984, Murakoshi et al., 1985, Okada et al., 1998, Voituron et al., 2005, Johnson et al., 2012). A noter que chez la souris les préparations ex vivo contenant les structures rostrales au pont caudal ne génèrent pas de rythme en C4, cela pourrait être dû aux structures pontiques rostrales

notamment les neurones noradrénergiques de la région A5 qui exerceraient une trop forte inhibition sur les centres respiratoires bulbaires (Hilaire et al., 1989, Errchidi et al., 1991, Hilaire et al., 2004, Voituron et al., 2011).

L'une des principales critiques faite à ce modèle est que la technique de superfusion des tissus entraine la formation d'un gradient de pression tissulaire d'O<sub>2</sub> (Brockhaus et al., 1993, Okada et al., 1993). Afin de limiter l'incidence de ce gradient sur l'oxygénation et le fonctionnement cellulaire, les études sont réalisées sur le rongeur nouveau-né (entre PO et P5). En effet, il est admis que les neurones respiratoires, localisés à une profondeur comprise entre 300 et 600 µm chez le rat nouveau-né sont correctement dioxygénés (Brockhaus et al., 1993, Okada et al., 1993, Fong et al., 2008). De plus, il a été montré que les préparations soumises à une hypoxie présentent une forte diminution de la fréquence de décharge, enregistrée au niveau de la racine C4, avant que cette dernière ne revienne aux valeurs de bases après le retour à la condition de normoxie (Kawai et al., 1995, Okada et al., 1998, Bodineau et al., 2001). Cette observation rend peu probable l'hypothèse selon laquelle les préparations développent une souffrance hypoxique à l'état de base au point d'altérer leur fonctionnement physiologique. Néanmoins, le développement du SNC s'accompagnant de la myélinisation des axones, un processus qui complique la superfusion des tissus en s'opposant à la diffusion d'O<sub>2</sub>, les expériences ne peuvent pas être réalisées sur des préparations issues de rongeurs âgés de plus de 5 jours (Clarac et al., 2004, Fong et al., 2008, Johnson et al., 2012). Par ailleurs la formation d'un gradient de pH a également été mise en évidence sur ces préparations. En effet des mesures de pH ont été effectuées jusqu'à une profondeur de 1200 μm (Okada et al., 1993) et ont révélé que tous les 100 μm de profondeur le pH diminue de 0,1 unité (Brockhaus et al., 1993, Okada et al., 1993). Néanmoins, différentes études ont montré qu'en cas de variation de  $CO_2/H^+$  dans le liquide de superfusion la modification du pH extracellulaire au niveau des neurones respiratoires (300 et 600 μm de profondeur) (Okada et al., 1993) conduit les préparations exposées à adapter leur CCR dans le même sens que ce qui est observé in vivo (Suzue, 1984, Harada et al., 1985, Okada et al., 1993, Gestreau et al., 2010).

Dans ce travail doctoral les préparations *ex vivo* ont notamment été utilisées pour appréhender les mécanismes mis en jeu lors d'une hypercapnie. Pour se faire deux techniques sont décrites dans la littérature : l'acidose métabolique (qui consiste à diminuer le pH du liquide de superfusion) et l'acidose respiratoire (qui consiste à augmenter la fraction de CO<sub>2</sub> que l'on fait buller dans le liquide de superfusion) (Okada et al., 1993, Wang et al., 2001b, Kawai et al., 2006, Gestreau et al., 2010). Comme dit précédemment (*Chapitre 2, II- La chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>*) deux hypothèses coexistent concernant le mécanisme qui permet aux chémorécepteurs de détecter les variations de PaCO<sub>2</sub>. Soit les chémorécepteurs ont une sensibilité directe au CO<sub>2</sub> dissous soit ils sont sensibles aux variations de H<sup>+</sup>. Au vu des données de la littérature cette dernière hypothèse semble être la plus privilégiée (Nattie, 1999, Lahiri and Forster, 2003, Chernov et al., 2010, Guyenet et al., 2010a, Guyenet et al., 2010b, Guyenet, 2014, Guyenet and Bayliss, 2015). Il a donc été décidé que l'acidose métabolique serait la condition expérimentale modélisant une l'hypercapnie.

# I.3- Expression du proto-oncogène c-fos comme marqueur d'activité neuronale à court terme

La protéine c-FOS est le produit de l'expression du proto-oncogène c-fos, l'un des premiers membres de la famille des immediate early gene (IEG) découverts (Greenberg and Ziff, 1984). Les IEG sont transcrits dès les premières minutes qui suivent une stimulation (Kruijer et al., 1984). Ils participent à induire l'expression des gènes dits de la réponse tardive qui constitue la réponse spécifique du neurone à un stimulus donné (Sheng and Greenberg, 1990). A l'image de la majorité des membres de cette famille, l'expression de c-fos est très finement régulée. Son induction, extrêmement rapide car indépendante de la synthèse de nouvelles protéines, est transitoire. La durée de demi-vie de l'ARNm et de la protéine est courte, environ 15 et 90 min respectivement, tandis que l'arrêt de sa transcription est sous la dépendance d'un rétrocontrôle nécessitant la synthèse de nouvelles protéines (Muller et al., 1984, Sheng and Greenberg, 1990, Herdegen and Leah, 1998). Toutes ces caractéristiques soutiennent le fait que *c-fos* tient un rôle important dans la genèse de réponses cellulaires adaptées à des stimuli. Brièvement, il a été montré in vitro que la transcription de c-fos peut être induite par différents stimuli extracellulaires impliquant diverses voies de signalisation et seconds messagers. Ainsi, l'adénosine monophosphate cyclique, le calcium et le diacylglycérol activent différentes kinases (protéine kinase A, calcium/calmodulin-dependant kinase II, protéine kinase C) modulant l'activité de facteurs de transcription distincts (cAMP response elements binding protein, serum response factor) trans-régulant l'activité du promoteur c-fos (Gilman et al., 1986, Morgan and Curran, 1986, Greenberg et al., 1987, Yamamoto et al., 1988, Sheng and Greenberg, 1990). Une fois traduit, c-FOS peut s'hétérodimériser avec c-JUN grâce à un domaine leucine zipper et former le facteur de transcription AP-1 (Halazonetis et al., 1988, Kouzarides and Ziff, 1988). L'hétérodimère c-FOS/c-JUN présente une localisation presque exclusivement nucléaire et régule l'expression de gènes placés sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux facteurs de transcription AP-1 (séquence consensus TGACTCA) (Nakabeppu et al., 1988, Rauscher et al., 1988a, Rauscher et al., 1988b). La fixation ou non de l'hétérodimère dépendra notamment de l'état de condensation de la chromatine qui pourra varier selon le neurone considéré ou l'état de ce neurone à un instant t. Les IEG tels que *c-fos* fonctionnent donc comme des médiateurs nucléaires qui traduisent les stimuli externes et trans-synaptiques en un programme spécifique d'expression de gènes tardifs. La finesse des mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes, aussi diversifiés que spécifiques donne un aperçu de la complexité des mécanismes moléculaires nécessaires à l'élaboration d'une réponse cellulaire adaptée.

La détection de c-FOS en immunohistologie est couramment réalisée dans le milieu des neurophysiologistes pour mettre en évidence les populations neuronales qui ont modifié leur activité à court terme en réponse au stimulus étudié (Dragunow and Faull, 1989, Perrin-Terrin et al., 2016). Elle a notamment été utilisée *in vivo* et *ex vivo* pour mettre en évidence des changements d'activités au sein de populations neuronales qui élaborent ou régulent la CCR en réponse à diverses conditions expérimentales comme une hypoxie, une hypercapnie ou encore une application de substances pharmacologiques (Erickson and Millhorn, 1994, Teppema et al., 1997, Okada et al., 2002, Bodineau et al., 2004, Voituron et al., 2006, Voituron

et al., 2011). En outre il est important de noter que la diversité des stimuli pouvant induire des modifications de l'expression de *c-fos* oblige l'expérimentateur à minimiser et à standardiser les manipulations pouvant induire des modifications de l'activité neuronale qui ne sont pas liées au stimulus étudié de façon à ce que seul le paramètre qui diffère entre les animaux témoins et exposés soit responsable des effets observés.

Dans le cadre de ce travail doctoral, la détection de c-FOS a été entreprise sur les préparations *ex vivo* fixées immédiatement après avoir subi le protocole expérimental, afin de visualiser les groupements cellulaires dont l'activité a été modifiée. Nous avons ensuite couplé cette détection à celle d'autres marqueurs afin d'être en mesure de caractériser précisément les neurones dont l'activité été modifiée.

# II- Contexte de l'étude

## II.1- Du génotype PHOX2B au phénotype CCHS

## II.1.1- Implication du gène PHOX2B

Le syndrome d'Ondine est une pathologie neuro-respiratoire qui résulte d'une mutation du gène PHOX2B et qui est caractérisée par une abolition ou une forte diminution de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Amiel et al., 2003). Comme dit en introduction (cf : Introduction, Chapitre III- II.2.2. Du génotype PHOX2B au phénotype CCHS) ce gène code un facteur de transcription, essentiel dans la régulation et le développement du système nerveux végétatif central et périphérique (Pattyn et al., 1997, 1999, Amiel et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2003). Il est notamment nécessaire pour une expression correcte du gène codant la tyrosine hydroxylase et la dopamine-β-hydroxylase et dans la régulation de la transcription du gène Phox2a nécessaire au développement du LC (Tiveron et al., 1996, Lo et al., 1999, Adachi et al., 2000, Flora et al., 2001). Ainsi le dysfonctionnement de Phox2b a pour conséquence d'entrainer un défaut de développement du LC et un défaut de biosynthèse des catécholamines. Les mutations du gène Phox2b, résultent en des changements de conformation de la protéine qui entraine soit la liaison défectueuse de PHOX2B sur les régions cibles soit à une altération du recrutement des cofacteurs ne permettant pas alors aux protéines mutées d'exercer leurs fonctions de transactivation normales (Bachetti et al., 2005, Di Zanni et al., 2012). De plus il a été mis en évidence que certaines protéines mutées forment des agrégats intracytoplasmiques toxiques qui pourraient également compromettre le repliement d'autres protéines et influencer des fonctions cellulaires plus générales (Albrecht et al., 2004, Caburet et al., 2004, Bachetti et al., 2005, Trochet et al., 2005, Di Zanni et al., 2012). Enfin des auteurs avancent le fait que les mutations du gène PHOX2B sont responsables de l'haploinsuffisance du gène non muté en entrant en concurrence avec le produit de l'allèle de type sauvage (Albrecht et al., 2004, Caburet et al., 2004, Bachetti et al., 2005).

#### II.1.2- Les limites des modèles CCHS de souris

Sur la base des études réalisées sur des modèles de souris, un consensus existe aujourd'hui concernant l'origine de perte de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  qui serait dû au dysfonctionnement des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG. En effet la création d'un modèle de souris porteuses de la mutation humaine la plus fréquente (Phox2b<sup>27Ala/+</sup>) (Dubreuil et al., 2008) (cf : Introduction, Chapitre III- II.2.3- Modèles CCHS de souris) a permis de mettre en lien la perte de la réponse respiratoire à l'hypercapnie chez ces nouveau-nés mutants avec la diminution de 60 à 80 % du nombre de neurones PHOX2B-positifs/vGLUT2-positifs au niveau de la région du RTN/pFRG, décrits comme ayant un rôle clé dans les mécanismes de chémosensibilité centrale au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Mulkey et al., 2004, Dubreuil et al., 2008). De plus, à l'exception du RTN/pFRG, aucun défaut anatomique n'a été mis en évidence au niveau des corps carotidiens, du LC, de la région A5, du NTS, ainsi qu'au niveau des groupes cellulaires PHOX2B-négatifs i.e. le préBotz et les noyaux des raphés RPa ROb et RMg (Dubreuil et al., 2008). Par la suite la création de souris mutantes porteuses de la mutation Phox2b<sup>27Ala/+</sup> spécifiquement dans le RTN/pFRG ont été générées (Ramanantsoa et al., 2011b) et ont permis de montrer que ces souris présentent à la naissance un phénotype respiratoire concordant avec celui de l'Homme.

En revanche, il est important de noter les discordances qui existent entre ces souris mutantes et le phénotype observé chez l'Homme. Premièrement les souris mutantes Phox2b<sup>27Ala/+</sup> spécifiquement dans le RTN/pFRG présentent à partir de 3 semaines une augmentation significative de la réponse à l'hypercapnie. A 4 mois cette réponse s'est encore renforcée mais n'est qu'à 40% de la réponse observée chez les souris témoins (Ramanantsoa et al., 2011b). Cette récupération partielle de la chémosensibilité suggère que bien que les neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG soient requis pendant la période périnatale, des mécanismes compensatoires partiels encore inconnus contribueraient à restaurer une chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Bien que très intéressante cette observation doit être pondérée par le fait que chez ces souris (chez qui la mutation est restreinte au RTN/pFRG) le mécanisme compensatoire contribuant à restaurer une chémosensibilité pourrait dépendre d'une structure dont le développement ou le fonctionnement serait sous tendu par la présence de *Phox2b* non muté et donc ne serait pas présente chez les patients CCHS.

Deuxièmement, chez les souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup> l'analyse histologique effectuée ne révèle aucune anomalie anatomique au niveau du LC. Cette observation est en contradiction avec une étude réalisée *post-mortem* sur des encéphales issus de deux nouveau-nés CCHS porteur d'une mutation PARM et NPARM (Nobuta et al., 2015) qui montre que ces encéphales présentent un défaut de développement du LC. De plus les auteurs ont développé un modèle de souris mutantes inductibles porteuses de la même mutation NPARM que celle que portait le nouveau-né CCHS mentionné ci-dessus et ont ainsi pu montrer qu'en déclenchant la mutation au stade embryonnaire précoce (< E10,5) cela entrainait un défaut de développement du LC, tandis que l'induction de la mutation à un stade plus avancé (E 11,5, stade à partir duquel le LC est normalement formé) ne nuit pas à son développement (Nobuta et al., 2015). Ces résultats sont fortement corroborés par les études relatées plus haut qui ont montré que PHOX2B est nécessaire pour le développement du LC ainsi que pour la biosynthèse des catécholamines (Tiveron et al., 1996, Adachi et al., 2000, Flora et al., 2001).

Enfin la preuve formelle de l'existence d'un groupe de neurones PHOX2B-positifs chez l'Homme équivalent au RTN/pFRG décrit chez le rongeur n'a pas, à notre connaissance, été clairement établie. Les études qui ont cherché à mettre en évidence l'existence d'un équivalent du RTN/pFRG rongeur chez l'Homme ont tenté d'identifier par analogie avec les données animales un groupe de neurones positifs pour PHOX2B et NK1R et négatif pour la TH (Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012). Bien qu'un groupe de neurones ait été identifié au niveau de la jonction bulbe rachidien et du pont situé ventralement par rapport au noyau facial et latéralement par rapport aux olives supérieures, les photographies illustrant les marquages sont à notre sens peu convaincantes. On peut également regretter le fait que PHOX2B n'ai pas été détecté de façon concomitante avec NK1R et TH (Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012). De plus Nobuta de collaborateurs expliquent dans leur étude avoir tenté de repérer le RTN/pFRG humain décrit par les études de Rudzinski et Kapur et Lavezzi et collaborateurs sans y être parvenu (Nobuta et al., 2015). Outre ces considérations sur les données disponibles dans la littérature, au cours de ce doctorat, un travail en collaboration avec l'équipe du Docteur Brian LAU (Neurochirurgie expérimentale, U1127-INSERM/UMR-7225 CNRS/Université Pierre et Marie Curie) à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) a été entrepris; ce travail vise à développer un atlas numérique, histologique, tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain, pour cartographier les structures qui contrôlent la respiration, en combinant des techniques d'imagerie et d'histologie (cf: Annexes Construction d'un atlas numérique tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain localisant les structures respiratoires). Dans ce cadre nous avons tenté de localiser les neurones du RTN/pFRG humain décrit dans la littérature mais malgré nos efforts exhaustifs, les expériences visant à les caractériser aussi bien par à un anticorps anti-PHOX2B commercial (sc-13226, Santa Cruz) que par un anticorps fourni par le Dr Jean-François Brunet (ENS Biologie, Paris) n'ont pas abouti à des résultats convaincants.

#### II.1.3- les stratégies thérapeutiques

Les mécanismes par lesquels la mutation *PHOX2B* aboutit au phénotype CCHS restent encore à élucider ; une problématique importante ne pouvant que contribuer à l'obtention d'un traitement pharmacologique. En effet aucun traitement n'est actuellement disponible et la prise en charge est centrée sur le volet respiratoire dont l'objectif est d'assurer une dioxygénation adéquate des tissus et une clairance efficace du CO<sub>2</sub> (Marcus et al., 1991, Gozal, 1998, Healy and Marcus, 2011). Dans ce cadre, différentes stratégies thérapeutiques ont été et sont actuellement envisagées.

Parmi elles différentes études ont testé sur les patients CCHS des agents pharmacologiques utilisés comme stimulants respiratoires pour promouvoir l'eupnée, comme le doxaparam (Hunt et al., 1979), l'almitrine (Naeije et al., 1982, Oren et al., 1986), la théophylline, la caféine, la naloxone, l'acétazolamide et ont conclu à l'inefficacité de ces traitements (Weese-Mayer et al., 1992b). Il est également important de noter que la médroxyprogestérone un progestatif de la famille des pregnanes n'a pas non plus été en

mesure d'induire des augmentations de la ventilation minute pendant le sommeil chez les patients CCHS (Weese-Mayer et al., 1992b).

Une autre piste de recherche consiste à contrecarrer la toxicité des agrégats cytoplasmiques formés par la forme PHOX2B mutée en favorisant le recrutement des heatshock proteins (HSPs) notamment HSP40 et HSP70. En effet il a été montré *in vitro* que la formation d'agrégats été contrecarrée en présence de geldanamycine un antibiotique qui inhibe HSP90 et qui conduit *de facto* à augmenter l'expression de *Hsp40* et *Hsp70* (Sittler et al., 2001). Par ailleurs en plus d'empêcher la formátion agrégats la geldanamycine permettrait également d'éliminer les agrégats déjà formés et de rétablir une transactivation normale de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase par PHOX2B (Trochet et al., 2005, Bachetti et al., 2007). Dans ce contexte l'action combinée du 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycine, un autre inhibiteur connu de HSP90) et de la curcumine (connue pour ses propriétés d'anti agrégation de protéines) se sont révélés efficaces pour restaurer la localisation nucléaire et la capacité de transactivation de PHOX2B en favorisant l'élimination des agrégats de protéines mutantes (Di Zanni et al., 2012).

Enfin, en lien direct avec la problématique de ce travail doctoral, une observation fortuite a permis de suggérer que les progestatifs de la famille des gonanes constituent une piste thérapeutique prometteuse. En effet comme relaté dans l'introduction (*cf* : *Introduction, Chapitre IV- III.2.1- Effet des systèmes progestéronergiques chez l'Homme*), il a été observé chez deux patientes CCHS une récupération de la réponse respiratoire à l'hypercapnie associée à la prise d'un puissant progestatif de la famille des gonanes : le désogestrel (Straus et al., 2010).

Au vu des données de la littérature montrant les effets facilitateurs de la progestérone sur la ventilation de base et la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Zwillich et al., 1978, Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990, Bayliss and Millhorn, 1992, Jensen et al., 2005, Slatkovska et al., 2006) il a été suggéré que le desogestrel ou plutôt l'ETO avait permis d'induire une récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Straus et al., 2010). On pourrait initialement penser que cet effet est médié de façon prépondérante par une action des gonanes sur les récepteurs à la progestérone et bien qu'il soit à l'heure actuelle impossible d'exclure cette hypothèse, une étude publiée en 2002 laisse suggérer que l'effet des gonanes pourrait être d'avantage médié par une action spécifique sur un récepteur appartenant à un autre système de neurotransmission. En effet dans cette étude de 2002, la réponse respiratoire à l'hypercapnie a été testée chez une patiente CCHS enceinte, une condition physiologique associée à une forte augmentation du taux de progestérone circulante (Sritippayawan et al., 2002). Or cette patiente n'a montré aucune amélioration de la réponse respiratoire à l'hypercapnie ce qui suggère que la progestérone n'a pas été en mesure d'enclencher les mécanismes capables de restaurer la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Cette observation corroborée par une étude qui a montré que la médroxyprogestérone n'augmentait pas non la ventilation minute chez les patients CCHS (Weese-Mayer et al., 1992b), suggère donc que parmi l'éventail de cibles moléculaires via lesquels l'ETO a exercé son effet les cibles qui sont communes avec la progestérone i.e. les récepteurs nucléaires et membranaires à la progestérone, semble peu probable bien que cette possibilité ne peut pas être exclue. Nous privilégions l'hypothèse selon laquelle l'ETO a agi *via* un récepteur appartenant à un autre système de neurotransmission. En effet comme relaté précédemment (*cf* : *Introduction, Chapitre IV- II.3. Récepteurs à d'autres messagers chimiques*) les stéroïdes naturels ou de synthèse sont capables de moduler de façon allostérique positivement ou négativement des récepteurs ionotropiques sur la base de leur structure chimique. En outre, il est important de noter que la récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sous désogestrel chez les patientes CCHS ne semble pas être systématique. En effet, une étude réalisée par une équipe américaine a montré qu'une patiente exposée délibérément au désogestrel n'a pas présenté de restauration de la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Li, 2013). Cette étude corrobore des données préliminaires obtenues par le Professeur Christian STRAUS au sein de notre unité de recherche<sup>5</sup>. Le fait que ces patientes soient « non-répondeuses » au désogestrel pourrait dépendre de la complexité d'action des progestatifs ou du principe d'idiosyncrasie ou des deux.

Ainsi identifier et comprendre les bases physiologiques de la récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  induite par l'ETO est une condition préalable cruciale pour pouvoir évaluer les conditions dans lesquelles ce progestatif pourrait constituer une piste thérapeutique pour le traitement des CCHS et des CHS en général. Ce travail doctoral s'est focalisé sur les potentielles actions centrales que pourrait exercer l'ETO. En effet, les stéroïdes naturels ou synthétiques sont considérés comme neuroactifs, dès lors que des études ont montré leur capacité à initier des voies génomiques et non génomiques influençant les fonctions neuronales (Baulieu, 1991, Barann et al., 1999, Rupprecht and Holsboer, 1999, Behan and Wenninger, 2008, Brinton et al., 2008, Behan and Kinkead, 2011). De plus, il est admis que la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  est principalement sous-tendue par des mécanismes centraux (Nattie, 1999, Lahiri and Forster, 2003, Chernov et al., 2010, Guyenet et al., 2010a, Guyenet et al., 2014, Guyenet and Bayliss, 2015) ; et comme évoqué plus haut (*cf* : *Discussion générale* : *1.1.1- Chez la femme sous traitement contraceptif*) les arguments sont en faveur du fait que l'ETO est capable de passer la BHE (Pardridge and Mietus, 1979).

## III- Effets de l'étonogestrel sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique

III.1- L'étonogestrel renforce la réponse respiratoire à l'acidose métabolique - un mécanisme qui dépend de la présence de structures diencéphaliques

En travaillant sur des préparations *ex vivo* de rat nouveau-nés, nous avons cherché à évaluer les effets centraux de l'ETO sur la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$ . Nos résultats montrent que l'ETO à  $5\cdot10^{-1}$  µM d'avantage qu'à 1µM induit un renforcement de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$ . Ce résultat suggère que l'ETO doit être présent dans une gamme de

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> <sup>5</sup>.L'essai clinique « RespirOndine » (NCT01243697) a été mis en place en 2010 par le Pr Christian Straus, directeur adjoint de l'UMR\_S 1158, chef du service central d'explorations fonctionnelles respiratoires à l'hôpital de La Pitié Salpêtrière et responsable de la branche adulte du centre de référence du syndrome d'Ondine

concentration restreinte au sein du SNC pour être en mesure d'exercer son effet. La concentration  $5 \cdot 10^{-1} \mu$ M d'ETO est 20 fois supérieure à la concentration présumée d'ETO dans le LCR de la femme adulte sous traitement au désogestrel ( $2,5 \cdot 10^{-2} \mu$ M). En revanche comme relaté plus haut (*cf* : *Discussion générale, Chez la femme sous traitement contraceptif*) cette concentration est très probablement sous-estimée. De plus cette différence pourrait également s'expliquer par le fait que nos expériences sont menées sur le rat nouveau-né et donc sur un modèle ou le SNC est encore immature. Ce résultat revêt un intérêt particulier au regard des patientes dites « non-répondeuses » au désogestrel. De fait, au vu de nos résultats nous pouvons supposer que l'absence d'effet du progestatif observé chez ces patientes pourrait être dû à un surdosage ou sous dosage de désogestrel. La dose à administrer pour chaque patientes pourrait dès lors être évalué au cas par cas, en fonction de l'indice de masse corporel et de la présence, par exemple, de troubles du métabolisme hépatique qui entrainerait des variations de la concentration sérique en désogestrel

Par ailleurs nos résultats montrent que l'effet de l'ETO nécessite l'activation d'un mécanisme qui dépend de la présence du diencéphale. Pour en arriver à cette dernière constatation nous avons travaillé avec différents types de préparations *ex vivo* : MS, PMS, BS et DBS.

Dans un premier temps, nous avons constaté que la f<sub>R</sub> de base développée par les différentes préparations était significativement différentes en fonction des subdivisions encéphaliques présentes. En effet les préparations MS présentaient une f<sub>R</sub> de base significativement plus élevée par rapport aux préparations PMS, BS et DBS. Cet effet modérateur de l'ajout des structures suprabulbaires sur la f<sub>R</sub> pourrait dépendre des neurones noradrénergiques de la région A5 connue pour exercer une influence modératrice sur la VLM en agissant par l'intermédiaire des récepteurs  $\alpha 2$  (Hilaire et al., 1989, Errchidi et al., 1991, Hilaire et al., 2004, Voituron et al., 2011). En outre, les données de la littérature suggèrent que des structures mésencéphaliques exercent également une influence modératrice sur la VLM (Okada et al., 1998, Voituron et al., 2005). Cependant, la (les) structure(s) et mécanismes(s) mésencéphalique(s), qui sous-tendent cet effet, n'ont pas encore été identifiés. D'autre part, la f<sub>R</sub> de base développée par les préparations DBS était significativement plus élevée par rapport à celles développées par les préparations BS et PMS. Cette observation est conforme aux expériences de transsection effectuées sur des préparations ex vivo de rat nouveau-né, ayant montrées que l'ablation du diencéphale diminue la  $f_R$  et donc que les structures diencéphaliques auraient une influence facilitatrice sur la CCR (Okada et al., 1998).

Ensuite nos séries expérimentales nous ont amené à évaluer la réponse respiratoire à l'acidose métabolique en fonction des différentes préparations. Nos résultats suggèrent que le fait d'ajouter des subdivisions encéphaliques ne modifie pas l'augmentation de la  $f_R$  induite par l'acidose métabolique dans la mesure où cette réponse est équivalente entre toutes les préparations : DBS, BS, PMS et MS. Initialement, nous supposions que le fait d'ajouter des subdivisions suprabulbaires allait augmenter statistiquement cette réponse, puisqu'elles contiennent des neurones chémosensibles au  $CO_2/H^+$  (Oyamada et al., 1998, Kramer et al., 1999, Li and Nattie, 2006, Williams et al., 2007, Guyenet et al., 2010a, Lopes et al., 2012, Li et al., 2013). Et cela de surcroit car, comme le suggère notre analyse de l'expression de *c-fos* en acidose métabolique, des études ont montré que dans des modèles déafférentés (tronc

cérébral isolé, ou sur tranche) la capacité des neurones de ces structures à être chémosensibles au  $CO_2/H^+$  est préservée (Miles, 1983, Richerson, 1995, Oyamada et al., 1998, Kramer et al., 1999, Mulkey et al., 2004, Williams et al., 2007, Gestreau et al., 2010). Cependant, cette observation suggère que dans notre modèle d'étude de rat nouveau-né, la contribution de ces structures à la réponse respiratoire à l'acidose métabolique serait moindre par rapport à ce qui se produirait dans un modèle adulte afférenté et que cela résulterait en une augmentation de la f<sub>R</sub> de même ampleur. En effet, en étudiant *in vivo* le profil d'expression de *c-fos* en réponse à une hypoxie au cours du développement chez le rat, il a été démontré que le nombre de neurones c-FOS positifs dans les structures liées à la CCR augmentait fortement au cours des 2 premières semaines postnatales, suggérant ainsi que la moindre participation de ces structures aux adaptations respiratoires pourrait être sous-tendu par l'immaturité du SNC (Berquin et al., 2000b). Cet état de fait pourrait donc contribuer à ce que nous observons en acidose métabolique.

Enfin cette série d'expériences nous a permis de montrer qu'en l'absence du diencéphale l'ETO ne parvient pas à exercer son effet facilitateur sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique et donc que l'effet de l'ETO nécessiterait l'activation d'un mécanisme qui dépend du diencéphale. Nous avons dès lors, au vu des données de la littérature, supputé l'implication d'une population neuronale appartenant à l'hypothalamus caudal. En effet dès 1936 il a été montré que la stimulation électrique de l'hypothalamus caudal entraine un effet facilitateur sur la respiration (Kabat, 1936) et comme dit précédemment (cf : Introduction-Chapitre II- IV.3- L'hypothalamus caudal) les enregistrements unitaires réalisés sur les neurones de l'hypothalamus caudal ont montré qu'ils sont stimulés par l'hypercapnie indépendamment de l'influence des chémorécepteurs périphériques (Cross and Silver, 1963, Dillon and Waldrop, 1993). Par ailleurs une étude de Bayliss et collaborateurs a montré chez le chat que l'effet facilitateur de l'administration de progestérone sur l'activité du nerf phrénique n'était pas modifié quand l'animal était décortiqué et était fortement diminué en cas d'ablation des structures rostrales au tronc cérébral (Bayliss et al., 1990). Ces auteurs ont alors posé l'hypothèse que le diencéphale et notamment l'hypothalamus pourrait médier les effets facilitateurs de la progestérone sur la CCR (Bayliss et al., 1990, Bayliss and Millhorn, 1992).

# III.2- L'etonogestrel modifie l'expression de c-fos induite par l'acidose métabolique dans les structures centrales impliquées dans l'élaboration et/ou la régulation de la commande central respiratoire central

Dans un premier temps l'analyse de l'expression de *c-fos* nous a amené à constater qu'il n'y avait aucune différence significative du nombre moyen de neurones c-FOS positifs entre les préparations exposées à l'ETO ou au DMSO. Ces résultats corroborent ceux obtenus sur les préparations *ex vivo* de rat nouveau-nés qui montrent que l'ETO n'a pas d'effet sur la  $f_R$  en normopH, mais sont en contradiction avec les résultats obtenus sur des préparations MS de souris nouveau-nées. En effet une précédente étude publiée par le laboratoire a montré que l'ETO induit sur ces préparations une augmentation significative de la  $f_R$  en condition de normopH. Ces résultats seront discutés dans le *III.3. Implication de la signalisation orexinergique dans l'effet de l'étonogestrel* de la discussion générale.

En outre, nos expériences ont permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs en réponse à l'acidose métabolique dans différentes structures du tronc cérébral. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, dans la mesure où l'augmentation de l'expression de c-fos a été observé au niveau du RTN considéré comme le principal site chémosensible au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> (Mulkey et al., 2004, Guyenet and Bayliss, 2015) ainsi que dans le LC (Oyamada et al., 1998), le PP (Ribas-Salgueiro et al., 2006), le PeF (Li et al., 2013), le vINTS (Miles, 1983, Dean et al., 1990, Nattie and Li, 2002a) et la PAG (Kramer et al., 1999) dont les neurones ont également été décrit comme étant chémosensibles au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Il est également important de noter qu'une augmentation significative du nombre de neurones c-FOS positifs a également été observée dans la VLM. Ce groupe neuronal correspond à une colonne de neurones ventrale au noyau ambigu qui s'étend de la décussation pyramidale à la limite caudal du noyau facial et qui englobe notamment les neurones du préBotz et de A1C1 (Voituron et al., 2011). Notre hypothèse est que l'augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs dans la VLM en acidose métabolique est sous-tendu par le fait que les structures sus-citées augmentent leur activité en réponse à l'acidose métabolique et envoie des afférences excitatrices sur la VLM qui traduit alors ces afférences excitatrices en une augmentation de la  $f_R$ . En effet plusieurs études ont démontré, directement ou indirectement, l'existence de liens anatomiques et fonctionnels entre la VLM et les structures citées ci-dessus : vINTS (Miles, 1983, Ross et al., 1985, Otake et al., 1989), RTN (Mellen et al., 2003, Janczewski and Feldman, 2006, Pagliardini et al., 2011), PP (Stornetta and Guyenet, 1999, Ribas-Salgueiro et al., 2006), LC (Coates et al., 1993, Oyamada et al., 1998, Li and Nattie, 2006, Biancardi et al., 2008), PAG (Ryan and Waldrop, 1995, Horn and Waldrop, 1998) et PeF (Li et al., 2013).

Enfin, notre analyse a montré que différentes structures du tronc cérébral présentaient un nombre de neurones c-FOS positifs significativement plus important sous ETO que sous DMSO nous conduisant à formuler le concept de populations neuronales suractivées ou activées *de novo* sous acidose métabolique par l'ETO.

En effet nous avons considéré que les structures activées sous acidose métabolique en l'absence du progestatif qui, en présence du progestatif, ont présentées une plus forte augmentation de l'expression de *c-fos* ont été suractivées par l'ETO *i.e.* la VLM, le vINTS, le LC et la vIPAG. D'autre part les structures qui n'ont pas étaient activées sous acidose métabolique en absence d'ETO mais ont présenté une augmentation de leur expression de *c-fos* en présence du progestatif *i.e.* le cNTS, le mNTS, le RPa, le Rob et la IPAG, ont été considérées comme ayant été activées *de novo* par l'ETO.

Ainsi nous émettons l'hypothèse que le renforcement la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sur les préparations DBS exposées à l'ETO est sous-tendu par la suractivation des neurones de la VLM, du vINTS, du LC et de la vIPAG ainsi qu'à l'activation des neurones du cNTS, du mNTS, du RPa, du Rob et de la IPAG. En effet en plus des liens décrits ci-dessus il a également été décrit directement ou indirectement des liens anatomiques et fonctionnels

entre les structures qui élaborent la CCR et les structures dites activées : cNTS, mNTS (Norgren, 1978, Dean et al., 1990) et RPa et Rob (Connelly et al., 1989, Cao et al., 2006, Ptak et al., 2009, Kobayashi et al., 2010, Depuy et al., 2011). De plus, nos résultats suggèrent que les neurones du RTN et du pFRG ne sont pas impliqués dans les effets de l'ETO sur la réponse respiratoire à l'acidose métabolique. Ce résultat revêt un intérêt particulier au vu de notre problématique dans la mesure où ces neurones sont probablement absents ou dysfonctionnels chez les patients CCHS.

#### III.3- Implication de la signalisation orexinergique dans l'effet de l'étonogestrel

Le fait que notre analyse de l'expression de *c-fos* n'ait pas mis en évidence l'implication de structure diencéphalique était déconcertant au vu de nos données montrant que l'effet de l'ETO nécessite la présence du diencéphale. Nous avons donc recherché si l'effet de l'ETO pouvait être sous-tendu par une population neuronale éparpillée dans l'hypothalamus caudal et dont les données de la littérature étaient en faveur de leur implication dans notre étude. Ainsi, nos recherches se sont axées sur les neurones orexinergiques. En effet ces derniers, localisés exclusivement dans le diencéphale et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus caudal sont entremêlés avec beaucoup d'autres types de neurones (Williams et al., 2007), envoient des projections sur de très nombreuses structures impliquées dans l'élaboration ou la modulation de la CCR (Peyron et al., 1998, Date et al., 1999, Nambu et al., 1999) et ont été décrits comme étant chémosensibles (Williams et al., 2007, Song et al., 2012, Li et al., 2013). De plus les structures qui semble être mises en jeu par l'ETO comme le suggère l'analyse de l'expression de *c-fos*, reçoivent toutes des projections axonales provenant des neurones orexinergiques (Peyron et al., 1998, Date et al., 1999, Hagan et al., 1999, Nambu et al., 1999, Young et al., 2005, Zheng et al., 2005, Ohno and Sakurai, 2008, Huang et al., 2010, Shahid et al., 2012, Darwinkel et al., 2014). Ainsi des doubles détections c-FOS/orexine ont été réalisées sur les préparations DBS exposées à l'ETO à 5 10<sup>-1</sup> µM en acidose métabolique et ont révélé que le nombre de neurones double positifs dans l'hypothalamus caudal était augmenté en réponse à l'ETO. Cette donnée suggérait donc que le progestatif active ces neurones.

Un autre argument en faveur de l'implication de la signalisation orexinergique dans le mécanisme d'action de l'ETO est le fait que l'effet de ce dernier sur les préparations DBS en acidose métabolique est abolit en cas de co-application avec l'almorexant, un antagoniste de OX1R et OX2R (Brisbare-Roch et al., 2007). L'almorexant a été précédemment utilisé *in vivo* pour analyser les effets respiratoires sous-tendus par la signalisation orexinergique (Li and Nattie, 2010). En revanche Li et Nattie ont montré que le blocage pharmacologique des récepteurs à l'orexine diminue la réponse respiratoire à l'hypercapnique notamment en réduisant la f<sub>R</sub>, alors que nos résultats montrent que la réponse respiratoire à l'acidose métabolique dans les préparations témoins (exposées au DMSO) est équivalente à celle observée sans almorexant. Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait que la contribution des neurones orexinergiques à la réponse respiratoire à l'hypercapnie est dépendante de l'état de vigilance, de sorte que l'antagonisation des récepteurs à l'orexine diminue cette réponse pendant l'éveil mais pas pendant le sommeil (Li and Nattie, 2010). Cette contribution vigilance-dépendante a été étayée par de nombreuses données de la littérature (*cf* :

Introduction, Chapitre I- IV.4.1.3- Lien anatomique et fonctionnel avec la commande centrale respiratoire) (Nakamura et al., 2007, Dias et al., 2009, Dias et al., 2010, Kuwaki et al., 2010). Dans notre modèle déafférenté, les mécanismes télencéphaliques responsables d'une partie des influences excitatrices liées à l'éveil comme les influences d'origine corticale (provenant par exemple du cortex moteur), ou les influences provenant de structures appartenant au système limbique (émotions) et sensorielles (auditives et visuelles) sont absentes, ce qui pourrait mettre au silence une partie des neurones orexinergiques et contrecarrer ou modérer fortement leur contribution à la réponse respiratoire à  $CO_2/H^+$ .

En outre, l'implication de la signalisation orexinergique dans les effets de l'ETO est également corroborée par l'analyse de l'expression de *c-fos* réalisée sur les préparations exposées au DMSO et à l'ETO en présence d'almorexant. En effet ces résultats montrent qu'en présence d'almorexant, l'ETO ne parvient plus dans la quasi-totalité des cas à induire une augmentation de l'expression de *c-fos* : dans les neurones de la VLM, du vINTS, du cNTS, du mNTS, du LC, de la vIPAG et de la IPAG. Sur la base de ces observations et des résultats obtenus précédemment, nous émettons l'hypothèse que la suractivation des neurones de la VLM, du vINTS, du LC et de la vIPAG ainsi que l'activation des neurones du cNTS, du mNTS et de la IPAG, sont dépendants d'une libération d'orexine induite par l'ETO et que les effets de l'orexine sont médiés par OX1R et OX2R. Cependant, il est également concevable que la mise en jeu de ces structures soit indirectement ou à la fois indirectement et directement dépendante de la libération d'orexine induite par ETO. En effet, en plus d'une activation (si tel est le cas) par l'orexine, une structure (par exemple la VLM) peut également être indirectement activée par la libération d'orexine induite par l'ETO par le biais de l'activation d'une autre structure (par exemple: le cNTS), dans la mesure où des liens anatomiques et/ou fonctionnels ont été décrits entre la VLM et toutes les structures sus-mentionnées (Miles, 1983, Ross et al., 1985, Dean et al., 1990, Coates et al., 1993, Horn and Waldrop, 1998, Oyamada et al., 1998, Zhang et al., 2005b, Li and Nattie, 2006, Biancardi et al., 2008) ; ou par exemple entre la PAG et le NTS (Cameron et al., 1995a, Cameron et al., 1995b), entre le LC et la PAG (Luppi et al., 1995), ou encore entre le LC et le NTS (Cedarbaum and Aghajanian, 1978, Luppi et al., 1995). En outre, il est possible que le renforcement de la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> soit également soustendu au moins partiellement par un effet facilitateur exercé par l'orexine sur les motoneurones phréniques dans la mesure où une étude a montré qu'ils expriment OX1R (Young et al., 2005) et que ces derniers sont présents dans les préparations ex vivo. De plus il est également important de noter à ce niveau qu'il a été observé sous co-application almorexant/ETO une diminution significative du nombre de neurones double-positifs c-FOS/orexine dans l'hypothalamus caudal en comparaison de ce qui a été observé en absence d'almorexant. Selon une étude de Song et collaborateurs, le mécanisme qui sous-tend la chémosensibilité des neurones orexinergiques repose sur l'expression du récepteur acidsensing ion channel 1a (ASIC1a). L'expression de ce récepteur dans les neurones orexinergiques est restreinte à ceux situés dans LH (Song et al., 2012). On peut dès lors supposer que l'ETO a été capable d'activer cette sous-population de neurones orexinergiques exprimant ASIC1a, ce qui a ensuite conduit à activer ceux situés ailleurs dans l'hypothalamus caudal, puisqu'il a été démontré que l'orexine excite directement les neurones orexinergiques via OX1R et OX2R (Backberg et al., 2002, Yamanaka et al., 2010).

Comme dit précédemment (cf: Introduction, Chapitre I- IV.4.1- Les neurones orexinergiques) la synthèse des neuropeptides orexine A et B se fait par clivage d'un précurseur, la prépro-orexine (Ohno and Sakurai, 2008). A notre connaissance leurs effets sont médiés exclusivement par deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR), nommés OX1R couplé à une protéine Gq (Lund et al., 2000) et OX2R couplé à des protéines Gq et Gi/Go. Le profil de distribution de ces deux récepteurs varie le long du SNC (Dias et al., 2009)(Ohno and Sakurai, 2008). Cette observation mise en lien avec le fait que les récepteurs sont couplés avec différentes protéines G sous-tendent vraisemblablement les divers rôles physiologiques de l'orexine (Ohno and Sakurai, 2008). Conformément au fait que OX1R et OX2R sont couplés aux protéines Gq il a été montré sur des neurones en culture que la fixation de l'orexine A sur OX1R provoque des augmentations robustes du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire en recrutant la phospholipase C (van den Pol et al., 1998, Lund et al., 2000). La phospholipase C va en effet catalyser l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate en diacylglycérol et en inositol triphosphate (IP3). Ce dernier en se fixant sur son récepteur IP3R localisé à la membrane du réticulum endoplasmique va entrainer une libération de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol. Cette observation est à mettre en lien avec des études qui montrent que la fixation de l'orexine sur OX1R ou OX2R induit une dépolarisation s'accompagnant d'une augmentation de la fréquence de décharges par exemple au niveau des neurones noradrénergique du LC, des neurones histaminergiques du noyau tubéromamillaire, des neurones adrénergiques et noradrénergiques de la VLM, ainsi qu'au niveau des neurones sérotoninergique du raphé dorsal (Hagan et al., 1999, Brown et al., 2001, Eriksson et al., 2004, Huang et al., 2010, Lazarenko et al., 2011). On peut dès lors imaginer que la dépolarisation des neurones qui a été observée dans les études mentionnées ci-dessus soit sous-tendue par le fait que la fixation de l'orexine sur ses récepteurs induit des influx Ca<sup>2+</sup> intracellulaires.

Ainsi dans notre étude les neurones des structures dont l'augmentation de l'expression de *c-fos* en réponse à l'ETO est abolie en présence d'almorexant *i.e.* VLM, vINTS, cNTS, mNTS, LC, vIPAG et IPAG seraient activés directement ou indirectement à la suite de la libération d'orexine.

En revanche, en présence d'almorexant le RPa et le ROb présentent toujours une plus grande quantité de neurones c-FOS positifs sous ETO que sous DMSO, suggérant que l'ETO activerait ces structures en acidose métabolique indépendamment de son effet sur les neurones orexinergques. Néanmoins, cette potentielle action de l'ETO sur le ROb et le RPa ne serait pas suffisante pour induire un renforcement de la réponse respiratoire  $CO_2/H^+$ , dès lors que cette réponse n'est pas observée dans les préparations MS. Ces observations sont à mettre en perspective avec les résultats obtenus au sein du laboratoire dans lequel ce travail a été effectué qui ont montré l'implication des neurones sérotoninergiques des RPa et ROb dans l'effet facilitateur de l'ETO en normopH sur des préparations MS de souris nouveau-nées (Joubert et al., 2016). A la différence de cette étude les présents résultats montrent que l'ETO sur les préparations DBS de rat nouveau-nés n'a pas d'effet significatif sur la f<sub>R</sub> en normopH et n'induit pas de différence dans le nombre de cellules c-FOS positives. La potentielle perte de

l'effet facilitateur de l'ETO en normopH induit par l'ajout des structures suprabulbaires suggère que l'ETO enclenche un (des) mécanisme(s) qui dépendent de la présence de ces structures et qui contrecarre sa potentielle influence facilitatrice sur les neurones sérotoninergiques du ROb et du RPa. Néanmoins, le fait que dans le ROb et le RPa, le nombre accru de neurones positifs pour c-FOS subsistent sous co-application avec l'almorexant suggère que la capacité de l'ETO à interagir avec les neurones sérotoninergiques du ROb et du RPa persiste dans une moindre mesure sur les préparations DBS de rat nouveau-né. D'autre part, nous ne pouvons pas exclure que le mécanisme requis par l'ETO pour augmenter la f<sub>R</sub> *via* l'activation des neurones sérotoninergiques chez la souris nouveau-née soit absent chez le rat nouveau-né.

Collectivement nos résultats suggèrent que le mécanisme par lequel l'ETO induit un renforcement de la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$  s'appuie sur l'activation de neurones orexinergiques de l'hypothalamus caudal et partiellement sur une action sur le ROb et le RPa. Nous posons l'hypothèse que l'activation des neurones orexinergiques par l'ETO induit une libération d'orexine sur plusieurs structures du tronc cérébral ; par la suite, la liaison de l'orexine sur OX1R et OX2R conduit à directement ou indirectement activer ou augmenter l'activité de ces structures du tronc cérébral qui exercent alors conjointement avec le ROb et le RPa un effet facilitateur cumulatif sur la CCR et renforce la réponse respiratoire au  $CO_2/H^+$ .

# III.4- Mécanisme d'action potentiel de l'etonogestrel sur les neurones orexinergiques

Les mécanismes enclenchés par l'ETO pour induire une libération d'orexine par les neurones orexinergiques restent encore à déterminer. Cependant nos résultats suggèrent que l'ETO est en mesure d'activer les neurones orexinergiques en cas d'acidose métabolique. Nous émettons alors l'hypothèse que l'ETO agit sur les neurones orexinergiques *via* un récepteur non identifié et que l'acidose métabolique est un prérequis essentiel sans quoi l'ETO n'induit pas de libération d'orexine.

Depuis leur découverte, un faisceaux d'argument s'est constitué autour du fait que les neurones orexinergiques sont chémosensibles au  $CO_2/H^+$  (Williams et al., 2007, Song et al., 2012, Li et al., 2013) (*cf* : *Introduction, Chapitre II- IV.3.1- Les neurones orexinergiques*) et que la contribution qu'apporte cette signalisation à la réponse respiratoire à l'hypercapnie est médiée par OX1R et OX2R (Deng et al., 2007, Dias et al., 2009, Dias et al., 2010, Nattie and Li, 2010, Vicente et al., 2016). La première étude qui a enregistré les neurones orexinergiques et a montré que ces derniers augmentaient leur fréquence de décharge en réponse à des variations de  $CO_2/H^+$  a suggéré que le mécanisme par lequel ces neurones captent ces variations reposait sur la fermeture de canaux de fuite potassiques similaires à ceux de la famille TASK (Williams et al., 2007). Un modèle de souris double KO pour TASK1 et TASK3 a ensuite été utilisé par Gonzalez et collaborateurs et a montré qu'en l'absence des canaux TASK1/3 la réponse à l'acidification des neurones orexinergiques était intacte (Gonzales et al., 2009). Par ailleurs, une autre étude publiée par Song et collaborateurs propose que les neurones orexinergiques ressentent les variations de  $CO_2/H^+$  grâce aux canaux ASIC1a

sensibles aux H<sup>+</sup> extracellulaires et perméables au Na<sup>+</sup> et au Ca<sup>2+</sup> (Song et al., 2012). En effet comme le montre cette étude les canaux ASIC1a sont exprimés par les neurones orexinergiques et l'augmentation de la décharge du nerf phrénique en réponse à l'acidification focale de LH était abolie en cas de destruction spécifique de ces neurones grâce à un anticorps anti-orexine couplé à la saporine et en présence d'un antagoniste de ASIC1a (Song et al., 2012). Au sein de la famille des canaux ASICs, ASIC1a est le seul à être perméable au Ca<sup>2+</sup> et à répondre à des fluctuations de pH dans la gamme physiologique (Deval et al., 2010, Kernder et al., 2014). L'activation des ASIC1a par les H<sup>+</sup> extracellulaires résulte en un influx de Na<sup>+</sup> et de Ca<sup>2+</sup> qui dépolarise le potentiel de membrane et enclenche différentes voies de signalisation.

D'autre part comme relaté précédemment (cf : Discussion générale- II.1.3 les stratégies thérapeutiques) les stéroïdes naturels ou synthétiques sont considérés comme neuroactifs (Baulieu, 1991, Barann et al., 1999, Rupprecht and Holsboer, 1999, Behan and Wenninger, 2008, Brinton et al., 2008, Behan and Kinkead, 2011). Parmi les acteurs moléculaires qui pourraient être la cible de l'ETO notre hypothèse est qu'il s'agit d'avantage de récepteurs membranaires qui médient des actions non-génomiques. En effet dans notre étude comme le temps d'exposition à l'ETO est relativement court (45 min) il semble peu probable que les effets observés sur la f<sub>R</sub> soient sous-tendus par des effets génomiques, même si l'hypothèse ne peut pas être exclue. Parmi les cibles de l'ETO donc, il y a les récepteurs membranaires à la progestérone ainsi que les récepteurs appartenant à d'autres systèmes de neurotransmission sur lesquels les progestatifs, tout comme la progestérone ou ces dérivés, peuvent agir sur *i.e.* les récepteurs membranaires à la progestérone (mPR, couplés aux protéines G), le progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1,) et le récepteur sigma 1 (Su et al., 1988, Monnet et al., 1995, Falkenstein et al., 1996, Meyer et al., 1996, Ganapathy et al., 1999, Smith et al., 2008, Johannessen et al., 2011, Pang et al., 2013). A notre connaissance la présence de récepteurs membranaires à la progestérone dans les neurones orexinergiques n'a pas été démontrée. Et comme dit précédemment l'hypothèse selon laquelle l'ETO exercerait son effet via des récepteurs à la progestérone semble elle aussi peu probable dès lors qu'il a été montré que la progestérone et la medroxyprogestérone n'ont pas été en mesure d'induire une récupération de la chémosensibilité chez une patiente CCHS (Weese-Mayer et al., 1992b, Sritippayawan et al., 2002). Ainsi l'hypothèse la plus probable est que l'ETO agisse sur un récepteur appartenant à un autre système de neurotransmission et que cela de façon concomitante à une activation des ASIC1a via l'acidose métabolique entraine une activation des neurones orexinergiques qui libèrent alors de l'orexine.

En se basant sur les données de la littérature et sur des résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire notre hypothèse est que le récepteur en question pourrait être le récepteur NMDA. En effet, un nombre croissant de modulateurs allostériques du récepteur NMDA ont été découverts et parmi eux les stéroïdes endogènes et synthétiques (Wu et al., 1991, Park-Chung et al., 1994, Weaver et al., 2000, Stastna et al., 2009). De plus des résultats obtenus sur des préparations MS de souris suggèrent que l'augmentation de la  $f_R$  induite par l'ETO serait sous-tendu par le fait que l'ETO potentialise l'effet facililateur sur la  $f_R$  qu'exerce la fixation du NMDA sur le récepteur NMDA en exerçant une modulation allostérique positive.

De fait les expériences de co-applications pharmacologiques ont montré que l'effet de l'ETO était supprimé après blocage des récepteurs NMDA. Ensuite sur la base d'enregistrements en patch clamp des neurones orexinergiques il a été proposé que ces derniers expriment le récepteur NMDA. En effet l'application de NMDA sur ces neurones entraine une dépolarisation du potentiel de membrane, vraisemblablement médiée par un influx de Ca<sup>2+</sup>, qui est aboli en présence d'un antagoniste spécifique du récepteur NMDA (Li et al., 2002, Yamanaka et al., 2003b). Enfin ces données sont à mettre en perspective avec une étude publiée en 2005 dans Neuron qui décrit une interaction fonctionnelle entre les ASIC1a et les récepteurs NMDA contenant les sous unités GluN1 et GluN2B (Gao et al., 2005). A noter qu'il a été montré que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2B sont préférentiellement exprimées chez le rat nouveau-né (Cull-Candy et al., 2001). Le mécanisme de régulation décrit dans cet article montre que les courants médiés par les canaux ASIC1a en réponse à une acidification du milieu extracellulaire sont significativement augmentés suite à la phosphorylation de ces derniers en serine 478 et 479. Ces phosphorylations sont la conséquence de l'activation de la Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dependant protein kinase II (CamKII) qui elle-même est activée suite à l'ouverture des récepteurs NMDA qui font entrer du Ca<sup>2+</sup> (Gao et al., 2005). L'augmentation des courants régis par les canaux ASIC1a n'est plus observable dès lors que les expériences sont réalisées en présence d'un antagoniste des sous-unités GluN2B, d'un inhibiteur de la CamKII, ou encore quand les sérines 478 et 479 sont remplacées dans le canal ASIC1a par des alanines (Gao et al., 2005).

Bien que ce ne soient ici que des hypothèses, en transposant ces données à notre étude on peut imaginer qu'une modulation allostérique positive du récepteur NMDA par l'ETO entraine une augmentation significative des courants induit par ASIC1a en réponse l'acidose métabolique. Les neurones orexinergiques activés libéreraient alors de l'orexine. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail doctoral avait pour objectif de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'ETO, un progestatif de la famille des gonanes, afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  de patientes Ondine exposées à cette molécule.

Ce travail s'est focalisé sur les mécanismes centraux mis en jeu par l'ETO lors d'une hypercapnie. Les données que nous avons obtenues nous ont permis de montrer que l'ETO était en mesure, dans une gamme de concentration bien précise, de renforcer la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Au vu des données de la littérature cette gamme de concentration semble être du même ordre de grandeur que ce qui est rencontré dans le LCR de la femme adulte sous traitement contraceptif au désogestrel.

Le mécanisme qui sous-tend cet effet sur la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> semble dépendre de la présence du diencéphale et plus précisément semble avoir pour origine l'activation des neurones orexinergiques localisés dans l'hypothalamus caudal. Le mécanisme par lequel l'ETO active les neurones orexinergiques reste encore à déterminer. Cependant nos résultats suggèrent que ce dernier est en mesure de les activer en cas d'acidose métabolique. De plus, en nous basant sur les données de la littérature nous avons émis l'hypothèse d'une action allostérique positive de l'ETO sur les récepteurs NMDA qui, combinée à la mise en jeu des canaux ASIC1a via l'acidose métabolique, conduirait à activer significativement les neurones orexinergiques. Bien évidemment ces hypothèses restent à valider. Pour cela, l'injection intra-ventriculaire d'un virus codant une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur à la prépro-orexine (Adamantidis et al., 2007) chez le rat juvénile, permettrait d'être en mesure de repérer les neurones orexinergiques au niveau de tranches réalisées au niveau de l'hypothalamus caudal. Il serait alors possible de réaliser des enregistrements intracellulaires de ces neurones (par une approche de patch-clamp) afin d'apprécier l'effet d'une exposition à l'ETO dans des conditions d'acidose métabolique. L'effet de co-exposition avec des antagonistes des différents récepteurs identifiés comme pouvant être impliqués dans les effets de l'ETO pourrait alors être testé. Nous pensons en particulier à des agents ciblant les récepteurs NMDA afin de valider ou d'invalider notre hypothèse. D'autre part, il serait également pertinent de montrer que l'ETO induit une libération d'orexine par les neurones orexinergiques. La réalisation de cultures organotypiques d'hypothalamus caudal (Cho et al., 2007) en présence ou non d'ETO et dans des conditions acidose métabolique permettrait de valider notre hypothèse. En effet l'orexine A et l'orexine B potentiellement libérées pourraient alors être dosées dans le surnageant à l'aide de test ELISA (LifeSpan BioScience, Inc. LS-F13365).

Par ailleurs nos résultats suggèrent que l'activation des neurones orexinergiques conduit au recrutement de différentes structures du tronc cérébral impliquées dans l'adaptation de la commande centrale respiratoire au travers des récepteurs OX1R et OX2R. Le renforcement de l'augmentation de l'expression de *c-fos* observé dans la VLM sur les préparations DBS exposées à l'ETO en acidose métabolique suggère alors que suite à leur activation ces structures exercent collectivement une influence excitatrice au niveau de la VLM. Par ailleurs, dans la mesure où il a été montré que les neurones du préBotz, contenus

dans la VLM, expriment le récepteur OX1R, on peut également supputer une action directe de la signalisation orexinergique sur ces neurones. La VLM, et plus particulièrement le préBotz, traduirait alors ces influences excitatrices en une augmentation de la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Pour tester ces hypothèses différentes expériences peuvent être envisagées. Parmi les structures recrutées via la signalisation orexinergique en présence d'ETO, le cNTS, le mNTS ainsi que le LC semblent être particulièrement activés et suractivés, toutes projetant de façon intensive vers la VLM (Norgren, 1978, Dean et al., 1990, Coates et al., 1993, Oyamada et al., 1998, Li and Nattie, 2006, Biancardi et al., 2008). La réalisation de doubles détections immunohistochimiques de c-FOS et de la tyrosine hydroxylase sur les préparations DBS exposées à l'ETO en acidose métabolique permettrait de déterminer si les neurones activés au sein de ces différentes structures sont catécholaminergiques. Par ailleurs, afin de prouver que la libération d'orexine induite par l'ETO entraine l'activation de ces structures, on pourrait utiliser le surnageant de la culture organotypique d'hypothalamus caudal exposée à l'ETO comme milieu conditionné et le mettre en présence de tranches de tronc cérébral contenant soit le LC, le cNTS ou le mNTS. L'effet de ce milieu conditionné sur l'activité des neurones appartenant à ces structures pourrait alors être apprécié en présence ou non d'almorexant. De plus pour confirmer que la modification d'activité observée est due à l'orexine libérée en réponse à l'ETO et non pas à un effet direct de l'ETO, un milieu conditionné témoin (conservé dans les mêmes conditions de temps et de température) dans lequel l'ETO a été ajouté mais qui n'a pas été mis en présence de la culture organotypique d'hypothalamus caudal pourrait également être testé. Si cette hypothèse est validée, cela pourrait suggérer que parmi les neurotransmetteurs impliqués dans l'effet de l'ETO sur la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> les catécholamines joueraient un rôle important. De la même façon, le surnageant récupéré sur les cultures organotypiques de LC, de cNTS et de mNTS permettrait de vérifier si les neurones de ces structures libèrent des catécholamines en réponse à l'orexine (Abbexa ELISA KIT abx051998). Enfin, ce second surnageant pourrait également être utilisé comme milieu conditionné et mis en présence de coupes de bulbe rachidien contenant le préBotz, les motoneurones et les racines motrices de l'hypoglosse (Smith et al., 1991). Les effets de l'exposition à ce milieu conditionné ainsi qu'à un milieu conditionné témoin pourraient alors être appréciés en enregistrant l'activité des axones des motoneurones de l'hypoglosse en présence ou non d'antagonistes des récepteurs aux catécholamines. L'implication du récepteur noradrénergique  $\alpha$ 1 serait particulièrement intéressante à tester dans la mesure où il a été décrit comme étant un des récepteurs via lequel la signalisation médiée par les neurones du LC exerce une influence excitatrice sur les neurones du préBotz (Hakuno et al., 2004, Viemari et al., 2004a, Viemari and Ramirez, 2006).

En outre l'effet de l'ETO pourrait également être testé sur des souris porteuses de la mutation *Phox2b*<sup>27Ala/+</sup> non restreinte au RTN/pFRG. Dans la mesure où, sur la souris nouveaunée, les préparations *ex vivo* contenant les structures suprabulbaires ne présentent pas de rythme en C4, des expériences analogues à celles réalisées sur les préparations DBS de rats nouveau-nés ne pourraient pas être réalisées. En revanche il est envisageable de réaliser une partie des expériences décrites ci-dessus sur les souris Phox2b<sup>27Ala/+</sup>. On peut par exemple exposer à l'ETO des cultures organotypiques d'hypothalamus caudal et réaliser des dosages dans le surnageant pour rechercher si l'ETO conduit les neurones à libérer de l'orexine. Ou encore exposer à l'orexine des cultures organotypiques contenant soit le LC, le cNTS ou le mNTS et vérifier en dosant le surnageant si les neurones contenus dans ces structures et plus particulièrement ceux du LC sont toujours capables malgré la mutation de libérer des catécholamines.

Au vu des résultats obtenus suite à ces expériences, d'autres expériences seront à réaliser *in vivo* à des stades de développement plus avancés. On pourra par exemple imaginer moduler, grâce des agonistes et antagonistes, les différents systèmes de neurotransmission identifiés chez le rat nouveau-né et enregistrer la ventilation *in vivo* par pléthysmographie chez le rat nouveau-né et adulte.

Manipuler la signalisation orexinergique chez les patients est difficilement envisageable au regard des effets pléiotropes qu'exerce cette signalisation sur le SNC, notamment en favorisant la prise alimentaire, en consolidant l'éveil, ou encore en augmentant la pression artérielle (Samson et al., 1999, Shirasaka et al., 1999, Matsumura et al., 2001, Monda et al., 2001, Ciriello and de Oliveira, 2003, Geerling et al., 2003). Pour autant identifier les effets secondaires induits par la signalisation orexinergique qui seraient néfastes pour les patients CCHS ne peut que contribuer à développer de nouvelles stratégies visant à les contrecarrer. De plus, si les expériences citées ci-dessus démontrent l'implication des catécholamines dans les effets de l'ETO, l'utilisation des agonistes des récepteurs de ces derniers pourrait constituer une piste de recherche intéressante. En effet à l'instar d'expériences actuellement en cours au laboratoire sur la signalisation sérotoninergique les agonistes des catécholamines co-appliquées avec l'ETO pourraient constituer un traitement permettant de compenser le potentiel dysfonctionnement de la signalisation des catécholamines chez les patients CCHS. Cette signalisation est particulièrement intéressante au regard de cette pathologie dans la mesure où des données suggèrent que le LC pourrait être absent, ou tout du moins non fonctionnel, chez les patients CCHS (Adachi et al., 2000, Flora et al., 2001, Nobuta et al., 2015) (cf : Discussion générale, II.1- du génotype PHOX2B au phénotype CCHS) et pourrait en partie être responsable de la perte de la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. Enfin, ces recherches ouvriront la voie à de nouvelles hypothèses de travail quant à la résistance de certaines patientes CCHS au traitement par le desogestrel. En effet nos résultats suggèrent que l'ETO agit dans une gamme de concentration bien précise, il conviendrait dès lors d'ajuster la dose de désogestrel à administrer au cas par cas. De plus parmi les hypothèses à envisager ces patientes résistantes pourraient présenter des polymorphismes de certains gènes impliqués dans la voie neuronale mise en jeu par l'ETO en acidose métabolique.

Ainsi les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ouvrent la voie à de nouvelles séries expérimentales à réaliser sur les rongeurs sauvages et mutants qui permettront d'avancer davantage dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le phénotype CCHS, de déterminer les conditions dans lesquelles les progestatifs de la famille des gonanes peuvent constituer un traitement ou en encore de mettre en lumière l'importance d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1999) Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis and management. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med 160:368-373.
- Abu-Shaweesh JM, Dreshaj IA, Thomas AJ, Haxhiu MA, Strohl KP, Martin RJ (1999) Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. J Appl Physiol (1985) 87:484-490.
- Adachi M, Browne D, Lewis EJ (2000) Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arix and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine betahydroxylase gene transcription. DNA Cell Biol 19:539-554.
- Adamantidis A, de Lecea L (2009) The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. J Physiol 587:33-40.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. Nature 450:420-424.
- Afshar F, Watkins, E.S., et al. (1978) Stereotaxic Atlas of the Human Brainstem and Cerebellar Nuclei. A Variability Study. . Raven Press, New York.
- Aggarwal M, Zhang J, Pletnikova O, Crain B, Troncoso J, Mori S (2013) Feasibility of creating a highresolution 3D diffusion tensor imaging based atlas of the human brainstem: a case study at 11.7 T. Neuroimage 74:117-127.
- Aghajanian GK, Wang RY (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. Brain Res 122:229-242.
- Airaksinen MS, Panula P (1988) The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. J Comp Neurol 273:163-186.
- Albrecht AN, Kornak U, Boddrich A, Suring K, Robinson PN, Stiege AC, Lurz R, Stricker S, Wanker EE, Mundlos S (2004) A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. Hum Mol Genet 13:2351-2359.
- Allen W. M. CGW (1929) Physiology of the corpus luteum. American Journal of Physiology.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoal M, Maurice T (2000) Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. Neuroscience 97:155-170.
- Amiel J, Dubreuil V, Ramanantsoa N, Fortin G, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2009) PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. RespirPhysiol Neurobiol 168:125-132.
- Amiel J, Laudier B, ttie-Bitach T, Trang H, de PL, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S (2003) Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. NatGenet 33:459-461.
- Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS (2009) Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. J Neurosci 29:14423-14438.
- Anderson TM, Garcia AJ, 3rd, Baertsch NA, Pollak J, Bloom JC, Wei AD, Rai KG, Ramirez JM (2016) A novel excitatory network for the control of breathing. Nature 536:76-80.
- Anderson TM, Ramirez JM (2017) Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. F1000Res 6:139.
- Antic NA, Malow BA, Lange N, McEvoy RD, Olson AL, Turkington P, Windisch W, Samuels M, Stevens CA, Berry-Kravis EM, Weese-Mayer DE (2006) PHOX2B mutation-confirmed congenital central hypoventilation syndrome: presentation in adulthood. Am J Respir Crit Care Med 174:923-927.
- Arbogast LA, Voogt JL (2002) Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. Neuroendocrinology 75:273-281.
- Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. Nat Rev Neurosci 16:17-29.

- Arita H, Kogo N, Koshiya N (1987) Morphological and physiological properties of caudal medullary expiratory neurons of the cat. Brain Res 401:258-266.
- Baccini G, Mlinar B, Audero E, Gross CT, Corradetti R (2012) Impaired chemosensitivity of mouse dorsal raphe serotonergic neurons overexpressing serotonin 1A (Htr1a) receptors. PLoS One 7:e45072.
- Bachetti T, Bocca P, Borghini S, Matera I, Prigione I, Ravazzolo R, Ceccherini I (2007) Geldanamycin promotes nuclear localisation and clearance of PHOX2B misfolded proteins containing polyalanine expansions. Int J Biochem Cell Biol 39:327-339.
- Bachetti T, Matera I, Borghini S, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I (2005) Distinct pathogenetic mechanisms for PHOX2B associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome. Hum Mol Genet 14:1815-1824.
- Bachetti T, Robbiano A, Parodi S, Matera I, Merello E, Capra V, Baglietto MP, Rossi A, Ceccherini I, Ottonello G (2006) Brainstem anomalies in two patients affected by congenital central hypoventilation syndrome. AmJ RespirCrit Care Med 174:706-709.
- Back DJ, Grimmer SF, Shenoy N, Orme ML (1987) Plasma concentrations of 3-keto-desogestrel after oral administration of desogestrel and intravenous administration of 3-keto-desogestrel. Contraception 35:619-626.
- BaHammam A, Syed S, Al-Mughairy A (2005) Sleep-related breathing disorders in obese patients presenting with acute respiratory failure. Respir Med 99:718-725.
- Bairam A, Lumbroso D, Joseph V (2013) Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. Respir Physiol Neurobiol 185:515-525.
- Balkowiec A, Katz DM (1998) Brain-derived neurotrophic factor is required for normal development of the central respiratory rhythm in mice. J Physiol 510 (Pt 2):527-533.
- Ballanyi K, Onimaru H, Homma I (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. ProgNeurobiol 59:583-634.
- Bamford OS, Schuen JN, Carroll JL (1996) Effect of nicotine exposure on postnatal ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. Respir Physiol 106:1-11.
- Barann M, Gothert M, Bruss M, Bonisch H (1999) Inhibition by steroids of [14C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT3 receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 360:234-241.
- Barclay SF, Rand CM, Borch LA, Nguyen L, Gray PA, Gibson WT, Wilson RJ, Gordon PM, Aung Z, Berry-Kravis EM, Ize-Ludlow D, Weese-Mayer DE, Bech-Hansen NT (2015) Rapid-Onset Obesity with Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (ROHHAD): exome sequencing of trios, monozygotic twins and tumours. Orphanet J Rare Dis 10:103.
- Barclay SF, Rand CM, Gray PA, Gibson WT, Wilson RJ, Berry-Kravis EM, Ize-Ludlow D, Bech-Hansen NT, Weese-Mayer DE (2016) Absence of mutations in HCRT, HCRTR1 and HCRTR2 in patients with ROHHAD. Respir Physiol Neurobiol 221:59-63.
- Bardinet E, Bhattacharjee M, Dormont D, Pidoux B, Malandain G, Schupbach M, Ayache N, Cornu P, Agid Y, Yelnik J (2009) A three-dimensional histological atlas of the human basal ganglia. II. Atlas deformation strategy and evaluation in deep brain stimulation for Parkinson disease. J Neurosurg 110:208-219.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev 50:291-313.
- Barnard JW (1940) The hypoglossal complex of vertebrates. J Comp Neurol 72:489-524.
- Bartlett D, Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia. RespirPhysiol 10:384-395. Baulieu EE (1991) Neurosteroids: a new function in the brain. Biol Cell 71:3-10.
- Baumann CR, Bassetti CL (2005) Hypocretins (orexins): clinical impact of the discovery of a neurotransmitter. Sleep Med Rev 9:253-268.
- Bavis RW, Dmitrieff EF, Young KM, Piro SE (2011) Hypoxic ventilatory response of adult rats and mice after developmental hyperoxia. Respir Physiol Neurobiol 177:342-346.

- Bayliss DA, Cidlowski JA, Millhorn DE (1990) The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. Endocrinology 126:519-527.
- Bayliss DA, Millhorn DE (1992) Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. JApplPhysiol 73:393-404.
- Bayliss DA, Millhorn DE, Gallman EA, Cidlowski JA (1987) Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. ProcNatlAcadSciUSA 84:7788-7792.
- Behan M, Kinkead R (2011) Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. Compr Physiol 1:2101-2139.
- Behan M, Thomas CF (2005) Sex hormone receptors are expressed in identified respiratory motoneurons in male and female rats. Neuroscience 130:725-734.
- Behan M, Wenninger JM (2008) Sex steroidal hormones and respiratory control. Respir Physiol Neurobiol 164:213-221.
- Behan M, Zabka AG, Thomas CF, Mitchell GS (2003) Sex steroid hormones and the neural control of breathing. RespirPhysiol Neurobiol 136:249-263.
- Belegu R, Hadziefendic S, Dreshaj IA, Haxhiu MA, Martin RJ (1999) CO2-induced c-fos expression in medullary neurons during early development. Respiration Physiology 117:13-28.
- Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. Neuropharmacology 43:651-661.
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. Nat Rev Neurosci 6:565-575.
- Bellingham MC (1998) Driving respiration: the respiratory central pattern generator. ClinExpPharmacolPhysiol 25:847-856.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. Neuroscientist 18:467-486.
- Benagiano G, Primiero FM, Farris M (2004) Clinical profile of contraceptive progestins. Eur J Contracept Reprod Health Care 9:182-193.
- Benailly HK, Lapierre JM, Laudier B, Amiel J, Attie T, De Blois MC, Vekemans M, Romana SP (2003) PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease. Clin Genet 64:204-209.
- Benarroch EE (2012) GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications. Neurology 78:578-584.
- Berger AJ (1977) Dorsal respiratory group neurons in the medulla of cat: spinal projections, responses to lung inflation and superior laryngeal nerve stimulation. Brain Res 135:231-254.
- Berger AJ, Cooney KA (1982) Ventilatory effects of kainic acid injection of the ventrolateral solitary nucleus. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol 52:131-140.
- Bernard DG, Li A, Nattie EE (1996) Evidence for central chemoreception in the midline raphe. J ApplPhysiol 80:108-115.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000a) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. Brain Res 857:30-40.
- Berquin P, Cayetanot F, Gros F, Larnicol N (2000b) Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. Brain Res 877:149-159.
- Berry-Kravis EM, Zhou L, Rand CM, Weese-Mayer DE (2006) Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype. Am J Respir Crit Care Med 174:1139-1144.
- Berry RB, Gleeson K (1997) Respiratory arousal from sleep: mechanisms and significance. Sleep 20:654-675.
- Bertrand D, Valera S, Bertrand S, Ballivet M, Rungger D (1991) Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. Neuroreport 2:277-280.
- Bertrand F, Hugelin A (1971) Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. J Neurophysiol 34:189-207.

- Bester H, Besson JM, Bernard JF (1997) Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J Comp Neurol 383:245-281.
- Bethea CL, Widmann AA (1998) Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. Endocrinology 139:677-687.
- Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. J Neurochem 97:1600-1610.
- Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsycataplexy in the rat. J Neurosci 24:4469-4477.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. Pflugers Arch 455:1119-1128.
- Bianchi AL (1971) Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation. JPhysiol (Paris) 63:5-40.
- Bianchi AL (1974) Modalities of discharge and anatomo-functional properties of medullary respiratory neurons. JPhysiol (Paris) 68:555-587.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. Physiol Rev 75:1-45.
- Bianchi AL, Grelot L, Iscoe S, Remmers JE (1988) Electrophysiological properties of rostral medullary respiratory neurones in the cat: an intracellular study. JPhysiol 407:293-310.
- Bieger D, Hopkins DA (1987) Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. J Comp Neurol 262:546-562.
- Birch AJ (1950) Hydro aromatic steroid hormones. Part I. Journal of the Chemical Society
- Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ (1991) Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. J Biol Chem 266:18655-18659.
- Blandina P, Munari L, Provensi G, Passani MB (2012) Histamine neurons in the tuberomamillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? Front Syst Neurosci 6:33.
- Blanke ML, VanDongen AMJ (2009) Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Biology of the NMDA Receptor (Van Dongen, A. M., ed) Boca Raton (FL).
- Bleakman D (1999) Kainate receptor pharmacology and physiology. Cell Mol Life Sci 56:558-566.
- Blessing WW (1997) The lower brainstem and bodily homeostasis. New York London: Oxford University Press.
- Blessing WW, Yu Y, Nalivaiko E (1999) Medullary projections of rabbit carotid sinus nerve. Brain Res 816:405-410.
- Bloom FE, Morales M (1998) The central 5-HT3 receptor in CNS disorders. Neurochem Res 23:653-659.
- Bodineau L, Cayetanot F, Frugiere A (2000a) Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an in vitro study in neonatal rat. Neurosci Lett 295:67-69.
- Bodineau L, Cayetanot F, Frugiere A (2001) Fos study of ponto-medullary areas involved in the in vitro hypoxic respiratory depression. Neuroreport 12:3913-3916.
- Bodineau L, Cayetanot F, Marlot D, Collin T, Gros F, Frugiere A (2004) Endogenous 5-HT(1/2) systems and the newborn rat respiratory control. A comparative in vivo and in vitro study. RespirPhysiol Neurobiol 141:47-57.
- Bodineau L, Cayetanot F, Sadani-Makki F, Bach V, Gros F, Lebleu A, Collin T, Frugiere A (2003) 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. PediatrRes 53:266-273.
- Bodineau L, Frugiere A, Marlot D, Wallois F (2000b) Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. Neurosci Lett 280:111-114.
- Bodineau L, Taveau C, Le Quan Sang HH, Osterstock G, Queguiner I, Moos F, Frugiere A, Llorens-Cortes C (2011) Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. Endocrinology 152:3492-3503.

- Borovska J, Vyklicky V, Stastna E, Kapras V, Slavikova B, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2012) Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. Br J Pharmacol 166:1069-1083.
- Bougneres P, Pantalone L, Linglart A, Rothenbuhler A, Le SC (2008) Endocrine manifestations of the rapid-onset obesity with hypoventilation, hypothalamic, autonomic dysregulation, and neural tumor syndrome in childhood. JClinEndocrinolMetab 93:3971-3980.
- Boukari R, Marcouiller F, Joseph V (2015) Relative Contribution of Nuclear and Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. Adv Exp Med Biol 860:261-267.
- Boukari R, Rossignol O, Baldy C, Marcouiller F, Bairam A, Joseph V (2016) Membrane progesterone receptor-beta, but not -alpha, in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. J Appl Physiol (1985) 121:781-791.
- Bowlby MR (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. Mol Pharmacol 43:813-819.
- Braat S, Kooy RF (2015) The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. Neuron 86:1119-1130.
- Bradley SR, Pieribone VA, Wang W, Severson CA, Jacobs RA, Richerson GB (2002) Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. Nat Neurosci 5:401-402.
- Bramley TA, Menzies GS, Rae MT, Scobie G (2002) Non-genomic steroid receptors in the bovine ovary. Domest Anim Endocrinol 23:3-12.
- Breen S, Rees S, Walker D (1997) Identification of brainstem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. Brain Research 748:107-121.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. Front Neuroendocrinol 29:313-339.
- Brisbare-Roch C, Dingemanse J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, Mueller C, Nayler O, van Gerven J, de Haas SL, Hess P, Qiu C, Buchmann S, Scherz M, Weller T, Fischli W, Clozel M, Jenck F (2007) Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. Nat Med 13:150-155.
- Brockhaus J, Ballanyi K (1998) Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. Eur J Neurosci 10:3823-3839.
- Brockhaus J, Ballanyi K, Smith JC, Richter DW (1993) Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. J Physiol 462:421-445.
- Brodin E, Linderoth B, Goiny M, Yamamoto Y, Gazelius B, Millhorn DE, Hokfelt T, Ungerstedt U (1990) In vivo release of serotonin in cat dorsal vagal complex and cervical ventral horn induced by electrical stimulation of the medullary raphe nuclei. Brain Res 535:227-236.
- Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Haas HL (2001) Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. Neuropharmacology 40:457-459.
- Brunet JF, Pattyn A (2002) Phox2 genes from patterning to connectivity. CurrOpinGenetDev 12:435-440.
- Brussaard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE (1997) Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. Neuron 19:1103-1114.
- Bryan AC, Bowas G, Maloney JE (1986) Control of breathing in the fetus and the newborn. vol. The respiratory system volume II, pp 621-637.
- Buchanan GF, Richerson GB (2010) Central serotonin neurons are required for arousal to CO2. ProcNatlAcadSciUSA 107:16354-16359.
- Buddhikot M, Falkenstein E, Wehling M, Meizel S (1999) Recognition of a human sperm surface protein involved in the progesterone-initiated acrosome reaction by antisera against an endomembrane progesterone binding protein from porcine liver. Mol Cell Endocrinol 158:187-193.
- Bullock LP, Bardin CW (1977) Androgenic, synandrogenic, and antiandrogenic actions of progestins. Ann N Y Acad Sci 286:321-330.

Burdakov D, Karnani MM, Gonzalez A (2013) Lateral hypothalamus as a sensor-regulator in respiratory and metabolic control. Physiol Behav 121:117-124.

- Burke PG, Abbott SB, McMullan S, Goodchild AK, Pilowsky PM (2010) Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Botzinger complex. Neuroscience 167:528-539.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci 22:183-192.
- Butera RJ, Jr., Rinzel J, Smith JC (1999) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. J Neurophysiol 82:382-397.
- Byrum CE, Guyenet PG (1987) Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. J Comp Neurol 261:529-542.
- Byrum CE, Stornetta R, Guyenet PG (1984) Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. Brain Res 303:15-29.
- Caburet S, Demarez A, Moumne L, Fellous M, De Baere E, Veitia RA (2004) A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. J Med Genet 41:932-936.
- Cahill MA (2007) Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. J Steroid Biochem Mol Biol 105:16-36.
- Callachan H, Cottrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM, Peters JA (1987) Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. Proc R Soc Lond B Biol Sci 231:359-369.
- Camacho-Arroyo I, Hernandez-Molina VI, Rivas-Suarez M, Guerra-Araiza C, Gonzalez-Moran MG (2007) Changes in progesterone receptor isoforms content in the brain of immature, mature and aged male and female chickens. Gen Comp Endocrinol 150:381-385.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, Cliffer KD, Willis WD (1995a) The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. J Comp Neurol 351:568-584.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, Willis WD (1995b) The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. J Comp Neurol 351:585-601.
- Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y, Aoki M (2006) Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. Neurosci Res 56:322-331.
- Carrillo A, Ferrer M, Gonzalez-Diaz G, Lopez-Martinez A, Llamas N, Alcazar M, Capilla L, Torres A (2012) Noninvasive ventilation in acute hypercapnic respiratory failure caused by obesity hypoventilation syndrome and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 186:1279-1285.
- Carroll JL (2003) Obstructive sleep-disordered breathing in children: new controversies, new directions. Clin Chest Med 24:261-282.
- Carroll JL, Agarwal A (2010) Development of ventilatory control in infants. Paediatr Respir Rev 11:199-207.
- Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE (2014) Residual chemosensitivity to ventilatory challenges in genotyped congenital central hypoventilation syndrome. J Appl Physiol (1985) 116:439-450.
- Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE (2015) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD): Response to ventilatory challenges. Pediatr Pulmonol 50:1336-1345.
- Carroll MS, Patwari PP, Weese-Mayer DE (2010) Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. JApplPhysiol 108:979-988.
- Ceccon M, Rumbaugh G, Vicini S (2001) Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. Neuropharmacology 40:491-500.
- Cedarbaum JM, Aghajanian GK (1978) Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. J Comp Neurol 178:1-16.

Cemeroglu AP, Eng DS, Most LA, Stalsonburg CM, Kleis L (2016) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome and celiac disease in a 13-year-old girl: further evidence for autoimmunity? J Pediatr Endocrinol Metab 29:97-101.

- Chamberlin NL, Saper CB (1994) Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. J Neurosci 14:6500-6510.
- Chan E, Steenland HW, Liu H, Horner RL (2006) Endogenous excitatory drive modulating respiratory muscle activity across sleep-wake states. Am J Respir Crit Care Med 174:1264-1273.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. Cell 98:437-451.
- Chen ML, Keens TG (2004) Congenital central hypoventilation syndrome: not just another rare disorder. Paediatr Respir Rev 5:182-189.
- Chen Z, Hedner J, Hedner T (1990a) Substance P in the ventrolateral medulla oblongata regulates ventilatory responses. J Appl Physiol (1985) 68:2631-2639.
- Chen ZB, Hedner J, Hedner T (1990b) Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. J Appl Physiol (1985) 68:693-699.
- Chernov MM, Erlichman JS, Leiter JC (2010) Ionic mechanisms of central CO(2) chemosensitivity. Respir Physiol Neurobiol 173:298-304.
- Chew HB, Ngu LH, Keng WT (2011) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation and autonomic dysregulation (ROHHAD): a case with additional features and review of the literature. BMJ Case Rep 2011.
- Cho ES, Lee SY, Park JY, Hong SG, Ryu PD (2007) Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. J Vet Sci 8:15-20.
- Chow C, Fortier MV, Das L, Menon AP, Vasanwala R, Lam JC, Ng ZM, Ling SR, Chan DW, Choong CT, Liew WK, Thomas T (2015) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD) syndrome may have a hypothalamus-periaqueductal gray localization. Pediatr Neurol 52:521-525.
- Cielo C, Marcus CL (2014) Central Hypoventilation Syndromes. Sleep Med Clin 9:105-118.
- Ciriello J, de Oliveira CV (2003) Cardiac effects of hypocretin-1 in nucleus ambiguus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:R1611-1620.
- Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L (2004) The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 190:343-357.
- Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. Journal of Applied Physiology 75:5-14.
- Coates EL, Li AH, Nattie EE (1991) Acetazolamide on the ventral medulla of the cat increases phrenic output and delays the ventilatory response to CO2. J Physiol 441:433-451.
- Coglianese CJ, Peiss CN, Wurster RD (1977) Rhythmic phrenic nerve activity and respiratory activity in spinal dogs. Respir Physiol 29:247-254.
- Cohen MI (1979) Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. Physiol Rev 59:1105-1173.
- Coles SK, Dick TE (1996) Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. J Physiol 497 (Pt 1):79-94.
- Comenencia-Ortiz E, Moss SJ, Davies PA (2014) Phosphorylation of GABAA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions. Psychopharmacology (Berl) 231:3453-3465.
- Compagnone NA, Mellon SH (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. Front Neuroendocrinol 21:1-56.
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992) Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. Brain Res 590:337-340.
- Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? Neurosci Lett 105:34-40.
- Connolly CN, Wafford KA (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. Biochem Soc Trans 32:529-534.

- Connolly CN, Wooltorton JR, Smart TG, Moss SJ (1996) Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. Proc Natl Acad Sci U S A 93:9899-9904.
- Conrad SC, Nichols NL, Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW (2009) Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. Respir Physiol Neurobiol 166:4-12.
- Conti F, Minelli A, DeBiasi S, Melone M (1997) Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. Mol Neurobiol 14:1-18.
- Coquerel A, Buser M, Tayot J, Pfaff F, Matray F, Proust B (1992) Beta-endorphin and neurotensin in brainstem and cerebrospinal fluid in the sudden infant death syndrome. Neurochem Int 20:97-102.
- Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB (2009) Medullary serotonin neurons and central CO2 chemoreception. RespirPhysiol Neurobiol 168:49-58.
- Corcoran AE, Richerson GB, Harris MB (2015) Functional link between the hypocretin and serotonin systems in the neural control of breathing and central chemosensitivity. J Neurophysiol 114:381-389.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 78:4704-4707.
- Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjovall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. Brain Res 270:119-125.
- Cottrell GA, Lambert JJ, Peters JA (1987) Modulation of GABAA receptor activity by alphaxalone. Br J Pharmacol 90:491-500.
- Cream C, Li A, Nattie E (2002) The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections. RespirPhysiol Neurobiol 130:121-137.
- Cross BA, Silver IA (1963) Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnia. Exp Neurol 7:375-393.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Curr Opin Neurobiol 11:327-335.
- da Silva GS, Giusti H, Benedetti M, Dias MB, Gargaglioni LH, Branco LG, Glass ML (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. Pflugers Arch 462:407-418.
- da Silva SB, de Sousa Ramalho Viana E, de Sousa MB (2006) Changes in peak expiratory flow and respiratory strength during the menstrual cycle. Respir Physiol Neurobiol 150:211-219.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. Experientia 20:398-399.
- Dampney RA, Horiuchi J, McDowall LM (2008) Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. Auton Neurosci 142:3-10.
- Danneman PJ, Mandrell TD (1997) Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. Lab Anim Sci 47:386-395.
- Darnall RA, Schneider RW, Tobia CM, Commons KG (2016) Eliminating medullary 5-HT neurons delays arousal and decreases the respiratory response to repeated episodes of hypoxia in neonatal rat pups. J Appl Physiol (1985) 120:514-525.
- Darwinkel A, Stanic D, Booth LC, May CN, Lawrence AJ, Yao ST (2014) Distribution of orexin-1 receptorgreen fluorescent protein- (OX1-GFP) expressing neurons in the mouse brain stem and pons: Co-localization with tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase. Neuroscience 278:253-264.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. Proc Natl Acad Sci U S A 96:748-753.
- Dauger S, Pattyn A, Lofaso F, Gaultier C, Goridis C, Gallego J, Brunet JF (2003) Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways. Development 130:6635-6642.

- Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, Bischof M, Blatter T, Lecendreux M, Maly F, Besset A, Touchon J, Billiard M, Tafti M, Bassetti CL (2003) CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:1667-1673.
- Davies RO, Edwards MW, Jr. (1973) Distribution of carotid body chemoreceptor afferents in the medulla of the cat. Brain Res 64:451-454.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, Gonzalez-Baron S, Spyer KM (2001) Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. Pflugers Arch 441:434-443.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, Lopez de Miguel MP, Lopez-Gonzalez MV, Spyer KM, Gonzalez-Baron S (2003) A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. Brain Res 982:108-118.
- de Carvalho D, Patrone LG, Taxini CL, Biancardi V, Vicente MC, Gargaglioni LH (2014) Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO2drive to breathe. Front Physiol 5:288.
- De Castro D, Lipski J, Kanjhan R (1994) Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. Brain Res 639:49-56.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A 95:322-327.
- de Pontual L, Pelet A, Clement-Ziza M, Trochet D, Antonarakis SE, Attie-Bitach T, Beales PL, Blouin JL, Dastot-Le Moal F, Dollfus H, Goossens M, Katsanis N, Touraine R, Feingold J, Munnich A, Lyonnet S, Amiel J (2007) Epistatic interactions with a common hypomorphic RET allele in syndromic Hirschsprung disease. Hum Mutat 28:790-796.
- Dean JB, Bayliss DA, Erickson JT, Lawing WL, Millhorn DE (1990) Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. Neuroscience 36:207-216.
- Dean JB, Lawing WL, Millhorn DE (1989) CO2 decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. Exp Brain Res 76:656-661.
- Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA, III, Potter SJ, Putnam RW (2004) Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. Journal of Applied Physiology 96:784-791.
- Del Negro CA, Hayes JA (2008) A 'group pacemaker' mechanism for respiratory rhythm generation. J Physiol 586:2245-2246.
- Del Negro CA, Hayes JA, Pace RW, Brush BR, Teruyama R, Feldman JL (2010) Synaptically activated burst-generating conductances may underlie a group-pacemaker mechanism for respiratory rhythm generation in mammals. Prog Brain Res 187:111-136.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL (2002) Respiratory rhythm: an emergent network property? Neuron 34:821-830.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. J Neurosci 25:446-453.
- DeManno DA, Goetz FW (1987) Steroid-induced final maturation in brook trout (Salvelinus fontinalis) oocytes in vitro: the effects of forskolin and phosphodiesterase inhibitors. Biol Reprod 36:1321-1332.
- Dempsey JA, Olson, E.B., Skatrud, J.B. (1986) Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. American Physiological Society Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Control of Breathing, Part 1, vol. II.:181/221.
- Deng BS, Nakamura A, Zhang W, Yanagisawa M, Fukuda Y, Kuwaki T (2007) Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. J Appl Physiol (1985) 103:1772-1779.

Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. J Neurosci 31:1981-1990.

- Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D (2016) Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. J Neurophysiol jn 00196 02016.
- Deutch AY, Holliday J, Roth RH, Chun LL, Hawrot E (1987) Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A 84:8697-8701.
- Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. Pharmacol Ther 128:549-558.
- Dhondt K, Verloo P, Verhelst H, Van Coster R, Overeem S (2013) Hypocretin-1 deficiency in a girl with ROHHAD syndrome. Pediatrics 132:e788-792.
- Di Zanni E, Bachetti T, Parodi S, Bocca P, Prigione I, Di Lascio S, Fornasari D, Ravazzolo R, Ceccherini I (2012) In vitro drug treatments reduce the deleterious effects of aggregates containing polyAla expanded PHOX2B proteins. Neurobiol Dis 45:508-518.
- Dias MB, Li A, Nattie E (2010) The orexin receptor 1 (OX1R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. RespirPhysiol Neurobiol 170:96-102.
- Dias MB, Li A, Nattie EE (2009) Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. JPhysiol 587:2059-2067.
- Dias MB, Nucci TB, Margatho LO, Antunes-Rodrigues J, Gargaglioni LH, Branco LG (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO2. J Appl Physiol (1985) 103:1780-1788.
- Dick TE, Bellingham MC, Richter DW (1994) Pontine respiratory neurons in anesthetized cats. Brain Res 636:259-269.
- Dillon GH, Waldrop TG (1992) In vitro responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. Neuroscience 51:941-950.
- Dillon GH, Waldrop TG (1993) Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. ExpBrain Res 96:260-272.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. Pharmacol Biochem Behav 71:469-480.
- Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. J Comp Neurol 347:64-86.
- Dobbins EG, Feldman JL (1995) Differential innervation of protruder and retractor muscles of the tongue in rat. J Comp Neurol 357:376-394.
- Doherty LS, Kiely JL, Deegan PC, Nolan G, McCabe S, Green AJ, Ennis S, McNicholas WT (2007) Lateonset central hypoventilation syndrome: a family genetic study. Eur Respir J 29:312-316.
- Douglas NJ (1984) Control of breathing during sleep. Clin Sci (Lond) 67:465-471.
- Douglas NJ, White DP, Weil JV, Pickett CK, Zwillich CW (1982) Hypercapnic ventilatory response in sleeping adults. Am Rev Respir Dis 126:758-762.
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing 3. J NeurosciMethods 29:261-265.
- Dreher JC, Schmidt PJ, Kohn P, Furman D, Rubinow D, Berman KF (2007) Menstrual cycle phase modulates reward-related neural function in women. Proc Natl Acad Sci U S A 104:2465-2470.
- Dreshaj IA, Haxhiu MA, Martin RJ (1998) Role of the medullary raphe nuclei in the respiratory response to CO2. Respir Physiol 111:15-23.
- Dubreuil V, Barhanin J, Goridis C, Brunet JF (2009a) Breathing with phox2b. PhilosTransRSocLond B BiolSci 364:2477-2483.
- Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet JF, Goridis C (2008) A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. ProcNatlAcadSciUSA 105:1067-1072.
- Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Rallu M, Persson K, Pattyn A, Birchmeier C, Brunet JF, Fortin G, Goridis C (2009b) Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. J Neurosci 29:14836-14846.
- Duffin J, Hockman CH (1972) Limbic forebrain and midbrain modulation and phase-switching of expiratory neurons. Brain Res 39:235-239.
- Dumais KM, Veenema AH (2016) Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. Front Neuroendocrinol 40:1-23.
- Dupont E, Simard J, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G (1994) Localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain as studied by in situ hybridization. Mol Cell Neurosci 5:119-123.
- Durand E, Dauger S, Pattyn A, Gaultier C, Goridis C, Gallego J (2005) Sleep-disordered breathing in newborn mice heterozygous for the transcription factor Phox2b. AmJ RespirCrit Care Med 172:238-243.
- Dutschmann M, Bischoff AM, Busselberg D, Richter DW (2003) Histaminergic modulation of the intact respiratory network of adult mice. Pflugers Arch 445:570-576.
- Dutschmann M, Kron M, Morschel M, Gestreau C (2007) Activation of Orexin B receptors in the pontine Kolliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. Respir Physiol Neurobiol 159:232-235.
- Edgren RA, Stanczyk FZ (1999) Nomenclature of the gonane progestins. Contraception 60:313.
- Edwards DP, DeMarzo AM, Onate SA, Beck CA, Estes PA, Nordeen SK (1991) Mechanisms controlling steroid receptor binding to specific DNA sequences. Steroids 56:271-278.
- Elam M, Yao T, Thoren P, Svensson TH (1981) Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. Brain Res 222:373-381.
- Ellenberger HH, Feldman JL (1990) Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. Brain Res 513:35-42.
- Ellenberger HH, Feldman JL, Goshgarian HG (1990) Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections. J Comp Neurol 302:707-714.
- Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM (1996) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. J Neurosci 16:5361-5371.
- Erickson JT, Millhorn DE (1991) Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. Brain Res 567:11-24.
- Erickson JT, Millhorn DE (1994) Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. J Comp Neurol 348:161-182.
- Eriksson KS, Sergeeva OA, Selbach O, Haas HL (2004) Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. Eur J Neurosci 19:1278-1284.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. Neuron 7:91-100.
- Erlichman JS, Boyer AC, Reagan P, Putnam RW, Ritucci NA, Leiter JC (2009) Chemosensory responses to CO2 in multiple brain stem nuclei determined using a voltage-sensitive dye in brain slices from rats. J Neurophysiol 102:1577-1590.
- Errchidi S, Hilaire G, Monteau R (1990) Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study. J Physiol 429:497-510.
- Errchidi S, Monteau R, Hilaire G (1991) Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. J Physiol 443:477-498.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. J Neurosci 21:1656-1662.
- Ezure K, Tanaka I, Saito Y (2003) Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. NeurosciRes 45:41-51.

- Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M (1996) Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 229:86-89.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 52:513-556.
- Faure C, Viarme F, Cargill G, Navarro J, Gaultier C, Trang H (2002) Abnormal esophageal motility in children with congenital central hypoventilation syndrome. Gastroenterology 122:1258-1263.
- Fedorko L, Merrill EG (1984) Axonal projections from the rostral expiratory neurones of the Botzinger complex to medulla and spinal cord in the cat. J Physiol 350:487-496.
- Feldman JL (1986) Neurophysiology of breathing in mammals. In: Handbook of physiology; section I: The nervous system Volume IV: Intrinsic regulatory systems of the brain (Bloom, F. E., ed), pp 463-524 Washington, DC: Am. Physiol. Soc.
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. NatRevNeurosci 7:232-241.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. AnnuRevNeurosci 26:239-266.
- Feldman JL, Smith JC (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. AnnNYAcadSci 563:114-130.
- Fencl V, Miller TB, Pappenheimer JR (1966) Studies on the respiratory response to disturbances of acidbase balance, with deductions concerning the ionic composition of cerebral interstitial fluid. Am J Physiol 210:459-472.
- Fenik VB, Davies RO, Kubin L (2005) Noradrenergic, serotonergic and GABAergic antagonists injected together into the XII nucleus abolish the REM sleep-like depression of hypoglossal motoneuronal activity. J Sleep Res 14:419-429.
- Ferraro L, Antonelli T, Beggiato S, Cristina Tomasini M, Fuxe K, Tanganelli S (2013) The vigilance promoting drug modafinil modulates serotonin transmission in the rat prefrontal cortex and dorsal raphe nucleus. Possible relevance for its postulated antidepressant activity. Mini Rev Med Chem 13:478-492.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol 14:1649-1660.
- Filiano JJ, Kinney HC (1992) Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. J NeuropatholExpNeurol 51:394-403.
- Filosa JA, Dean JB, Putnam RW (2002) Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. J Physiol 541:493-509.
- Fink BR, Katz R, Reinhold H, Schoolman A (1962) Supraportine mechanisms in regulation of respiration. AJP - Legacy 202:217-220.
- Finley JC, Katz DM (1992) The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. Brain Res 572:108-116.
- Fishman LS, Samson JH, Sperling DR (1965) Primary Alveolar Hypoventilation Syndrome (Ondine's Curse). Am J Dis Child 110:155-161.
- Fitting JW (2015) From breathing to respiration. Respiration 89:82-87.
- Fleming PJ, Cade D, Bryan MH, Bryan AC (1980) Congenital central hypoventilation and sleep state. Pediatrics 66:425-428.
- Flick MR, Block AJ (1977) Continuous in-vivo monitoring of arterial oxygenation in chronic obstructive lung disease. Ann Intern Med 86:725-730.
- Flora A, Lucchetti H, Benfante R, Goridis C, Clementi F, Fornasari D (2001) Sp proteins and Phox2b regulate the expression of the human Phox2a gene. J Neurosci 21:7037-7045.
- Flourens P (1842) Recherches exp, rimentales sur les propri, t, s et les fonctions du systŠme nerveux dans les animaux vert, br, s. Paris.
- Flourens P (1851) Note sur le point vital de la moelle allong, e. vol. 33, pp 437-439.

- Fong AY, Corcoran AE, Zimmer MB, Andrade DV, Milsom WK (2008) Respiratory rhythm of brainstemspinal cord preparations: Effects of maturation, age, mass and oxygenation. Respir Physiol Neurobiol 164:429-440.
- Fornal CA, Metzler CW, Marrosu F, Ribiero-do-Valle LE, Jacobs BL (1996) A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements. Brain Res 716:123-133.
- Frantz ID, 3rd, Adler SM, Thach BT, Taeusch HW, Jr. (1976) Maturational effects on respiratory responses to carbon dioxide in premature infants. J Appl Physiol 41:41-45.
- Fregosi RF, Hwang JC, Bartlett D, Jr., St John WM (1992) Activity of abdominal muscle motoneurons during hypercapnia. Respir Physiol 89:179-194.
- Frolund B, Ebert B, Kristiansen U, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P (2002) GABA(A) receptor ligands and their therapeutic potentials. Curr Top Med Chem 2:817-832.
- Fung SJ, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH (2001) Hypocretin (orexin) input to trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat: a double-labeling immunohistochemical study. Brain Res 903:257-262.
- Funk GD, Smith JC, Feldman JL (1995) Modulation of neural network activity in vitro by cyclothiazide, a drug that blocks desensitization of AMPA receptors. J Neurosci 15:4046-4056.
- Furusawa K, Yasuda K, Okuda D, Tanaka M, Yamaoka M (1996) Central distribution and peripheral functional properties of afferent and efferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. J Comp Neurol 375:147-156.
- Furuta M, Fukushima A, Chiba S, Sano A, Akema T, Kimura F, Funabashi T (2010) Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. Neuroreport 21:777-781.
- Fuxe K (1965) Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. Iv. Distribution of Monoamine Nerve Terminals in the Central Nervous System. Acta Physiol Scand Suppl SUPPL 247:237+.
- Ganapathy ME, Prasad PD, Huang W, Seth P, Leibach FH, Ganapathy V (1999) Molecular and ligandbinding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. J Pharmacol Exp Ther 289:251-260.
- Gang S, Mizuguchi A, Aoki M (1991) Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. RespirPhysiol 85:329-339.
- Gang S, Watanabe A, Aoki M (1998) Axonal projections from the pontine parabrachial-Kolliker-Fuse nuclei to the Botzinger complex as revealed by antidromic stimulation in cats. AdvExpMedBiol 450:67-72.
- Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L, Xu TL (2005) Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. Neuron 48:635-646.
- Gargaglioni LH, Bicegoa KC, Branco LG (2008) Brain monoaminergic neurons and ventilatory control in vertebrates. Respir Physiol Neurobiol 164:112-122.
- Gauda EB (2006) Knowledge Gained from Animal Studies of the Fetus and Newborn: Application to the Human Premature Infant. Institute of Laboratory Animal Resources Journal 47:1-4.
- Gaytan SP, Calero F, Nunez-Abades PA, Morillo AM, Pasaro R (1997) Pontomedullary efferent projections of the ventral respiratory neuronal subsets of the rat. Brain ResBull 42:323-334.
- Gaytan SP, Pasaro R (1998) Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. Brain ResBull 47:625-642.
- Gaytan SP, Pasaro R, Coulon P, Bevengut M, Hilaire G (2002) Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: a transneuronal tracing study. Brain ResBull 57:335-339.
- Geerling JC, Mettenleiter TC, Loewy AD (2003) Orexin neurons project to diverse sympathetic outflow systems. Neuroscience 122:541-550.
- Gesell R, Bricker J, Magee C (1936) Structural and functional organization of the central mechanism controlling breathing. AJP Legacy 117:423-452.
- Gesell R, Magee CS, Bricker JW (1940) Activity patterns of the respiratory neurons and muscles. AJP Legacy 128:615-628.

- Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R, Barhanin J (2010) Task2 potassium channels set central respiratory CO2 and O2 sensitivity. ProcNatlAcadSciUSA 107:2325-2330.
- Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. Mol Cell Biol 20:3102-3115.
- Gilman MZ, Wilson RN, Weinberg RA (1986) Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression. Mol Cell Biol 6:4305-4316.
- Gluckman PD, Johnston BM (1987) Lesions in the upper lateral pons abolish the hypoxic depression of breathing in unanaesthetized fetal lambs in utero. J Physiol 382:373-383.
- Goldenberg D, Ari EG, Golz A, Danino J, Netzer A, Joachims HZ (2000) Tracheotomy complications: a retrospective study of 1130 cases. Otolaryngol Head Neck Surg 123:495-500.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. Nature 460:599-604.
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. Nature 456:745-749.
- Goridis C, Brunet JF (2010) Central chemoreception: lessons from mouse and human genetics. Respir Physiol Neurobiol 173:312-321.
- Goridis C, Dubreuil V, Thoby-Brisson M, Fortin G, Brunet JF (2010) Phox2b, congenital central hypoventilation syndrome and the control of respiration. Semin Cell Dev Biol 21:814-822.
- Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD (2000) Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. Am J Psychiatry 157:493-505.
- Gourine AV (2005) On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. J Physiol 568:715-724.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. Science 329:571-575.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM (2005) ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. Nature 436:108-111.
- Gozal D (1998) Congenital central hypoventilation syndrome: an update. PediatrPulmonol 26:273-282.
- Gozal D, Gaultier C (2001) Evolving concepts of the maturation of central pathways underlying the hypoxic ventilatory response. AmJ RespirCrit Care Med 164:325-329.
- Grandi G, Cagnacci A, Volpe A (2014) Pharmacokinetic evaluation of desogestrel as a female contraceptive. Expert Opin Drug Metab Toxicol 10:1-10.
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preB+¶tzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. Nat Neurosci 4:927-930.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. Science 286:1566-1568.
- Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH (1998) Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. Nature 392:509-512.
- Greenberg ME, Siegfried Z, Ziff EB (1987) Mutation of the c-fos gene dyad symmetry element inhibits serum inducibility of transcription in vivo and the nuclear regulatory factor binding in vitro. Mol Cell Biol 7:1217-1225.
- Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene. Nature 311:433-438.
- Greer JJ, Carter JE, al-Zubaidy Z (1995) Opioid depression of respiration in neonatal rats. J Physiol 485 (Pt 3):845-855.
- Griffith FR, Pucker, G.W., Brownell, K.A., Klein, J.D.,, Carmer ME (1929) Studies in human physiology, alveolar

air and blood gas capacity. Am J Physiol 89:449-470.

- Griffiths J, Lovick T (2005) Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. J Comp Neurol 486:89-97.
- Grinevich V, Knobloch-Bollmann HS, Eliava M, Busnelli M, Chini B (2016) Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. Biol Psychiatry 79:155-164.
- Guenard H (1987) [Pulmonary ventilation/perfusion ratio]. J Physiol (Paris) 82:160-171.
- Guennoun R, Fiddes RJ, Gouezou M, Lombes M, Baulieu EE (1995) A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain. Brain Res Mol Brain Res 30:287-300.
- Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M (2015) Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. J Steroid Biochem Mol Biol 146:48-61.
- Guennoun R, Meffre D, Labombarda F, Gonzalez SL, Deniselle MC, Stein DG, De Nicola AF, Schumacher M (2008) The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: expression, cellular localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries. Brain ResRev 57:493-505.
- Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I (2002) Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. Brain Res Bull 59:105-109.
- Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbon MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I (2001) Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. Brain Res Bull 54:13-17.
- Gulinello M, Gong QH, Li X, Smith SS (2001) Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. Brain Res 910:55-66.
- Guthmann A, Herbert H (1999) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei and in selected pontomedullary brainstem nuclei. J Comp Neurol 415:501-517.
- Guyenet PG (2014) Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. Compr Physiol 4:1511-1562.
- Guyenet PG, Abbott SB, Stornetta RL (2013) The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel? Brain Res 1511:126-137.
- Guyenet PG, Bayliss DA (2015) Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. Neuron 87:946-961.
- Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Fortuna MG, Abbott SB, DePuy SD (2009) Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. Respir Physiol Neurobiol 168:59-68.
- Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJ, Riley TA (1993) Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. AJP Legacy 264:R1035-R1044.
- Guyenet PG, Mulkey DK (2010) Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. RespirPhysiol Neurobiol 173:244-255.
- Guyenet PG, Mulkey DK, Stornetta RL, Bayliss DA (2005a) Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. J Neurosci 25:8938-8947.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Abbott SB, Depuy SD, Fortuna MG, Kanbar R (2010a) Central CO2 chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. JApplPhysiol 108:995-1002.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2008) Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. JPhysiol.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2010b) Central respiratory chemoreception. J Comp Neurol 518:3883-3906.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA, Mulkey DK (2005b) Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. Experimental Physiology 90:247-253.
- Guyenet PG, Wang H (2001) Pre-Botzinger neurons with preinspiratory discharges "in vivo" express NK1 receptors in the rat. J Neurophysiol 86:438-446.

- Guyenet PG, Young BS (1987) Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. Brain Res 406:171-184.
- Guyenet S, Bayliss, Mulkey (2005) Re: Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. The Physiological Society.
- Hackos DH, Hanson JE (2016) Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. Neuropharmacology.
- Haddad GG, Gandhi MR, Mellins RB (1982) Maturation of ventilatory response to hypoxia in puppies during sleep. Journal of Applied Physiology 52:309-314.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 96:10911-10916.
- Haghparast A, Soltani-Hekmat A, Khani A, Komaki A (2007) Role of glutamatergic receptors located in the nucleus raphe magnus on antinociceptive effect of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis of rat. Neurosci Lett 427:44-49.
- Haji A, Takeda R, Okazaki M (2000) Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. PharmacolTher 86:277-304.
- Hakuno H, Oyamada Y, Murai M, Ito Y, Yamaguchi K (2004) Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat. Respir Physiol Neurobiol 140:9-18.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. J Neurosci 27:6473-6477.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. Cell 55:917-924.
- Han F, Chen E, Wei H, He Q, Ding D, Strohl KP (2001) Treatment effects on carbon dioxide retention in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Chest 119:1814-1819.
- Hannhart B, Pickett CK, Weil JV, Moore LG (1989) Influence of pregnancy on ventilatory and carotid body neural output responsiveness to hypoxia in cats. J Appl Physiol (1985) 67:797-803.
- Harada Y, Kuno M, Wang YZ (1985) Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro. JPhysiol 368:679-693.
- Harney SC, Frenguelli BG, Lambert JJ (2003) Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. Neuropharmacology 45:873-883.
- Harper RM, Kumar R, Macey PM, Woo MA, Ogren JA (2014) Affective brain areas and sleep-disordered breathing. Prog Brain Res 209:275-293.
- Harrison NL, Simmonds MA (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. Brain Res 323:287-292.
- Hasselbach KA (1912a) Ein Betrag zur Respirationsphysiologie
- der Gravidität. Skand Arch Physiol 27:1 /12.
- Hasselbach KA, Gammeltoft, S.A. (1915a) Die Neutralitä tsregulation
- des graviden Organismus. Biochem Z 68:206/264.
- Hasselbach KAG, S.A. (1912b) Ein Betrag zur Respirationsphysiologie der graviditat. . Skand Arch Physiol 27:1-12.
- Hasselbach KAG, S.A. (1915b) Die Neutralitätsregulation des graviden Organismus. . Biochem Z 68:206-264.
- Haxhiu MA, Tolentino-Silva F, Pete G, Kc P, Mack SO (2001) Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. Respir Physiol 129:191-209.
- Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS (1996) CO2-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. Respir Physiol 105:35-45.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol Rev 86:1009-1031.

- Hayes JA, Del Negro CA (2007) Neurokinin receptor-expressing pre-botzinger complex neurons in neonatal mice studied in vitro. J Neurophysiol 97:4215-4224.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. Peptides 20:1099-1105.
- Hayward LF, Felder RB (1995) Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat. AJP - Legacy 268:R707-R714.
- Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE (1999) Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. Endocrinology 140:3255-3263.
- Healy F, Marcus CL (2011) Congenital central hypoventilation syndrome in children. Paediatr Respir Rev 12:253-263.
- Heeringa J, Berkenbosch A, de Goede J, Olievier CN (1979) Relative contribution of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO2 during hyperoxia. Respir Physiol 37:365-379.
- Helena C, Gustafsson JA, Korach K, Pfaff D, Anselmo-Franci JA, Ogawa S (2009) Effects of estrogen receptor alpha and beta gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the locus coeruleus in female mice. Endocrine 36:169-177.
- Helke CJ, Thor KB, Sasek CA (1989) Chemical neuroanatomy of the parapyramidal region of the ventral medulla in the rat. ProgBrain Res 81:17-28.
- Hellman L, Yoshida K, Zumoff B, Levin J, Kream J, Fukushima DK (1976) The effect of medroxyprogesterone acetate on the pituitary-adrenal axis. J Clin Endocrinol Metab 42:912-917.
- Henry JN, Manaker S (1998) Colocalization of substance P or enkephalin in serotonergic neuronal afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. J Comp Neurol 391:491-505.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain ResBrain ResRev 28:370-490.
- Herman JK, O'Halloran KD, Mitchell GS, Bisgard GE (1999) Methysergide augments the acute, but not the sustained, hypoxic ventilatory response in goats. Respir Physiol 118:25-37.
- Heym J, Steinfels GF, Jacobs BL (1982) Activity of serotonin-containing neurons in the nucleus raphe pallidus of freely moving cats. Brain Res 251:259-276.
- Hilaire G (2006) Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: Possible implication for SIDS. Autonomic Neuroscience 126-127:320-331.
- Hilaire G, Monteau R, Errchidi S (1989) Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. Brain Res 485:325-332.
- Hilaire G, Monteau R, Gauthier P, Rega P, Morin D (1990) Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: in vivo and in vitro studies. NeurosciLett 111:133-138.
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bevengut M (2004) Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. RespirPhysiol Neurobiol 143:187-197.
- Hilaire G, Voituron N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH, Dutschmann M (2010) The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. Respir Physiol Neurobiol 174:76-88.
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K (2003) Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. Trends Endocrinol Metab 14:124-129.
- Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RA (1997) Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. Neuroscience 80:1209-1224.
- Hodge CW, Raber J, McMahon T, Walter H, Sanchez-Perez AM, Olive MF, Mehmert K, Morrow AL, Messing RO (2002) Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and

neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. J Clin Invest 110:1003-1010.

- Hodges MR, Martino P, Davis S, Opansky C, Pan LG, Forster HV (2004) Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. J Appl Physiol (1985) 97:2303-2309.
- Hodges MR, Richerson GB (2010) The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO2 chemoreception, and thermoregulation. J Appl Physiol (1985) 108:1425-1432.
- Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. J Neurosci 28:2495-2505.
- Hoff HE, Breckenridge CG (1949) The medullary origin of respiratory periodicity in the dog. AJP Legacy 158:157-172.
- Holley HS, Behan M, Wenninger JM (2012) Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. Respir Physiol Neurobiol 180:79-87.
- Holtman JR, Jr. (1988) Immunohistochemical localization of serotonin- and substance P-containing fibers around respiratory muscle motoneurons in the nucleus ambiguus of the cat. Neuroscience 26:169-178.
- Holtman JR, Jr., Dick TE, Berger AJ (1987) Serotonin-mediated excitation of recurrent laryngeal and phrenic motoneurons evoked by stimulation of the raphe obscurus. Brain Res 417:12-20.
- Holtman JR, Jr., Norman WP, Gillis RA (1984) Projections from the raphe nuclei to the phrenic motor nucleus in the cat. Neurosci Lett 44:105-111.
- Holtman JR, Jr., Vascik DS, Maley BE (1990) Ultrastructural evidence for serotonin-immunoreactive terminals contacting phrenic motoneurons in the cat. Exp Neurol 109:269-272.
- Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. Neuroscience 137:93-102.
- Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. J Neurosci 24:10318-10325.
- Hori T, Roth GI, Yamamoto WS (1970) Respiratory sensitivity of rat brain-stem surface to chemical stimuli. J Appl Physiol 28:721-724.
- Horn EM, Waldrop TG (1994) Modulation of the respiratory responses to hypoxia and hypercapnia by synaptic input onto caudal hypothalamic neurons. Brain Res 664:25-33.
- Horn EM, Waldrop TG (1998) Suprapontine control of respiration. RespirPhysiol 114:201-211.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature 444:486-489.
- Hosogai M, Matsuo S, Sibahara T, Kawai Y (1998) Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. Respir Physiol 112:37-50.
- Hsieh JH, Chang YC, Su CK, Hwang JC, Yen CT, Chai CY (1998) A single minute lesion around the ventral respiratory group in medulla produces fatal apnea in cats. J Auton Nerv Syst 73:7-18.
- Huang J, Colrain IM, Panitch HB, Tapia IE, Schwartz MS, Samuel J, Pepe M, Bandla P, Bradford R, Mosse YP, Maris JM, Marcus CL (2008) Effect of sleep stage on breathing in children with central hypoventilation. J Appl Physiol (1985) 105:44-53.
- Huang RQ, Erlichman JS, Dean JB (1997) Cell-cell coupling between CO2-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. Neuroscience 80:41-57.
- Huang SC, Dai YW, Lee YH, Chiou LC, Hwang LL (2010) Orexins depolarize rostral ventrolateral medulla neurons and increase arterial pressure and heart rate in rats mainly via orexin 2 receptors. J Pharmacol Exp Ther 334:522-529.
- Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman JL (2015) Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. J Neurosci 35:1052-1067.
- Huckstepp RT, id Bihi R, Eason R, Spyer KM, Dicke N, Willecke K, Marina N, Gourine AV, Dale N (2010) Connexin hemichannel-mediated CO2-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. J Physiol 588:3901-3920.

Hungs M, Lin L, Okun M, Mignot E (2001) Polymorphisms in the vicinity of the hypocretin/orexin are not associated with human narcolepsy. Neurology 57:1893-1895.

- Hunt CE (2001) Sudden infant death syndrome and other causes of infant mortality: diagnosis, mechanisms, and risk for recurrence in siblings. AmJ RespirCrit Care Med 164:346-357.
- Hunt CE, Inwood RJ, Shannon DC (1979) Respiratory and nonrespiratory effects of doxapram in congenital central hypoventilation syndrome. Am Rev Respir Dis 119:263-269.
- Hussain SN, Magder S, Chatillon A, Roussos C (1990) Chemical activation of thin-fiber phrenic afferents: respiratory responses. J Appl Physiol (1985) 69:1002-1011.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk GD (2009) Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. J Neurosci 29:14713-14725.
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M (1999) Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. Brain Res 821:526-529.
- Intlekofer KA, Petersen SL (2011) Distribution of mRNAs encoding classical progestin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progestin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. Neuroscience 172:55-65.
- Issa FG, Remmers JE (1992) Identification of a subsurface area in the ventral medulla sensitive to local changes in PCO2. J Appl Physiol (1985) 72:439-446.
- Ize-Ludlow D, Gray JA, Sperling MA, Berry-Kravis EM, Milunsky JM, Farooqi IS, Rand CM, Weese-Mayer DE (2007) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation presenting in childhood. Pediatrics 120:e179-e188.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev 72:165-229.
- Janczewski WA, Feldman JL (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. The Journal of Physiology Online 570:407-420.
- Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL (2002) Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. J Physiol 545:1017-1026.
- Jansen AH, Liu P, Weisman H, Chernick V, Nance DM (1996) Effect of sinus denervation and vagotomy on c-fos expression in the nucleus tractus solitarius after exposure to CO2. Pflugers Arch 431:876-881.
- Jennum P, Kjellberg J (2011) Health, social and economical consequences of sleep-disordered breathing: a controlled national study. Thorax 66:560-566.
- Jensen D, Duffin J, Lam YM, Webb KA, Simpson JA, Davies GA, Wolfe LA, O'Donnell DE (2008) Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. Respir Physiol Neurobiol 161:76-86.
- Jensen D, Webb KA, O'Donnell DE (2007) Chemical and mechanical adaptations of the respiratory system at rest and during exercise in human pregnancy. Appl Physiol Nutr Metab 32:1239-1250.
- Jensen D, Wolfe LA, Slatkovska L, Webb KA, Davies GA, O'Donnell DE (2005) Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R1369-1375.
- Jiang C, Lipski J (1990) Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Botzinger complex in the cat. ExpBrain Res 81:639-648.
- Jin X, Zhong W, Jiang C (2013) Time-dependent modulation of GABAA-ergic synaptic transmission by allopregnanolone in locus coeruleus neurons of Mecp2-null mice. AmJPhysiol Cell Physiol 305:C1151-C1160.
- Jin XT, Smith Y (2011) Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. Adv Exp Med Biol 717:27-37.

- Johannessen M, Fontanilla D, Mavlyutov T, Ruoho AE, Jackson MB (2011) Antagonist action of progesterone at sigma-receptors in the modulation of voltage-gated sodium channels. Am J Physiol Cell Physiol 300:C328-337.
- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. Neuroscience 13:265-339.
- Johnson PL, Fitz SD, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Shekhar A, Lowry CA (2011) Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. J Psychopharmacol 25:26-36.
- Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005a) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. J Psychopharmacol 19:327-341.
- Johnson PL, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005b) Are tuberomammillary histaminergic neurons involved in CO2-mediated arousal? Exp Neurol 193:228-233.
- Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB (2008) GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO2/H+ responses in primary cell culture. J Appl Physiol (1985) 105:1301-1311.
- Johnson SM, Koshiya N, Smith JC (2001) Isolation of the Kernel for Respiratory Rhythm Generation in a Novel Preparation: The Pre-Botzinger Complex "Island". Journal of Neurophysiology 85:1772-1776.
- Johnson SM, Smith JC, Feldman JL (1996) Modulation of respiratory rhythm in vitro: role of Gi/o protein-mediated mechanisms. J Appl Physiol (1985) 80:2120-2133.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. Journal of Neurophysiology 72:2598-2608.
- Johnson SM, Turner SM, Huxtable AG, Ben-Mabrouk F (2012) Isolated in vitro brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology. Respir Physiol Neurobiol 180:1-7.
- Jones DN, Gartlon J, Parker F, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Hatcher JP, Johns A, Porter RA, Hagan JJ, Hunter AJ, Upton N (2001) Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. Psychopharmacology (Berl) 153:210-218.
- Jordan D, Spyer KM (1977) Studies on the termination of sinus nerve afferents. Pflugers Arch 369:65-73.
- Joseph V, Behan M, Kinkead R (2013) Sex, hormones, and stress: how they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes. Respir Physiol Neurobiol 185:75-86.
- Joseph V, Doan VD, Morency CE, Lajeunesse Y, Bairam A (2006) Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rats. Brain Res 1073-1074:71-82.
- Joseph V, Niane LM, Bairam A (2012) Antagonism of progesterone receptor suppresses carotid body responses to hypoxia and nicotine in rat pups. Neuroscience 207:103-109.
- Joubert F, Perrin-Terrin AS, Verkaeren E, Cardot P, Fiamma MN, Frugiere A, Rivals I, Similowski T, Straus C, Bodineau L (2016) Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotoninergic systems. Neuropharmacology 107:339-350.
- Kabat H (1936) Electrical stimulation of points in the forebrain and mid-brain: The resultant alterations in respiration. The Journal of Comparative Neurology 64:187-208.
- Kalia M, Mesulam MM (1980a) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. J Comp Neurol 193:435-465.
- Kalia M, Mesulam MM (1980b) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. J Comp Neurol 193:467-508.
- Kalia M, Woodward DJ, Smith WK, Fuxe K (1985) Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. J Comp Neurol 233:350-364.

- Kaltman AJ, Goldring RM (1976) Role of circulatory congestion in the cardiorespiratory failure of obesity. Am J Med 60:645-653.
- Kanbayashi T, Inoue Y, Chiba S, Aizawa R, Saito Y, Tsukamoto H, Fujii Y, Nishino S, Shimizu T (2002) CSF hypocretin-1 (orexin-A) concentrations in narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia. J Sleep Res 11:91-93.
- Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, Thomas P (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. Mol Endocrinol 20:1519-1534.
- Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomqvist A (1999) Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. Neurosci Lett 275:85-88.
- Kasymov V, Larina O, Castaldo C, Marina N, Patrushev M, Kasparov S, Gourine AV (2013) Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. J Neurosci 33:435-441.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Yamada-Mouri N (1994) Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. HormBehav 28:454-463.
- Katz ES, McGrath S, Marcus CL (2000) Late-onset central hypoventilation with hypothalamic dysfunction: a distinct clinical syndrome. PediatrPulmonol 29:62-68.
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ (1991) Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. J Neurochem 56:720-723.
- Kaur C, You Y, Singh J, Peng CM, Ling EA (2001) Expression of Fos immunoreactivity in some catecholaminergic brainstem neurons in rats following high-altitude exposure. J Neurosci Res 63:54-63.
- Kawai A, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P (1996) Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. J Physiol 492 (Pt 1):277-292.
- Kawai A, Okada Y, Muckenhoff K, Scheid P (1995) Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. RespirPhysiol 100:25-32.
- Kawai A, Onimaru H, Homma I (2006) Mechanisms of CO2/H+ chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. JPhysiol 572:525-537.
- Keefe DL, Watson R, Naftolin F (1999) Hormone replacement therapy may alleviate sleep apnea in menopausal women: a pilot study. Menopause 6:196-200.
- Keith IM, Bisgard GE, Manohar M, Klein J, Bullard VA (1982) Respiratory effects of pregnancy and progesterone in Jersey cows. Respir Physiol 50:351-358.
- Kelder J, Azevedo R, Pang Y, de Vlieg J, Dong J, Thomas P (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists. Steroids 75:314-322.
- Keller AD (1960) Ablation and stimulation of the hypothalamus: circulatory effects. Physiol Rev 40(Suppl 4):116-135.
- Kernder A, De Luca R, Yanovsky Y, Haas HL, Sergeeva OA (2014) Acid-sensing hypothalamic neurons controlling arousal. Cell Mol Neurobiol 34:777-789.
- Khalifa MM, Flavin MA, Wherrett BA (1988) Congenital central hypoventilation syndrome in monozygotic twins. J Pediatr 113:853-855.
- Khatami R, Maret S, Werth E, Retey J, Schmid D, Maly F, Tafti M, Bassetti CL (2004) Monozygotic twins concordant for narcolepsy-cataplexy without any detectable abnormality in the hypocretin (orexin) pathway. Lancet 363:1199-1200.
- Kinkead R, Tenorio L, Drolet G, Bretzner F, Gargaglioni L (2014) Respiratory manifestations of panic disorder in animals and humans: a unique opportunity to understand how supramedullary structures regulate breathing. Respir Physiol Neurobiol 204:3-13.
- Kinney HC, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Rava LA, Paterson DS (2007) The development of the medullary serotonergic system in early human life. Auton Neurosci 132:81-102.

- Kinney HC, Broadbelt KG, Haynes RL, Rognum IJ, Paterson DS (2011) The serotonergic anatomy of the developing human medulla oblongata: implications for pediatric disorders of homeostasis. J Chem Neuroanat 41:182-199.
- Kitaichi K, Chabot JG, Moebius FF, Flandorfer A, Glossmann H, Quirion R (2000) Expression of the purported sigma(1) (sigma(1)) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. J Chem Neuroanat 20:375-387.
- Kiyama H, Emson PC (1990) Distribution of somatostatin mRNA in the rat nervous system as visualized by a novel non-radioactive in situ hybridization histochemistry procedure. Neuroscience 38:223-244.
- Kiyashchenko LI, Mileykovskiy BY, Maidment N, Lam HA, Wu MF, John J, Peever J, Siegel JM (2002) Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. J Neurosci 22:5282-5286.
- Klein DF (1993) Panic disorder with agoraphobia. Br J Psychiatry 163:835-837.
- Knoflach F, Hernandez MC, Bertrand D (2016) GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. Biochem Pharmacol 115:10-17.
- Kobayashi S, Fujito Y, Matsuyama K, Aoki M (2010) Raphe modulation of the pre-Botzinger complex respiratory bursts in in vitro medullary half-slice preparations of neonatal mice. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 196:519-528.
- Kocaay P, Siklar Z, Camtosun E, Kendirli T, Berberoglu M (2014) ROHHAD Syndrome: Reasons for Diagnostic Difficulties in Obesity. J Clin Res Pediatr Endocrinol 6:254-257.
- Koksma JJ, van Kesteren RE, Rosahl TW, Zwart R, Smit AB, Luddens H, Brussaard AB (2003) Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. J Neurosci 23:788-797.
- Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, Adamusova E, Borovska J, Vales K, Stuchlik A, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2011) Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. Steroids 76:1409-1418.
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. Nature 400:360-363.
- Kouzarides T, Ziff E (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. Nature 336:646-651.
- Krahn LE, Pankratz VS, Oliver L, Boeve BF, Silber MH (2002) Hypocretin (orexin) levels in cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy: relationship to cataplexy and HLA DQB1\*0602 status. Sleep 25:733-736.
- Kramer JM, Nolan PC, Waldrop TG (1999) In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. Brain Res 835:197-203.
- Krause KL, Forster HV, Davis SE, Kiner T, Bonis JM, Pan LG, Qian B (2009) Focal acidosis in the pre-Botzinger complex area of awake goats induces a mild tachypnea. J Appl Physiol (1985) 106:241-250.
- Krauss AN, Klain, D.B., Waldman, S., Auld, P.A.M., (1975) Ventilatory response to carbon dioxide in newborn infants. Pediatr Res 9:6–50.
- Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW (2000) A membrane-associated progesteronebinding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. Proc Natl Acad Sci U S A 97:12816-12821.
- Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma IM (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. Nature 312:711-716.
- Kubin L, Tojima H, Reignier C, Pack AI, Davies RO (1996) Interaction of serotonergic excitatory drive to hypoglossal motoneurons with carbachol-induced, REM sleep-like atonia. Sleep 19:187-195.
- Kubli-Garfias C, Gonzalez-Flores O, Gomora-Arrati P, Gonzalez-Mariscal G, Vazquez-Ramirez R, Beyer C (2013) Bimodal binding and free energy of the progesterone receptor in the induction of female sexual receptivity by progesterone and synthetic progestins. J Steroid Biochem Mol Biol 133:43-50.
- Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, Weaver JL, Sen J, Abbott SB, Lazarenko RM, Ludwig MG, Perez-Reyes E, Mohebbi N, Bettoni C, Gassmann M, Suply T, Seuwen K, Guyenet PG, Wagner

CA, Bayliss DA (2015) PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO(2) requires the protonactivated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. Science 348:1255-1260.

- Kuwaki T, Li A, Nattie E (2010) State-dependent central chemoreception: a role of orexin. RespirPhysiol Neurobiol 173:223-229.
- Labombarda F, Meffre D, Delespierre B, Krivokapic-Blondiaux S, Chastre A, Thomas P, Pang Y, Lydon JP, Gonzalez SL, De Nicola AF, Schumacher M, Guennoun R (2010) Membrane progesterone receptors localization in the mouse spinal cord. Neuroscience 166:94-106.
- Lahiri S, DeLaney RG (1975a) Relationship between carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. Respir Physiol 24:267-286.
- Lahiri S, DeLaney RG (1975b) Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. Respir Physiol 24:249-266.
- Lahiri S, Forster RE, 2nd (2003) CO2/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. Int J Biochem Cell Biol 35:1413-1435.
- Lalley PM (1986) Responses of phrenic motoneurones of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. J Physiol 380:349-371.
- Lambert JJ, Belelli D, Harney SC, Peters JA, Frenguelli BG (2001) Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. Brain Res Brain Res Rev 37:68-80.
- Landeira-Fernandez J (2015) Participation of NMDA receptors in the lateral hypothalamus in gastric erosion induced by cold-water restraint. Physiol Behav 140:209-214.
- Lara JP, Parkes MJ, Silva-Carvhalo L, Izzo P, Dawid-Milner MS, Spyer KM (1994) Cardiovascular and respiratory effects of stimulation of cell bodies of the parabrachial nuclei in the anaesthetized rat. J Physiol 477:321-329.
- Larnicol N, Wallois F, Berquin P, Gros F, Rose D (1994) c-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. J Physiol Paris 88:81-88.
- Lauber AH, Romano GJ, Pfaff DW (1991) Sex difference in estradiol regulation of progestin receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization. Neuroendocrinology 53:608-613.
- Lavezzi AM (2015) A New Theory to Explain the Underlying Pathogenetic Mechanism of Sudden Infant Death Syndrome. Front Neurol 6:220.
- Lavezzi AM, Matturri L (2012) Neuroanatomical dysmorphology of the medial superior olivary nucleus in sudden fetal and infant death. Front Hum Neurosci 6:322.
- Lavezzi AM, Weese-Mayer DE, Yu MY, Jennings LJ, Corna MF, Casale V, Oneda R, Matturri L (2012) Developmental alterations of the respiratory human retrotrapezoid nucleus in sudden unexplained fetal and infant death. Auton Neurosci 170:12-19.
- Lazarenko RM, Stornetta RL, Bayliss DA, Guyenet PG (2011) Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. RespirPhysiol Neurobiol 175:283-287.
- Legallois CJJ (1812) Exp,riences sur le principe de la vie. vol. D'Hautel, p 328 Paris.
- Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003) Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. Steroids 68:761-770.
- Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. J Pharmacol Exp Ther 148:1-8.
- Li A, Nattie E (2002) CO2 dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. RespirPhysiol Neurobiol 133:11-22.
- Li A, Nattie E (2006) Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. The Journal of Physiology Online 570:385-396.
- Li A, Nattie E (2010) Antagonism of rat orexin receptors by almorexant attenuates central chemoreception in wakefulness in the active period of the diurnal cycle. J Physiol 588:2935-2944.
- Li A, Nattie EE (1997) Focal central chemoreceptor sensitivity in the RTN studied with a CO2 diffusion pipette in vivo. Journal of Applied Physiology 83:420-428.

- Li D CC, Kato R, Ward S, & Keens TG (2013) Does desogestrel improve ventilatory control in congenital central hypoventilation syndrome?
- Li D, Chin, C., Kato, R., Ward, S., Keens, T.G., (2013) Does Desogestrel Improve Ventilatory Control in Congenital Central Hypoventilation Syndrome, p. A5194. In: American Thoracic Society International Conference.
- Li N, Li A, Nattie E (2013) Focal microdialysis of CO(2) in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. Respir Physiol Neurobiol 185:349-355.
- Li SJ, Cui SY, Zhang XQ, Yu B, Sheng ZF, Huang YL, Cao Q, Xu YP, Lin ZG, Yang G, Cui XY, Zhang YH (2015) PKC in rat dorsal raphe nucleus plays a key role in sleep-wake regulation. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 63:47-53.
- Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN (2002) Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. Neuron 36:1169-1181.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. Nat Neurosci 3:600-607.
- Lin CC, Wu KM, Chou CS, Liaw SF (2004) Oral airway resistance during wakefulness in eucapnic and hypercapnic sleep apnea syndrome. Respir Physiol Neurobiol 139:215-224.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. Cell 98:365-376.
- Linsenbardt AJ, Taylor A, Emnett CM, Doherty JJ, Krishnan K, Covey DF, Paul SM, Zorumski CF, Mennerick S (2014) Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors. Neuropharmacology 85:232-242.
- Lipski J, McAllen RM, Spyer KM (1977) The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarus. J Physiol 269:797-810.
- Liu B, Arbogast LA (2009) Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. J Neuroendocrinol 21:993-1000.
- Liu Q, Lowry TF, Wong-Riley MT (2006) Postnatal changes in ventilation during normoxia and acute hypoxia in the rat: implication for a sensitive period. J Physiol 577:957-970.
- Liu Q, Wong-Riley MT (2010) Postnatal development of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A, 2B, 2C, 2D, and 3B immunoreactivity in brain stem respiratory nuclei of the rat. Neuroscience 171:637-654.
- Liu Z, Patino R (1993) High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of Xenopus oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. Biol Reprod 49:980-988.
- Lo L, Morin X, Brunet JF, Anderson DJ (1999) Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. Neuron 22:693-705.
- Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. J Physiol 332:1-24.
- Loeschcke HH, Koepchen HP, Gertz KH (1958) [Effect of hydrogen ion concentration and carbon dioxide pressure in the cerebrospinal fluid on respiration]. Pflugers Arch 266:569-585.
- Loewy AD, Burton H (1978) Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. J Comp Neurol 181:421-449.
- Loewy AD, Wallach JH, McKellar S (1981) Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. Brain Research Reviews 3:63-80.
- Loftis JM, Janowsky A (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. Pharmacol Ther 97:55-85.
- Lopes LT, Patrone LG, Bicego KC, Coimbra NC, Gargaglioni LH (2012) Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. Pflugers Arch 464:155-166.

- Lorry AC (1760) Sur les mouvements du cerveau. Second m,moire. Sur les mouvements contre nature de ce viscŠre, et sur les organes qui font le principe de son action. M,mMathPhysPr,sAcadRoySciDivSav, Paris 3:344-377.
- Losel R, Dorn-Beineke A, Falkenstein E, Wehling M, Feuring M (2004) Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. Int J Biochem Cell Biol 36:1532-1541.
- Low CM, Wee KS (2010) New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. Mol Pharmacol 78:1-11.
- Lumsden T (1923a) Observations on the respiratory centres. J Physiol 57:354-367.
- Lumsden T (1923b) Observations on the respiratory centres in the cat. J Physiol 57:153-160.
- Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE (2000) The orexin OX1 receptor activates a novel Ca2+ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. J Biol Chem 275:30806-30812.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. Neuroscience 65:119-160.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. Physiol Rev 84:1051-1095.
- M. SJ, Hanna BD, Volgman AS, Jones PJ, Barnes SD, Weese-Mayer DE (2000) Cardiac rhythm disturbances among children with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome. Pediatr Pulmonol 29:351-358.
- Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS (1991) Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. Neurosci Lett 134:21-24.
- Macavei VM, Spurling KJ, Loft J, Makker HK (2013) Diagnostic predictors of obesity-hypoventilation syndrome in patients suspected of having sleep disordered breathing. J Clin Sleep Med 9:879-884.
- Macnutt MJ, De Souza MJ, Tomczak SE, Homer JL, Sheel AW (2012) Resting and exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle. J Appl Physiol (1985) 112:737-747.
- Maguire J, Mody I (2009) Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1:S84-90.
- Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. Prog Neurobiol 38:379-395.
- Majewska MD, Demirgoren S, Spivak CE, London ED (1990) The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. Brain Res 526:143-146.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. Science 232:1004-1007.
- Majewska MD, Schwartz RD (1987) Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gammaaminobutyric acid receptor complex in brain? Brain Res 404:355-360.
- Malakhova OE, Davenport PW (2001) c-Fos expression in the central nervous system elicited by phrenic nerve stimulation. J Appl Physiol (1985) 90:1291-1298.
- Malayev A, Gibbs TT, Farb DH (2002) Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. Br J Pharmacol 135:901-909.
- Mallard C, Vexler ZS (2015) Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? Stroke 46:3006-3011.
- 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:e100421.
- Marcus CL, Jansen MT, Poulsen MK, Keens SE, Nield TA, Lipsker LE, Keens TG (1991) Medical and psychosocial outcome of children with congenital central hypoventilation syndrome. J Pediatr 119:888-895.
- Martins PJ, D'Almeida V, Pedrazzoli M, Lin L, Mignot E, Tufik S (2004) Increased hypocretin-1 (orexina) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity. Regul Pept 117:155-158.

- Matera I, Bachetti T, Puppo F, Di Duca M, Morandi F, Casiraghi GM, Cilio MR, Hennekam R, Hofstra R, Schober JG, Ravazzolo R, Ottonello G, Ceccherini I (2004) PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset Central Hypoventilation syndrome. J Med Genet 41:373-380.
- Mathew OP (2011) Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. J Perinatol 31:302-310.
- Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I (2001) Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. Hypertension 37:1382-1387.
- Maurice T (2004) Neurosteroids and sigma1 receptors, biochemical and behavioral relevance. Pharmacopsychiatry 37 Suppl 3:S171-182.
- Mayer ML (2016) Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. Curr Opin Struct Biol 41:119-127.
- Mayo MC, Deng JC, Albores J, Zeidler M, Harper RM, Avidan AY (2015) Hypocretin Deficiency Associated with Narcolepsy Type 1 and Central Hypoventilation Syndrome in Neurosarcoidosis of the Hypothalamus. J Clin Sleep Med 11:1063-1065.
- McEwen BS, Coirini H, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, Woolley C (1991) Steroid hormones as mediators of neural plasticity. J Steroid Biochem Mol Biol 39:223-232.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons. NatNeurosci 8:1142-1144.
- Meffre D, Delespierre B, Gouezou M, Leclerc P, Vinson GP, Schumacher M, Stein DG, Guennoun R (2005) The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx is expressed in brain regions involved in water homeostasis and is up-regulated after traumatic brain injury. J Neurochem 93:1314-1326.
- Meffre D, Labombarda F, Delespierre B, Chastre A, De Nicola AF, Stein DG, Schumacher M, Guennoun R (2013) Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. Neuroscience 231:111-124.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. Neuron 37:821-826.
- Mellins RB, Balfour HH, Jr., Turino GM, Winters RW (1970) Failure of automatic control of ventilation (Ondine's curse). Report of an infant born with this syndrome and review of the literature. Medicine (Baltimore) 49:487-504.
- Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends Endocrinol Metab 13:35-43.
- Menzies GS, Howland K, Rae MT, Bramley TA (1999) Stimulation of specific binding of [3H]progesterone to bovine luteal cell-surface membranes: specificity of digitonin. Mol Cell Endocrinol 153:57-69.
- Merrill EG (1970) The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambigualis, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. Brain Res 24:11-28.
- Merrill EG (1974) Proceedings: Antidromic activation of lateral respiratory neurones during their silent periods. J Physiol 241:118P-119P.
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M (1996) Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. Eur J Biochem 239:726-731.
- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 101:4649-4654.
- Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S (2011) The normal menstrual cycle in women. Anim Reprod Sci 124:229-236.
- Miles R (1983) Does low pH stimulate central chemoreceptors located near the ventral medullary surface? Brain Res 271:349-353.
- Miller AD, Ezure K, Suzuki I (1985) Control of abdominal muscles by brain stem respiratory neurons in the cat. J Neurophysiol 54:155-167.

- Millhorn DE (1986) Stimulation of raphe (obscurus) nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat. J Physiol 381:169-179.
- Min L, Takemori H, Nonaka Y, Katoh Y, Doi J, Horike N, Osamu H, Raza FS, Vinson GP, Okamoto M (2004) Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol 215:143-148.
- Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW (1963) Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. Journal of Applied Physiology 18:523-533.
- Miyamoto K, Iwase M, Kimura H, Homma I (2004) Central histamine contributes to the inspiratory offswitch mechanism via H1 receptors in mice. Respir Physiol Neurobiol 144:25-33.
- Moga MM, Saper CB, Gray TS (1990) Neuropeptide organization of the hypothalamic projection to the parabrachial nucleus in the rat. J Comp Neurol 295:662-682.
- Mokhlesi B (2010) Obesity hypoventilation syndrome: a state-of-the-art review. Respir Care 55:1347-1362; discussion 1363-1345.
- Mokhlesi B, Tulaimat A, Faibussowitsch I, Wang Y, Evans AT (2007) Obesity hypoventilation syndrome: prevalence and predictors in patients with obstructive sleep apnea. Sleep Breath 11:117-124.
- Monda M, Viggiano A, Mondola P, De Luca V (2001) Inhibition of prostaglandin synthesis reduces hyperthermic reactions induced by hypocretin-1/orexin A. Brain Res 909:68-74.
- Monnet FP, Mahe V, Robel P, Baulieu EE (1995) Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3774-3778.
- Monnier A, Alheid GF, McCrimmon DR (2003) Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. J Physiol 548:859-874.
- Morgan JI, Curran T (1986) Role of ion flux in the control of c-fos expression. Nature 322:552-555.
- Morrison SF, Cravo SL, Wilfehrt HM (1994) Pontine lesions produce apneusis in the rat. Brain Research 652:83-86.
- Mortola JP (2004) Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. Respir Physiol Neurobiol 141:345-356.
- Moussatche P, Lyons TJ (2012) Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. Biochem Soc Trans 40:200-204.
- Mulkey DK, Henderson RA, 3rd, Putnam RW, Dean JB (2003) Hyperbaric oxygen and chemical oxidants stimulate CO2/H+-sensitive neurons in rat brain stem slices. J Appl Physiol (1985) 95:910-921.
- Mulkey DK, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2006) Purinergic P2 Receptors Modulate Excitability But Do Not Mediate pH Sensitivity of RTN Respiratory Chemoreceptors. Journal of Neuroscience 26:7230-7233.
- Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG (2007a) Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. J Neurosci 27:14128-14138.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. Nat Neurosci 7:1360-1369.
- Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2007b) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. J Neurosci 27:14049-14058.
- Mulkey DK, Wenker IC (2011) Astrocyte chemoreceptors: mechanisms of H+ sensing by astrocytes in the retrotrapezoid nucleus and their possible contribution to respiratory drive. Exp Physiol 96:400-406.
- Muller R, Bravo R, Burckhardt J, Curran T (1984) Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. Nature 312:716-720.
- Murakoshi T, Suzue T, Tamai S (1985) A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. Br J Pharmacol 86:95-104.
- Muzumdar H, Arens R (2008) Central Alveolar Hypoventilation Syndromes. Sleep MedClin 3:601-615.

- Naeije N, Melot C, Naeije R, Sergysels R (1982) Ondine's curse. Report of a patient treated with almitrine, a new respiratory stimulant. Eur J Respir Dis 63:342-346.
- Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D (1988) DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. Cell 55:907-915.
- Nakamura A, Zhang W, Yanagisawa M, Fukuda Y, Kuwaki T (2007) Vigilance state-dependent attenuation of hypercapnic chemoreflex and exaggerated sleep apnea in orexin knockout mice. J Appl Physiol (1985) 102:241-248.
- Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. J Comp Neurol 347:249-274.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. Brain Res 827:243-260.
- Nashmi R, Lester HA (2006) CNS localization of neuronal nicotinic receptors. J Mol Neurosci 30:181-184.
- Nattie E (1999) CO2, brainstem chemoreceptors and breathing. Progress in Neurobiology 59:299-331.
- Nattie E, Li A (2006) Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. Journal of Applied Physiology 101:1596-1606.
- Nattie E, Li A (2008) Muscimol dialysis into the caudal aspect of the Nucleus tractus solitarii of conscious rats inhibits chemoreception. Respir Physiol Neurobiol 164:394-400.
- Nattie E, Li A (2010) Central chemoreception in wakefulness and sleep: evidence for a distributed network and a role for orexin. JApplPhysiol 108:1417-1424.
- Nattie E, Shi J, Li A (2001) Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat. RespirPhysiol 124:179-193.
- Nattie EE (2001) Chemoreception and tonic drive in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region of the awake rat: bicuculline and muscimol dialysis in the RTN. AdvExpMedBiol 499:27-32.
- Nattie EE, Li A (1996) Central chemoreception in the region of the ventral respiratory group in the rat. J ApplPhysiol 81:1987-1995.
- Nattie EE, Li A (2001) CO2 dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. J ApplPhysiol 90:1247-1257.
- Nattie EE, Li A (2002a) CO2 dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. J ApplPhysiol 92:2119-2130.
- Nattie EE, Li A (2002b) Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. J Physiol 544:603-616.
- Nattie EE, Li A, Richerson G, Lappi DA (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. J Physiol 556:235-253.
- Nattie EE, Mills JW, Ou LC, St John WM (1988) Kainic acid on the rostral ventrolateral medulla inhibits phrenic output and CO2 sensitivity. J ApplPhysiol 65:1525-1534.
- Netzer NC, Eliasson AH, Strohl KP (2003) Women with sleep apnea have lower levels of sex hormones. Sleep Breath 7:25-29.
- Neubauer JA, Melton JE, Edelman NH (1990) Modulation of respiration during brain hypoxia. Journal of Applied Physiology 68:441-451.
- Nichols NL, Hartzler LK, Conrad SC, Dean JB, Putnam RW (2008) Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. Adv Exp Med Biol 605:348-352.
- Nichols NL, Mulkey DK, Wilkinson KA, Powell FL, Dean JB, Putnam RW (2009) Characterization of the chemosensitive response of individual solitary complex neurons from adult rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296:R763-773.
- Nielsen AM, Bisgard GE, Mitchell GS (1986) Phrenic nerve responses to hypoxia and CO2 in decerebrate dogs. RespirPhysiol 65:267-283.

- Nieuwenhuys R, Voogd, J., van Huijzen, C., (1978) The human central vevous system A synopsis and atlas, third edition. Springer-Verglag.
- Nishino S, Fujiki N, Ripley B, Sakurai E, Kato M, Watanabe T, Mignot E, Yanai K (2001) Decreased brain histamine content in hypocretin/orexin receptor-2 mutated narcoleptic dogs. Neurosci Lett 313:125-128.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. Lancet 355:39-40.
- Nitsos I, Walker DW (1999) Characterization of pontine neurons which respond to hypoxia in fetal sheep 2. NeurosciLett 266:33-36.
- Nobuta H, Cilio MR, Danhaive O, Tsai HH, Tupal S, Chang SM, Murnen A, Kreitzer F, Bravo V, Czeisler C, Gokozan HN, Gygli P, Bush S, Weese-Mayer DE, Conklin B, Yee SP, Huang EJ, Gray PA, Rowitch D, Otero JJ (2015) Dysregulation of locus coeruleus development in congenital central hypoventilation syndrome. Acta Neuropathol 130:171-183.
- Nolan PC, Waldrop TG (1993) In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. Brain Res 630:101-114.
- Nolte I, Jeckel D, Wieland FT, Sohn K (2000) Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1543:123-130.
- Norgren R (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. Neuroscience 3:207-218.
- Nowbar S, Burkart KM, Gonzales R, Fedorowicz A, Gozansky WS, Gaudio JC, Taylor MR, Zwillich CW (2004) Obesity-associated hypoventilation in hospitalized patients: prevalence, effects, and outcome. Am J Med 116:1-7.
- Nunez-Abades PA, Morillo AM, Pasaro R (1993) Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections. J AutonNervSyst 42:99-118.
- O'Donnell CP, Tankersley CG, Polotsky VP, Schwartz AR, Smith PL (2000) Leptin, obesity, and respiratory function. Respir Physiol 119:163-170.
- Ohno K, Sakurai T (2008) Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. Front Neuroendocrinol 29:70-87.
- Okada Y, Chen Z, Jiang W, Kuwana S, Eldridge FL (2002) Anatomical arrangement of hypercapniaactivated cells in the superficial ventral medulla of rats. J ApplPhysiol 93:427-439.
- Okada Y, Kawai A, Muckenhoff K, Scheid P (1998) Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. RespirPhysiol 111:55-63.
- Okada Y, Muckenhoff K, Holtermann G, Acker H, Scheid P (1993) Depth profiles of pH and PO2 in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. Respiration Physiology 93:315-326.
- Oku Y, Dick TE (1992) Phase resetting of the respiratory cycle before and after unilateral pontine lesion in cat. Journal of Applied Physiology 72:721-730.
- Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong S, Mignot E (2002) Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. Sleep 25:27-35.
- Olafsdottir BR, Rye DB, Scammell TE, Matheson JK, Stefansson K, Gulcher JR (2001) Polymorphisms in hypocretin/orexin pathway genes and narcolepsy. Neurology 57:1896-1899.
- Olszewski JaB, D. (1954) Cytoarchitecture of the human brainstem. J Comp Neurol.
- Onai T, Saji M, Miura M (1987) Projections of supraspinal structures to the phrenic motor nucleus in rats studied by a horseradish peroxidase microinjection method. J AutonNervSyst 21:233-239.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1987) Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. Neurosci Lett 78:151-155.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1989) Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. Exp Brain Res 76:530-536.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1995) Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. Exp Brain Res 106:57-68.
- Onimaru H, Homma I (1987) Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. Brain Res 403:380-384.

- Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. J Neurosci 23:1478-1486.
- Onimaru H, Homma I (2005) Optical imaging of respiratory neuron activity from the dorsal view of the lower brainstem. ClinExp PharmacolPhysiol 32:297-301.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2008) CO2-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. J Neurosci 28:12845-12850.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2009) Phox2b, RTN/pFRG neurons and respiratory rhythmogenesis. Respir Physiol Neurobiol 168:13-18.
- Orem J, Netick A (1982) Characteristics of midbrain respiratory neurons in sleep and wakefulness in the cat. Brain Research 244:231-241.
- Orem JM, Lovering AT, Vidruk EH (2005) Excitation of medullary respiratory neurons in REM sleep. Sleep 28:801-807.
- Oren J, Newth CJ, Hunt CE, Brouillette RT, Bachand RT, Shannon DC (1986) Ventilatory effects of almitrine bismesylate in congenital central hypoventilation syndrome. Am Rev Respir Dis 134:917-919.
- Otake K, Sasaki H, Ezure K, Manabe M (1989) Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. J Comp Neurol 286:218-230.
- Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff 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. J Physiol 513 (Pt 2):381-398.
- Oz M, Zhang L, Spivak CE (2002) Direct noncompetitive inhibition of 5-HT(3) receptor-mediated responses by forskolin and steroids. Arch Biochem Biophys 404:293-301.
- Pace MC, Thomas P (2005) Steroid-induced oocyte maturation in Atlantic croaker (Micropogonias undulatus) is dependent on activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Biol Reprod 73:988-996.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. J Neurosci 31:2895-2905.
- Pan LG, Forster HV, Martino P, Strecker PJ, Beales J, Serra A, Lowry TF, Forster MM, Forster AL (1998) Important role of carotid afferents in control of breathing. J Appl Physiol (1985) 85:1299-1306.
- Pang Y, Dong J, Thomas P (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and {epsilon} (mPRdelta and mPR{epsilon}) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. Endocrinology 154:283-295.
- Panisello JM, Donnelly DF (1998) Chemotransduction by carotid body chemoreceptors is dependent on bicarbonate currents. Respir Physiol 112:265-281.
- Pardridge WM, Mietus LJ (1979) Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. J Clin Invest 64:145-154.
- Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH (1999) Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. Brain Res 830:72-87.
- Park-Chung M, Wu FS, Farb DH (1994) 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. Mol Pharmacol 46:146-150.
- Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. Mol Pharmacol 52:1113-1123.
- Parodi S, Bachetti T, Lantieri F, Di Duca M, Santamaria G, Ottonello G, Matera I, Ravazzolo R, Ceccherini I (2008) Parental origin and somatic mosaicism of PHOX2B mutations in Congenital Central Hypoventilation Syndrome. Hum Mutat 29:206.
- Partridge LD, Muller TH, Swandulla D (1994) Calcium-activated non-selective channels in the nervous system. Brain Res Brain Res Rev 19:319-325.

- Pascual O, Morin-Surun MP, Barna B, avit-Saubie M, Pequignot JM, Champagnat J (2002) Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. J Physiol 544:511-520.
- Paterson DS, Thompson EG, Kinney HC (2006) Serotonergic and glutamatergic neurons at the ventral medullary surface of the human infant: Observations relevant to central chemosensitivity in early human life. Autonomic Neuroscience 124:112-124.
- Paton JY, Swaminathan S, Sargent CW, Hawksworth A, Keens TG (1993) Ventilatory response to exercise in children with congenital central hypoventilation syndrome. Am Rev Respir Dis 147:1185-1191.
- Pattyn A, Goridis C, Brunet JF (2000a) Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. MolCell Neurosci 15:235-243.
- Pattyn A, Hirsch M, Goridis C, Brunet JF (2000b) Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. Development 127:1349-1358.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. Development 124:4065-4075.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. Nature 399:366-370.
- Patwari PP, Rand CM, Berry-Kravis EM, Ize-Ludlow D, Weese-Mayer DE (2011) Monozygotic twins discordant for ROHHAD phenotype. Pediatrics 128:e711-715.
- Patwari PP, Wolfe LF (2014) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation: review and update. Curr Opin Pediatr 26:487-492.
- Paul SM, Doherty JJ, Robichaud AJ, Belfort GM, Chow BY, Hammond RS, Crawford DC, Linsenbardt AJ, Shu HJ, Izumi Y, Mennerick SJ, Zorumski CF (2013) The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. J Neurosci 33:17290-17300.
- Paxinos G, Franklin KB (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition. San Diego, CA: Academic Press).
- Paxinos G, Huang, X. (1995) Atlas of the Human Brainstem. Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. San Diego CA: Academic Press.
- Paz-Priel I, Cooke DW, Chen AR (2011) Cyclophosphamide for rapid-onset obesity, hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome. J Pediatr 158:337-339.
- Peano CA, Shonis CA, Dillon GH, Waldrop TG (1992) Hypothalamic GABAergic mechanism involved in respiratory response to hypercapnia. Brain ResBull 28:107-113.
- Pearce RA, Stornetta RL, Guyenet PG (1989) Retrotrapezoid nucleus in the rat. NeurosciLett 101:138-142.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M (2005) Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability. Biol Reprod 73:261-270.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M (2006) Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. Endocrinology 147:3133-3140.
- Pena F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM (2004) Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. Neuron 43:105-117.
- Pena F, Ramirez JM (2004) Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. J Neurosci 24:7549-7556.
- Pepin JL, Borel JC, Janssens JP (2012) Obesity hypoventilation syndrome: an underdiagnosed and undertreated condition. Am J Respir Crit Care Med 186:1205-1207.
- Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, Frugiere A, Richalet JP, Bodineau L, Voituron N (2016) 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.

- Pete G, Mack SO, Haxhiu MA, Walbaum S, Gauda EB (2002) CO(2)-induced c-Fos expression in brainstem preprotachykinin mRNA containing neurons. Respir Physiol Neurobiol 130:265-274.
- Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, Brewer DN, Del Pino Sans J, Lopez JA (2013) Nonclassical progesterone signalling molecules in the nervous system. J Neuroendocrinol 25:991-1001.
- Petrovic M, Sedlacek M, Cais O, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2009) Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent. Neuroscience 160:616-628.
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2005) 20-oxo-5beta-pregnan-3alphayl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. J Neurosci 25:8439-8450.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. Nat Med 6:991-997.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. J Neurosci 18:9996-10015.
- Philibert D, Bouchoux F, Degryse M, Lecaque D, Petit F, Gaillard M (1999) The pharmacological profile of a novel norpregnance progestin (trimegestone). Gynecol Endocrinol 13:316-326.
- Phipps PR, Starritt E, Caterson I, Grunstein RR (2002) Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity. Thorax 57:75-76.
- Pineda J, Aghajanian GK (1997) Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. Neuroscience 77:723-743.
- Pinna G, Agis-Balboa RC, Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E (2008) Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. Neurochem Res 33:1990-2007.
- Piper AJ, Grunstein RR (2010) Big breathing: the complex interaction of obesity, hypoventilation, weight loss, and respiratory function. J Appl Physiol (1985) 108:199-205.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. Neuroscience 101:815-850.
- Pitts RF (1941) The differentiation of respiratory centers. AJP Legacy 134:192-201.
- Pitts RF (1946) Organisation of the respiratory center. Physiol Rev 26:609-630.
- Pitts RF, Magoun HW, Ranson SW (1939) The origin of respiratory rhythmicity. AJP Legacy 127:654-670.
- Poets CF, Meny RG, Chobanian MR, Bonofiglo RE (1999) Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. PediatrRes 45:350-354.
- Porcu P, Barron AM, Frye CA, Walf AA, Yang SY, He XY, Morrow AL, Panzica GC, Melcangi RC (2016) Neurosteroidogenesis Today: Novel Targets for Neuroactive Steroid Synthesis and Action and Their Relevance for Translational Research. J Neuroendocrinol 28:12351.
- Portillo F, Grelot L, Milano S, Bianchi AL (1994) Brainstem neurons with projecting axons to both phrenic and abdominal motor nuclei: a double fluorescent labeling study in the cat. NeurosciLett 173:50-54.
- Prasad B, Radulovacki M, Olopade C, Herdegen JJ, Logan T, Carley DW (2010) Prospective trial of efficacy and safety of ondansetron and fluoxetine in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Sleep 33:982-989.
- Pratt WB (1998) The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med 217:420-434.
- Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70based chaperone machinery. Exp Biol Med (Maywood) 228:111-133.

- Preston ME, Jensen D, Janssen I, Fisher JT (2009) Effect of menopause on the chemical control of breathing and its relationship with acid-base status. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296:R722-727.
- Ptak K, Burnet H, Blanchi B, Sieweke M, De FC, Hunt SP, Monteau R, Hilaire G (2002) The murine neurokinin NK1 receptor gene contributes to the adult hypoxic facilitation of ventilation. EurJ Neurosci 16:2245-2252.
- Ptak K, Konrad M, Di PE, Tell F, Hilaire G, Monteau R (2000) Cellular and synaptic effect of substance P on neonatal phrenic motoneurons. EurJ Neurosci 12:126-138.
- Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. J Neurosci 29:3720-3737.
- Putnam RW, Conrad SC, Gdovin MJ, Erlichman JS, Leiter JC (2005) Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO2 chemosensitivity. RespirPhysiol Neurobiol 149:165-179.
- Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA (2004) Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. Am J Physiol Cell Physiol 287:C1493-1526.
- Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, LaQuaglia M, Maris DJ, Mosse YP, Maris JM (2008) Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. Oncogene 27:469-476.
- Ramanantsoa N, Gallego J (2013) Congenital central hypoventilation syndrome. Respir Physiol Neurobiol 189:272-279.
- Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J, Goridis C (2011a) Breathing without CO(2) chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. Journal of Neuroscience 31:12880-12888.
- Ramanantsoa N, Matrot B, Vardon G, Lajard AM, Voituron N, Dauger S, Denjean A, Hilaire G, Gallego J (2011b) Impaired ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxic stress in newborn phox2b heterozygous knock-out mice. Front Physiol 2:61.
- Ramirez JM, Quellmalz UJA, Wilken B, Richter DW (1998) The hypoxic response of neurones within the in vitro mammalian respiratory network. The Journal of Physiology Online 507:571-582.
- Rampon C, Peyron C, Gervasoni D, Pow DV, Luppi PH, Fort P (1999) Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry. Eur J Neurosci 11:1058-1066.
- Rand CM, Patwari PP, Rodikova EA, Zhou L, Berry-Kravis EM, Wilson RJ, Bech-Hansen T, Weese-Mayer DE (2011) Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation: analysis of hypothalamic and autonomic candidate genes. PediatrRes 70:375-378.
- Rapoport DM, Garay SM, Epstein H, Goldring RM (1986) Hypercapnia in the obstructive sleep apnea syndrome. A reevaluation of the "Pickwickian syndrome". Chest 89:627-635.
- Rauscher FJ, 3rd, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelman BM (1988a) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. Cell 52:471-480.
- Rauscher FJ, 3rd, Voulalas PJ, Franza BR, Jr., Curran T (1988b) Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. Genes Dev 2:1687-1699.
- Raza FS, Takemori H, Tojo H, Okamoto M, Vinson GP (2001) Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor. Eur J Biochem 268:2141-2147.
- Redgate ES, Gellhorn E (1958) Respiratory activity and the hypothalamus. Am J Physiol 193:189-194.
- Regensteiner JG, Woodard WD, Hagerman DD, Weil JV, Pickett CK, Bender PR, Moore LG (1989) Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. Journal of Applied Physiology 66:808-813.
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubie M (1996) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) depolarizes a subset of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. J Neurophysiol 75:811-819.

- Rekling JC, Feldman JL (1998) PreB"tzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. AnnuRevPhysiol 60:385-405.
- Ren J, Greer JJ (2006) Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period. JPhysiol 574:535-546.
- Repetto GM, Corrales RJ, Abara SG, Zhou L, Berry-Kravis EM, Rand CM, Weese-Mayer DE (2009) Lateronset congenital central hypoventilation syndrome due to a heterozygous 24-polyalanine repeat expansion mutation in the PHOX2B gene. Acta Paediatr 98:192-195.
- Reppucci D, Hamilton J, Yeh EA, Katz S, Al-Saleh S, Narang I (2016) ROHHAD syndrome and evolution of sleep disordered breathing. Orphanet J Rare Dis 11:106.
- Resch JM, Maunze B, Phillips KA, Choi S (2014) Inhibition of food intake by PACAP in the hypothalamic ventromedial nuclei is mediated by NMDA receptors. Physiol Behav 133:230-235.
- Resta O, Foschino-Barbaro MP, Bonfitto P, Talamo S, Legari G, De Pergola G, Minenna A, Giorgino R (2000) Prevalence and mechanisms of diurnal hypercapnia in a sample of morbidly obese subjects with obstructive sleep apnoea. Respir Med 94:240-246.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. Endocr Rev 19:3-17.
- Revelli A, Modotti M, Piffaretti-Yanez A, Massobrio M, Balerna M (1994) Steroid receptors in human spermatozoa. Hum Reprod 9:760-766.
- Ribas-Salgueiro JL, Gaytan SP, Ribas J, Pasaro R (2005) Characterization of efferent projections of chemosensitive neurons in the caudal parapyramidal area of the rat brain. Brain ResBull 66:235-248.
- Ribas-Salgueiro JL, Matarredona ER, Ribas J, Pasaro R (2006) Enhanced c-Fos expression in the rostral ventral respiratory complex and rostral parapyramidal region by inhibition of the Na+/H+ exchanger type 3. Autonomic Neuroscience 126-127:347-354.
- Ricardo JA, Koh ET (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. Brain Res 153:1-26.
- Richerson GB (1995) Response to CO2 of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. J Neurophysiol 73:933-944.
- Richerson GB (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. Nat RevNeurosci 5:449-461.
- Richerson GB, Wang W, Hodges MR, Dohle CI, Diez-Sampedro A (2005) Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. Exp Physiol 90:259-266; discussion 266-259.
- Richerson GB, Wang W, Tiwari J, Bradley SR (2001) Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla. RespirPhysiol 129:175-189.
- Richter DW (1982) Generation and maintenance of the respiratory rhythm. J ExpBiol 100:93-107.
- Richter DW, Ballantyne D, Remmers JE (1987) The differential organization of medullary postinspiratory activities. Pflugers Arch 410:420-427.
- Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM (1999) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. J Physiol 514 (Pt 2):567-578.
- Richter DW, Spyer KM (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. Trends Neurosci 24:464-472.
- Rigatto H, Brady JP, de la Torre Verduzco R (1975) Chemoreceptor reflexes in preterm infants: II. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhaled carbon dioxide. Pediatrics 55:614-620.
- Ripley B, Fujiki N, Okura M, Mignot E, Nishino S (2001) Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. Neurobiol Dis 8:525-534.
- Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW (1997) Intracellular pH response to hypercapnia in neurons from chemosensitive areas of the medulla. Am J Physiol 273:R433-441.
- Road JD (1990) Phrenic afferents and ventilatory control. Lung 168:137-149.

- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. J Comp Neurol 499:64-89.
- Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ (1984) Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. J Neurosci 4:474-494.
- Ross CA, Ruggiero DA, Reis DJ (1985) Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. J Comp Neurol 242:511-534.
- Rubin RT, Carroll BJ (2009.) The Neuroendocrinology of Mood Disorders.
- Rudzinski E, Kapur RP (2010) PHOX2B immunolocalization of the candidate human retrotrapezoid nucleus. Pediatr Dev Pathol 13:291-299.
- Runko E, Kaprielian Z (2002) Expression of Vema in the developing mouse spinal cord and optic chiasm. J Comp Neurol 451:289-299.
- Runold M, Lagercrantz H, Prabhakar NR, Fredholm BB (1989) Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. Journal of Applied Physiology 67:541-546.
- Rupprecht R, Holsboer F (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. Trends Neurosci 22:410-416.
- Ryan JW, Waldrop TG (1995) Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. RespirPhysiol 100:185-194.
- Rybak IA, Abdala AP, Markin SN, Paton JF, Smith JC (2007) Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. Prog Brain Res 165:201-220.
- Saaresranta T, Aittokallio T, Utriainen K, Polo O (2005) Medroxyprogesterone improves nocturnal breathing in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 6:28.
- Saether K, Hilaire G, Monteau R (1987) Dorsal and ventral respiratory groups of neurons in the medulla of the rat. Brain Res 419:87-96.
- Saiki C, Mortola JP (1996) Effect of CO2 on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. J Physiol 491 (Pt 1):261-269.
- Sakamoto H, Ukena K, Takemori H, Okamoto M, Kawata M, Tsutsui K (2004) Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell. Neuroscience 126:325-334.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richarson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92:1 page following 696.
- Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC (1999) Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. Brain Res 831:248-253.
- Sant'ambrogio G, Camporesi E (1973) Contribution of various inspiratory muscles to ventilation and the immediate and distant effect of diaphragmatic paralysis. Acta Neurobiol Exp (Wars) 33:401-409.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM (1976) Direct hypothalamo-autonomic connections. Brain Res 117:305-312.
- Sarto-Jackson I, Sieghart W (2008) Assembly of GABA(A) receptors (Review). Mol Membr Biol 25:302-310.
- Sasek CA, Wessendorf MW, Helke CJ (1990) Evidence for co-existence of thyrotropin-releasing hormone, substance P and serotonin in ventral medullary neurons that project to the intermediolateral cell column in the rat. Neuroscience 35:105-119.
- Sato M, Severinghaus JW, Basbaum AI (1992) Medullary CO2 chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. Journal of Applied Physiology 73:96-100.
- Schaltenbrand G, Wahren, W. (1977) Atlas for stereotaxy of the human brain. Stuttgart, New York Thieme.

Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH (2003) Classification and pharmacology of progestins. Maturitas 46 Suppl 1:S7-S16.

- Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH (2008) Classification and pharmacology of progestins. Maturitas 61:171-180.
- Schlaefke ME, Kille JF, Loeschcke HH (1979a) Elimination of central chemosensitivity by coagulation of a bilateral area on the ventral medullary surface in awake cats. Pflugers Arch 378:231-241.
- Schlaefke ME, See WR, Herker-See A, Loeschcke HH (1979b) Respiratory response to hypoxia and hypercapnia after elimination of central chemosensitivity. Pflugers Arch 381:241-248.
- Schlaefke ME, See WR, Loeschcke HH (1970) Ventilatory response to alterations of H+ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. RespirPhysiol 10:198-212.
- Schober W, Fischer W (1991) [The projection of the locus coeruleus and the mesencephalic raphe nuclei to the hippocampal region of the rat: a study with horseradish peroxidase]. J Hirnforsch 32:409-420.
- Schone C, Cao ZF, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Sakurai T, Burdakov D (2012) Optogenetic probing of fast glutamatergic transmission from hypocretin/orexin to histamine neurons in situ. J Neurosci 32:12437-12443.
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE (2007) Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. EndocrRev 28:387-439.
- Schwarzacher SW, Rub U, Deller T (2011) Neuroanatomical characteristics of the human pre-Botzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. Brain 134:24-35.
- Selmin O, Lucier GW, Clark GC, Tritscher AM, Vanden Heuvel JP, Gastel JA, Walker NJ, Sutter TR, Bell DA (1996) Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. Carcinogenesis 17:2609-2615.
- Series F, Demoule A, Marc I, Sanfacon C, Derenne JP, Similowski T (1999) Inspiratory flow dynamics during phrenic nerve stimulation in awake normals during nasal breathing. Am J Respir Crit Care Med 160:614-620.
- Serra A, Brozoski D, Hedin N, Franciosi R, Forster HV (2001) Mortality after carotid body denervation in rats. Journal of Applied Physiology 91:1298-1306.
- Severinghaus JW (1998) Hans Loeschcke, Robert Mitchell and the medullary CO2 chemoreceptors: a brief historical review. Respir Physiol 114:17-24.
- Severinghaus JW, Mitchell RA, Richardson BW, Singer MM (1963) Respiratory control at high altitude suggesting active transport regulation of CSF pH. Journal of Applied Physiology 18:1155-1166. Severinghaus JW. MR (1962) Ondine's curse - failure of respiratory center automaticity while
- awake. In: JClinRes vol. 10.
- Severson CA, Wang W, Pieribone VA, Dohle CI, Richerson GB (2003) Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. Nat Neurosci 6:1139-1140.
- Shahar E, Redline S, Young T, Boland LL, Baldwin CM, Nieto FJ, O'Connor GT, Rapoport DM, Robbins JA (2003) Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing. Am J Respir Crit Care Med 167:1186-1192.
- Shahid IZ, Rahman AA, Pilowsky PM (2012) Orexin and central regulation of cardiorespiratory system. Vitam Horm 89:159-184.
- Shannon DC, Marsland DW, Gould JB, Callahan B, Todres ID, Dennis J (1976) Central hypoventilation during quiet sleep in two infants. Pediatrics 57:342-346.
- Shao XM, Feldman JL (1997) Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. J Neurophysiol 77:1853-1860.

Shea SA (1997) Life without ventilatory chemosensitivity. Respir Physiol 110:199-210.

Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron 4:477-485.

- Shimura R, Tatsumi K, Nakamura A, Kasahara Y, Tanabe N, Takiguchi Y, Kuriyama T (2005) Fat accumulation, leptin, and hypercapnia in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Chest 127:543-549.
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. Am J Physiol 277:R1780-1785.
- Siegel JM (2004) The neurotransmitters of sleep. J Clin Psychiatry 65 Suppl 16:4-7.
- Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012) A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha(+) beta(-) interface. Br J Pharmacol 166:476-485.
- Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr Top Med Chem 2:795-816.
- Silvestri JM W-MD, Berry-Kravis EM (2004) Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2b genotype and sinus pause phenotype [abstract: A263]. Am J Respir Crit Care Med 169.
- Simakajornboon N, Vlasic V, Li H, Sawnani H (2004) Effect of prenatal nicotine exposure on biphasic hypoxic ventilatory response and protein kinase C expression in caudal brain stem of developing rats. Journal of Applied Physiology 96:2213-2219.
- Similowski T, Fleury B, Launois S, Cathala HP, Bouche P, Derenne JP (1989) Cervical magnetic stimulation: a new painless method for bilateral phrenic nerve stimulation in conscious humans. J Appl Physiol (1985) 67:1311-1318.
- Sirvent N, Berard E, Chastagner P, Feillet F, Wagner K, Sommelet D (2003) Hypothalamic dysfunction associated with neuroblastoma: evidence for a new Paraneoplastic syndrome? Med Pediatr Oncol 40:326-328.
- Sitruk-Ware R (2008) Pharmacological profile of progestins. Maturitas 61:151-157.
- Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Lehrach H, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Wanker EE (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. Hum Mol Genet 10:1307-1315.
- Skatrud JB, Dempsey JA, Kaiser DG (1978) Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. JApplPhysiol 44:393-344.
- Slatkovska L, Jensen D, Davies GA, Wolfe LA (2006) Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. RespirPhysiol Neurobiol 154:379-388.
- Sluka KA, Danielson J, Rasmussen L, DaSilva LF (2012) Exercise-induced pain requires NMDA receptor activation in the medullary raphe nuclei. Med Sci Sports Exerc 44:420-427.
- Smith JC, Abdala AP, Rybak IA, Paton JF (2009) Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364:2577-2587.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. Science 254:726-729.
- Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, Otto MR, Feldman JL (1989) Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. J Comp Neurol 281:69-96.
- Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM, Lyons TJ (2008) Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. Steroids 73:1160-1173.
- Solomon IC (2003) Focal CO2/H+ alters phrenic motor output response to chemical stimulation of cat pre-Botzinger complex in vivo. J Appl Physiol (1985) 94:2151-2157.
- Solomon IC, Edelman NH, O'Neal MH, 3rd (2000) CO(2)/H(+) chemoreception in the cat pre-Botzinger complex in vivo. J Appl Physiol (1985) 88:1996-2007.
- Song J, Vinarov D, Tyler EM, Shahan MN, Tyler RC, Markley JL (2004) Hypothetical protein At2g24940.1 from Arabidopsis thaliana has a cytochrome b5 like fold. J Biomol NMR 30:215-218.
- Song M, Messing RO (2005) Protein kinase C regulation of GABAA receptors. Cell Mol Life Sci 62:119-127.
- Song N, Zhang G, Geng W, Liu Z, Jin W, Li L, Cao Y, Zhu D, Yu J, Shen L (2012) Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. PLoSOne 7:e39982.

- Soulier V, Gestreau C, Borghini N, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM, Pequignot JM (1997) Peripheral chemosensitivity and central integration: neuroplasticity of catecholaminergic cells under hypoxia. Comp Biochem Physiol A Physiol 118:1-7.
- Sovik S, Lossius K (2004) Development of ventilatory response to transient hypercapnia and hypercapnic hypoxia in term infants. Pediatr Res 55:302-309.
- Sritippayawan S, Hamutcu R, Kun SS, Ner Z, Ponce M, Keens TG (2002) Mother-daughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. Am J Respir Crit Care Med 166:367-369.
- St-John WM (1998) Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. ProgNeurobiol 56:97-117.
- Stanczyk FZ (2002) Pharmacokinetics and potency of progestins used for hormone replacement therapy and contraception. Rev Endocr Metab Disord 3:211-224.
- Stastna E, Chodounska H, Pouzar V, Kapras V, Borovska J, Cais O, Vyklicky L, Jr. (2009) Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. Steroids 74:256-263.
- Steinbusch HW, Nieuwenhuys R (1981) Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. Adv Exp Med Biol 133:7-35.
- Stella G (1938) On the mechanism of production, and the physiological signifiance of "apneusis". The Journal of Physiology Online 93:10-23.
- Stoffel-Wagner B (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. Eur J Endocrinol 145:669-679.
- Stornetta RL, Guyenet PG (1999) Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. J Comp Neurol 407:367-380.
- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG (2006) Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. Journal of Neuroscience 26:10305-10314.
- Stornetta RL, Rosin DL, Simmons JR, McQuiston TJ, Vujovic N, Weston MC, Guyenet PG (2005) Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and gamma-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. J Comp Neurol 492:477-494.
- Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG (2003) A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex. J Comp Neurol 455:499-512.
- Stornetta RL, Spirovski D, Moreira TS, Takakura AC, West GH, Gwilt JM, Pilowsky PM, Guyenet PG (2009) Galanin is a selective marker of the retrotrapezoid nucleus in rats. J Comp Neurol 512:373-383.
- Straus C, Trang H, Becquemin MH, Touraine P, Similowski T (2010) Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. RespirPhysiol Neurobiol 171:171-174.
- Strohl KP, Hensley MJ, Hallett M, Saunders NA, Ingram RH, Jr. (1980) Activation of upper airway muscles before onset of inspiration in normal humans. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol 49:638-642.
- Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW (2001) Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. Respir Physiol 127:135-155.
- Su J, Wang W, Sun L, Li T, Kong D, Kang J (2014) Raphe serotonergic neurons modulate genioglossus corticomotor activity in intermittent hypoxic rats. Respir Res 15:76.
- Su TP, London ED, Jaffe JH (1988) Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. Science 240:219-221.
- Sugita T, Sakuraba S, Kaku Y, Yoshida K, Arisaka H, Kuwana S (2014) Orexin induces excitation of respiratory neuronal network in isolated brainstem spinal cord of neonatal rat. Respir Physiol Neurobiol 200:105-109.

- Sunanaga J, Deng BS, Zhang W, Kanmura Y, Kuwaki T (2009) CO2 activates orexin-containing neurons in mice. Respir Physiol Neurobiol 166:184-186.
- Suzue T (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. J Physiol 354:173-183.
- Tahir R, Kennedy A, Elsea SH, Dickinson AJ (2014) Retinoic acid induced-1 (Rai1) regulates craniofacial and brain development in Xenopus. Mech Dev 133:91-104.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006a) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats. JPhysiol 572:503-523.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006b) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats 5. J Physiol 572:503-523.
- Takeda M, Matsumoto S (1997) Discharge patterns of dorsal and ventral respiratory group neurons during spontaneous augmented breaths observed in pentobarbital anesthetized rats. Brain Res 749:95-100.
- Takeda S, Eriksson LI, Yamamoto Y, Joensen H, Onimaru H, Lindahl SG (2001) Opioid action on respiratory neuron activity of the isolated respiratory network in newborn rats. Anesthesiology 95:740-749.
- Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. Nat Neurosci 11:538-540.
- Tan W, Sherman D, Turesson J, Shao XM, Janczewski WA, Feldman JL (2012) Reelin demarcates a subset of pre-Botzinger complex neurons in adult rat. J Comp Neurol 520:606-619.
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD (2005) PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. J Mol Evol 61:372-380.
- Tankersley C, Kleeberger S, Russ B, Schwartz A, Smith P (1996) Modified control of breathing in genetically obese (ob/ob) mice. J Appl Physiol (1985) 81:716-723.
- Tappaz ML, Brownstein MJ (1977) Origin of glutamate-decarboxylase (GAD)-containing cells in discrete hypothalamic nuclei. Brain Res 132:95-106.
- Taraborrelli S (2015) Physiology, production and action of progesterone. Acta Obstet Gynecol Scand 94 Suppl 161:8-16.
- Tatsumi K, Mikami M, Kuriyama T, Fukuda Y (1991) Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. J Appl Physiol (1985) 71:37-42.
- Tatsumi K, Moore, L.G., Hannhart, B. (1995) Influences of sex steroids on ventilation and ventilatory control. Marcel Dekker, New York Regulation of Breathing:829/864.
- Tenney SM, Ou LC (1977) Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO2. Respir Physiol 29:81-92.
- Teppema LJ, Berkenbosch A, Veening JG, Olievier CN (1994) Hypercapnia induces c-fos expression in neurons of retrotrapezoid nucleus in cats. Brain Res 635:353-356.
- Teppema LJ, Dahan A (2010) The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. Physiol Rev 90:675-754.
- Teppema LJ, Veening JG, 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. J Comp Neurol 388:169-190.
- Thaker VV, Esteves KM, Towne MC, Brownstein CA, James PM, Crowley L, Hirschhorn JN, Elsea SH, Beggs AH, Picker J, Agrawal PB (2015) Whole exome sequencing identifies RAI1 mutation in a morbidly obese child diagnosed with ROHHAD syndrome. J Clin Endocrinol Metab 100:1723-1730.
- Thannickal TC, Siegel JM, Nienhuis R, Moore RY (2003) Pattern of hypocretin (orexin) soma and axon loss, and gliosis, in human narcolepsy. Brain Pathol 13:340-351.

- Thoby-Brisson M, Cauli B, Champagnat J, Fortin G, Katz DM (2003) Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. J Neurosci 23:7685-7689.
- Thoby-Brisson M, Karlen M, Wu N, Charnay P, Champagnat J, Fortin G (2009) Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex. NatNeurosci 12:1028-1035.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. J Neurophysiol 86:104-112.
- Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M (1999) Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. Spine (Phila Pa 1976) 24:2134-2138.
- Thomas P (2008) Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. Front Neuroendocrinol 29:292-312.
- Thomas P, Pang Y (2012) Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. Neuroendocrinology 96:162-171.
- Thomas P, Pang Y, Dong J (2014) Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. Endocrinology 155:1107-1119.
- Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C (2007) Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. Endocrinology 148:705-718.
- Thomas P, Zhu Y, Pace M (2002) Progestin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. Steroids 67:511-517.
- Thor KB, Helke CJ (1989) Serotonin and substance P colocalization in medullary projections to the nucleus tractus solitarius: dual-colour immunohistochemistry combined with retrograde tracing. J ChemNeuroanat 2:139-148.
- Tian GF, Duffin J (1998) The role of dorsal respiratory group neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. ExpBrain Res 121:29-34.
- Timmer CJ, Srivastava N, Dieben TO, Cohen AF (1999) Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: Cerazette and Liseta. EurJDrug Metab Pharmacokinet 24:335-343.
- Tiveron MC, Hirsch MR, Brunet JF (1996) The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. J Neurosci 16:7649-7660.
- Trang H, Boureghda S, Denjoy I, Alia M, Kabaker M (2003) 24-hour BP in children with congenital central hypoventilation syndrome. Chest 124:1393-1399.
- Trang H, Brunet JF, Rohrer H, Gallego J, Amiel J, Bachetti T, Fischbeck KH, Similowski T, Straus C, Ceccherini I, Weese-Mayer DE, Frerick M, Bieganowska K, Middleton L, Morandi F, Ottonello G, European Central Hypoventilation Syndrome C (2014) Proceedings of the fourth international conference on central hypoventilation. Orphanet J Rare Dis 9:194.
- Trang H, Dehan M, Beaufils F, Zaccaria I, Amiel J, Gaultier C (2005) The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: general data, phenotype, and genotype. Chest 127:72-79.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev 62:405-496.
- Trochet D, Hong SJ, Lim JK, Brunet JF, Munnich A, Kim KS, Lyonnet S, Goridis C, Amiel J (2005) Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. Hum Mol Genet 14:3697-3708.
- Trulson ME, Jacobs BL (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. Brain Res 163:135-150.

- Tupone D, Madden CJ, Cano G, Morrison SF (2011) An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. J Neurosci 31:15944-15955.
- Umezawa N, Arisaka H, Sakuraba S, Sugita T, Matsumoto A, Kaku Y, Yoshida K, Kuwana S (2015) Orexin-B antagonized respiratory depression induced by sevoflurane, propofol, and remifentanil in isolated brainstem-spinal cords of neonatal rats. Respir Physiol Neurobiol 205:61-65.
- Valera S, Ballivet M, Bertrand D (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 89:9949-9953.
- van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB (1998) Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. J Neurosci 18:7962-7971.
- Vanderlaan M, Holbrook CR, Wang M, Tuell A, Gozal D (2004) Epidemiologic survey of 196 patients with congenital central hypoventilation syndrome. Pediatr Pulmonol 37:217-229.
- Veasey SC, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL (1995) Response of serotonergic caudal raphe neurons in relation to specific motor activities in freely moving cats. J Neurosci 15:5346-5359.
- Veasey SC, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL (1997) Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. Neuroscience 79:161-169.
- Vercellini P, Bracco B, Mosconi P, Roberto A, Alberico D, Dhouha D, Somigliana E (2016) Norethindrone acetate or dienogest for the treatment of symptomatic endometriosis: a before and after study. Fertil Steril 105:734-743 e733.
- Verhoeven CH, Gloudemans RH, Peeters PA, van Lier JJ, Verheggen FT, Groothuis GM, Rietjens IM, Vos RM (2001) Excretion and metabolism of desogestrel in healthy postmenopausal women. J Steroid Biochem Mol Biol 78:471-480.
- Verhoeven CH, Krebbers SF, Wagenaars GN, Vos RM (1998) In vitro and in vivo metabolism of desogestrel in several species. Drug Metab Dispos 26:927-936.
- Verner TA, Pilowsky PM, Goodchild AK (2008) Retrograde projections to a discrete apneic site in the midline medulla oblongata of the rat. Brain Res 1208:128-136.
- Vertes RP, Crane AM (1996) Descending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: Phaseolus vulgaris leucoagglutinin analysis in the rat. J Comp Neurol 374:607-631.
- Vibert JF, Caille D, Bertrand F, Gromysz H, Hugelin A (1979) Ascending projection from the respiratory centre to mesencephalon and diencephalon. NeurosciLett 11:29-33.
- Vicente MC, Dias MB, Fonseca EM, Bicego KC, Gargaglioni LH (2016) Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO2 ventilatory response. Pflugers Arch 468:763-774.
- Viemari JC (2008) Noradrenergic modulation of the respiratory neural network. Respir Physiol Neurobiol 164:123-130.
- Viemari JC, Bevengut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC, Hilaire G (2004a) Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. J Neurosci 24:928-937.
- Viemari JC, Bevengut M, Coulon P, Hilaire G (2004b) Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. J Neurophysiol 91:746-758.
- Viemari JC, Ramirez JM (2006) Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and non-pacemaker neurons. Journal of Neurophysiology 01308.
- Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Pena F, Zanella S, Bevengut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L, Hilaire G (2005) Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. J Neurosci 25:11521-11530.
- Vizek M, Pickett CK, Weil JV (1987) Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin. JApplPhysiol 63:1658-1664.
- Voituron N, Frugiere A, Champagnat J, Bodineau L (2006) Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. J Physiol 577:55-68.
- Voituron N, Frugiere A, Gros F, Macron JM, Bodineau L (2005) 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.

- Voituron N, Frugiere A, Mc Kay LC, Romero-Granados R, Dominguez-del-Toro E, Saadani-Makki F, Champagnat J, 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.
- Von Euler C (1986) Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In: Handbook of physiology, the respiratory system Volume 2: Control of breathing (Cherniack, N. S. and Widdicombe, J. G., eds), pp 1-67: Am. Physiol. Soc.
- von Euler C, Hayward JN, Marttila I, Wyman RJ (1973) Respiratory neurones of the ventrolateral nucleus of the solitary tract of cat: vagal input, spinal connections and morphological identification. Brain Res 61:1-22.
- Von Euler US, Pernow B (1956) Neurotropic effects of substance P. Acta Physiol Scand 36:265-275.
- Wagenaar M, Teppema LJ, Berkenbosch A, Olievier CN, Folgering HT (2000) Medroxyprogesterone acetate with acetazolamide stimulates breathing in cats. Respir Physiol 119:19-29.
- 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. Respir Physiol Neurobiol 215:64-72.
- Waldrop TG (1991) Posterior hypothalamic modulation of the respiratory response to CO2 in cats. Pflugers Arch 418:7-13.
- Waldrop TG, Mullins DC, Henderson MC (1986) Effects of hypothalamic lesions on the cardiorespiratory responses to muscular contraction. RespirPhysiol 66:215-224.
- Waldrop TG, Porter JP (1995) Hypothalamic involvement in respiratory and cardiovascular regulation. In: Regulation of breathing (Dempsey, J. A. and Pack, A. I., eds), pp 315-364 New York: Marcel Dekker.
- Waldvogel HJ, Faull RL (2015) The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. Adv Pharmacol 73:223-264.
- Walker DW (1995) Hypoxic inhibition of breathing and motor activity in the foetus and newborn. Clin Exp Pharmacol Physiol 22:533-536.
- Walker DW, Lee B, Nitsos I (2000) Effect of hypoxia on respiratory activity in the foetus. Clin Exp Pharmacol Physiol 27:110-113.
- Wallen-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, Nygard A, Enjin A, Fujiyama F, Fortin G, Kullander
  K (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm
  generation but not for locomotor central pattern generation. J Neurosci 26:12294-12307.
- Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG (2001a) Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. J Comp Neurol 434:128-146.
- Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bevengut M, Penton D, Guyenet PG, Lesage F, Gestreau C, Barhanin J, Bayliss DA (2013a) TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. J Neurosci 33:16033-16044.
- Wang W, Li Q, Pan Y, Zhu D, Wang L (2013b) Influence of hypercapnia on the synthesis of neuropeptides and their receptors in murine brain. Respirology 18:102-107.
- Wang W, Pizzonia JH, Richerson GB (1998) Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. J Physiol 511 (Pt 2):433-450.
- Wang W, Richerson GB (1999) Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. Neuroscience 90:1001-1011.
- Wang W, Tiwari JK, Bradley SR, Zaykin RV, Richerson GB (2001b) Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. J Neurophysiol 85:2224-2235.
- Wang W, Zhong Q, Teng L, Bhatnagar N, Sharma B, Zhang X, Luther W, 2nd, Haynes LP, Burgoyne RD, Vidal M, Volchenboum S, Hill DE, George RE (2014) Mutations that disrupt PHOXB interaction with the neuronal calcium sensor HPCAL1 impede cellular differentiation in neuroblastoma. Oncogene 33:3316-3324.

- Washburn CP, Sirois JE, Talley EM, Guyenet PG, Bayliss DA (2002) Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K+ conductance. J Neurosci 22:1256-1265.
- Watson CS, Gametchu B (1999) Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. Proc Soc Exp Biol Med 220:9-19.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH (2000) Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. J Pharmacol Exp Ther 293:747-754.
- Webb TI, Lynch JW (2007) Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. Curr Pharm Des 13:2350-2367.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM (2004) Genetics of congenital central hypoventilation syndrome: lessons from a seemingly orphan disease. AmJ RespirCrit Care Med 170:16-21.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA, Trang H (2010a) An official ATS clinical policy statement: Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. AmJRespirCrit Care Med 181:626-644.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA, Trang H, Subcommittee ATSCCHS (2010b) An official ATS clinical policy statement: Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. Am J Respir Crit Care Med 181:626-644.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L (2005) Adult identified with congenital central hypoventilation syndrome--mutation in PHOX2b gene and late-onset CHS. AmJ RespirCrit Care Med 171:88.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML (2003) Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. AmJ MedGenetA 123:267-278.
- Weese-Mayer DE, Hunt CE, Brouillette RT, Silvestri JM (1992a) Diaphragm pacing in infants and children. J Pediatr 120:1-8.
- Weese-Mayer DE, Silvestri JM, Marazita ML, Hoo JJ (1993) Congenital central hypoventilation syndrome: inheritance and relation to sudden infant death syndrome. Am J Med Genet 47:360-367.
- Weese-Mayer DE, Silvestri JM, Menzies LJ, Morrow-Kenny AS, Hunt CE, Hauptman SA (1992b) Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis, management, and long-term outcome in thirty-two children. J Pediatr 120:381-387.
- Wenker IC, Kreneisz O, Nishiyama A, Mulkey DK (2010) Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H+ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. J Neurophysiol 104:3042-3052.
- Weston MC, Stornetta RL, Guyenet PG (2004) Glutamatergic neuronal projections from the marginal layer of the rostral ventral medulla to the respiratory centers in rats. J Comp Neurol 473:73-85.
- Wetzel CH, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Zieglgansberger W, Holsboer F, Rupprecht R (1998) Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. Mol Endocrinol 12:1441-1451.
- Williams RH, Jensen LT, Verkhratsky A, Fugger L, Burdakov D (2007) Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO2. Proc Natl Acad Sci U S A 104:10685-10690.
- Wong-Riley MT, Liu Q (2005) Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. Respir Physiol Neurobiol 149:83-98.
- Woo MS, Woo MA, Gozal D, Jansen MT, Keens TG, Harper RM (1992) Heart rate variability in congenital central hypoventilation syndrome. Pediatr Res 31:291-296.
- Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL, Kelly JE (1986) Inputs to the pontine A5 noradrenergic cell group: a horseradish peroxidase study. Exp Neurol 94:782-787.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH (1990) Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. Mol Pharmacol 37:597-602.

- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. Mol Pharmacol 40:333-336.
- Wu MF, John J, Boehmer LN, Yau D, Nguyen GB, Siegel JM (2004) Activity of dorsal raphe cells across the sleep-waking cycle and during cataplexy in narcoleptic dogs. J Physiol 554:202-215.
- Yamaguchi K FT, Ushikai J, Kuroki C, Minami T, Kakihana Y, and Kuwaki T. (2015) Intermittent but not sustained hypoxia activates orexin-containing neurons in mice. Respiratory physiology & neurobiology 206:11-14.
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, 3rd, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature 334:494-498.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003a) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. Neuron 38:701-713.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2003b) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. Biochem Biophys Res Commun 303:120-129.
- Yang JJ, Chou YC, Lin MT, Chiu TH (1997) Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in rat locus coeruleus neurons. Life Sci 61:1763-1773.
- Yanovsky Y, Zigman JM, Kernder A, Bein A, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Haas HL, Sergeeva OA (2012) Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. Front Syst Neurosci 6:23.
- Yee BJ, Cheung J, Phipps P, Banerjee D, Piper AJ, Grunstein RR (2006) Treatment of obesity hypoventilation syndrome and serum leptin. Respiration 73:209-212.
- Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC, Haxhiu MA (1997) The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. NeurosciLett 232:63-66.
- Yelnik J, Bardinet E, Dormont D, Malandain G, Ourselin S, Tande D, Karachi C, Ayache N, Cornu P, Agid Y (2007) A three-dimensional, histological and deformable atlas of the human basal ganglia. I.
  Atlas construction based on immunohistochemical and MRI data. Neuroimage 34:618-638.
- Young JK, Wu M, Manaye KF, Kc P, Allard JS, Mack SO, Haxhiu MA (2005) Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. J Appl Physiol (1985) 98:1387-1395.
- Yu SY, Wang GM, Wang H, Zhang H, Li Q (2011) Raphe pallidus modulates Botzinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rats. Eur J Neurosci 34:1113-1120.
- Zanella S, Roux JC, Viemari JC, Hilaire G (2005) Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. RespirPhysiol Neurobiol.
- Zhang L, Wilson CG, Liu S, Haxhiu MA, Martin RJ (2003) Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. Respir Physiol Neurobiol 136:25-37.
- Zhang W, Fukuda Y, Kuwaki T (2005a) Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. Neurosci Lett 385:131-136.
- Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2005b) Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289:R1338-1347.
- Zhao ZQ, Scott M, Chiechio S, Wang JS, Renner KJ, Gereau RWt, Johnson RL, Deneris ES, Chen ZF (2006) Lmx1b is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. J Neurosci 26:12781-12788.
- Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR (2005) Orexin-A projections to the caudal medulla and orexininduced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. J Comp Neurol 485:127-142.
- Zheng Y, Barillot JC, Bianchi AL (1991) Patterns of membrane potentials and distributions of the medullary respiratory neurons in the decerebrate rat. Brain Res 546:261-270.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 100:2237-2242.
- Zrinzo L, Zrinzo LV, Tisch S, Limousin PD, Yousry TA, Afshar F, Hariz MI (2008) Stereotactic localization of the human pedunculopontine nucleus: atlas-based coordinates and validation of a magnetic resonance imaging protocol for direct localization. Brain 131:1588-1598.

- Zuloaga DG, Yahn SL, Pang Y, Quihuis AM, Oyola MG, Reyna A, Thomas P, Handa RJ, Mani SK (2012) Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor-beta in the female rat brain. Endocrinology 153:4432-4443.
- Zwillich CW, Natalino MR, Sutton FD, Weil JV (1978) Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. J Lab Clin Med 92:262-269.

ANNEXES
# Construction d'un atlas numérique tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain localisant les structures respiratoires

Cette partie traite du travail réalisé en collaboration avec le Docteur Carine Karachi de l'équipe du Docteur Brian LAU (Neurochirurgie expérimentale, U1127-INSERM/UMR-7225 CNRS/Université Pierre et Marie Curie) à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM). L'objectif de cette étude est de développer un atlas numérique, histologique, tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain, visant à cartographier les structures qui contrôlent la respiration, en combinant des techniques d'imagerie et d'histologie. En effet, par analogie avec les données animales qui ont caractérisé les structures respiratoires du tronc cérébral via les neurotransmetteurs qu'elles expriment (Stornetta et al., 2003, Li and Nattie, 2006, Guyenet and Mulkey, 2010, Hilaire et al., 2010), il est devenu possible d'identifier précisément ces structures chez l'Homme grâce à l'immunohistochimie (Stornetta et al., 2003, Li and Nattie, 2006, Kinney et al., 2007, Guyenet and Mulkey, 2010, Hilaire et al., 2010, Schwarzacher et al., 2011, Lavezzi et al., 2012, Nobuta et al., 2015). Chacune des coupes histologiques est ensuite été numérisée et les contours qui délimitent précisément les structures sont tracés. D'une façon générale cet atlas devrait permettre de localiser des structures respiratoires de tout patient ayant réalisé un examen d'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Ce travail revêt une importance toute particulière pour les patients ayant des troubles respiratoires et pour lesquels l'origine de ces troubles ne peut être expliquée du fait du manque de définition anatomique des IRM et de l'imprécision des atlas existants, aussi bien histologiques que numériques quant aux structures contrôlant la commande respiratoire (Olszewski, 1954, Schaltenbrand, 1977, Afshar, 1978, Nieuwenhuys, 1978, Paxinos, 1995, Zrinzo et al., 2008, Aggarwal et al., 2013). En effet, les atlas histologiques ont été construits, à partir de méthodes de colorations qui ne permettent pas d'identifier des populations cellulaires de par leurs caractéristiques en termes de messager chimique ou de récepteur et à partir de coupes histologiques souvent trop espacées les unes des autres ne permettant pas de localiser précisément les structures cibles (Olszewski, 1954, Schaltenbrand, 1977, Afshar, 1978, Nieuwenhuys, 1978, Paxinos, 1995, Zrinzo et al., 2008, Aggarwal et al., 2013). Par ailleurs les atlas numériques, basés sur l'acquisition de données IRM ou de tractographie présentent une qualité d'image excellente sans pour autant offrir une délimitation précise des groupes de neurones de la formation réticulée.

De façon plus précise, la construction de cet atlas s'inscrit dans ce travail doctoral. La délimitation des frontières anatomiques *via* l'immunohistochimie des principales structures contrôlant et régulant la CCR devrait permettre de déterminer si l'absence d'amélioration de la ventilation de certaines patientes CCHS sous désogestrel (*cf* : *Introduction, Chapitre 4, III.1.1- Effet des systèmes progestéronergiques chez l'Homme*), dépend de dommages neuronaux localisés au sein des structures respiratoires du tronc cérébral. En effet, il a été montré que certaines patientes CCHS présentent une récupération de la chémosensibilité sous désogestrel tandis que d'autres semblent insensibles au progestatif (Li, 2013) (données

non publiées du laboratoire<sup>6</sup>). En effet, des données de la littérature suggèrent que les patients CCHS présentent des épisodes hypoxiques associés à la pathologie occasionnant des dommages neuronaux dans diverses structures de l'encéphale (Huang et al., 2008, Harper et al., 2014). Une des hypothèses de travail formulées au sein de notre unité de recherche est que les patientes CCHS résistantes au désogestrel présentent un ou plusieurs dommages de ce type et que ce ou ces dommages soient à l'origine de la non-récupération sous désogestrel de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  (Harper et al., 2014). Cette partie du travail doctoral vise donc à valider ou invalider cette hypothèse au travers de la construction d'un outil indispensable à cette démarche.

# I- Les étapes de construction de l'atlas numérique tridimensionnel et déformable

L'atlas numérique tridimensionnel et déformable du tronc cérébral a pour ambition de pouvoir recaler l'IRM d'un patient afin d'identifier précisément la localisation d'éventuelles lésions. Pour parvenir à créer cet « outil », différentes étapes sont nécessaires : acquisition d'images en IRM et détection par immunohistochimie de différents marqueurs phénotypiques afin de visualiser les groupes neuronaux d'intérêt. Ces étapes sont donc menées sur des troncs cérébraux de sujets décédés. A l'heure actuelle 4 tronc cérébraux ont été utilisés, les deux premiers ont servis à la mise au point des marquages immunohistochimiques et pour définir les conditions d'acquisitions des images IRM, le troisième et le quatrième tronc cérébral servent à la réalisation de l'atlas à proprement parlé.

La première étape de la construction de l'atlas consistait à obtenir des informations anatomiques précises en procédant à des acquisitions IRM à hauts champs potentiels à 3 et 11,7 Tesla (T) (Figure 39). De l'imagerie de diffusion traitée par tractographie permettant de visualiser les faisceaux de fibres sera également annexée à l'atlas (Zrinzo et al., 2008, Aggarwal et al., 2013). Le couplage de ces techniques d'acquisitions permet d'obtenir des images de très haute résolution pertinentes sur le plan anatomo-fonctionnel. Lors de la deuxième étape, des photographies ont été prises pendant la découpe du tronc cérébral et ont ensuite été superposées et alignées pour construire, grâce à un algorithme de recalage géométrique, une représentation en 3D qui constitue le volume de référence pour l'histologie et le recalage avec les images IRM. La troisième étape comprend la réalisation de détections immunohistochimiques permettant de caractériser chacune des structures d'intérêts. Chacune des coupes histologiques a été numérisée. Sur l'image obtenue l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'images permet de tracer les contours qui délimitent précisément les structures. Ces contours sont alors alignés sur la coupe photographique correspondante. Ensuite, des recalages 3D permettent de ramener dans un même espace le volume 3D de référence comprenant les données histologiques et les acquisitions IRM. L'ensemble (images IRM anatomique et de diffusion, représentation 3D à partir des photographies prises lors de la découpe et les délimitations sur les coupes histologiques) constitue l'atlas anatomo-

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> L'essai clinique « RespirOndine » (NCT01243697) a été mis en place en 2010 par le Pr Christian Straus, directeur adjoint de l'UMR\_S 1158, chef du service central d'explorations fonctionnelles respiratoires à l'hôpital de La Pitié Salpêtrière et responsable de la branche adulte du centre de référence du syndrome d'Ondine

fonctionnel du tronc cérébral. Enfin, une stratégie de déformation de cet atlas a été développée de manière à ce qu'il s'adapte par recalage IRM-IRM et permettre de visualiser les informations histologiques et anatomiques directement sur l'IRM d'un patient (Bardinet et al., 2009). Cet atlas adaptable à l'anatomie de chaque patient, devrait permettre de cibler avec une précision millimétrique les structures du tronc cérébral contrôlant la respiration.



Figure 39 : Représentation schématique des étapes de la construction de l'atlas numérique tridimensionnel et déformable du tronc cérébral humain.

# II- Obtention du tronc cérébral et fixation des tissus

Les troncs cérébraux obtenus avec le consentement préalable des personnes (critère d'exclusion : la présence de maladie neurologique et psychiatrique) ont été prélevés avec un délai *post mortem* inférieur à 36H au département d'anatomie de l'école de chirurgie du Fer à Moulin par le Dr Carine Karachi et utilisés conformément aux lois éthiques institutionnelles en vigueur relatives à l'utilisation des tissus humains pour la recherche (*National Consultative Ethics Comittee for Health and Life Science*).

Une fois prélevé, les spécimens ont été immédiatement immergés dans une solution de fixation contenant 4% de PFA et de l'acide picrique (10%). Ils ont alors été transférés sur la plateforme d'histologie humaine de l'ICM où ils ont été immergés dans la même solution et placés sur une table basculante à 4°C (Figure 40). Après 24H, la solution a été enrichie avec du sucrose à 5%. Les tissus ont ensuite été placés après 48H et 96H dans une solution de fixation supplémentée à 10 et 20% de sucrose respectivement. Après ces 7 jours de fixation, les troncs cérébraux sont rincés par immersion 24H dans une solution de phosphate buffer (Bardinet et al.) 0,1M avec 20% de sucrose. Puis la concentration de sucrose a été augmentée à 30% et du

gadolinium à 0,5% a été ajouté (gadoterade meglumine, Laboratoire Guerbet). Les troncs cérébraux sont restés 72H dans cette solution avant de procéder aux acquisitions IRM.



Figure 40 : Photographie prise du troisième tronc cérébral (face dorsal) après fixation.

Le gadolinium, un composé métallique qu'on appelle aussi chélates de gadolinium est un produit de contraste couramment utilisé en imagerie aux propriétés ferromagnétiques qui permettent d'augmenter le signal émis. Juste avant la première acquisition des images IRM, les troncs cérébraux fixés et cryoprotégés sont placés dans un récipient IRM-compatible (matière plastique, forme cylindrique, longueur 6,5 cm, largeur 5,3 cm, volume = 130 mL), contenant une solution de Fluorinert (Sigma Aldrich,Saint-Quentin Fallavier, France). Le Fluorinert est un fluide à la texture huileuse utilisé comme isolant électrique et caloporteur et qui a la particularité de ne pas contenir d'hydrogène. Le fait de faire l'acquisition dans ce fluide, qui ne génère aucun signal IRM, permet de diminuer l'intensité de signal non-spécifique généré par les propriétés aqueuses de la solution de sucrose. A noter qu'il est important que le récipient rempli de Fluorinert contenant le tronc cérébral soit totalement dépourvu de bulle d'air.

# III - Acquisition des images en IRM

# III.1.- Principe de l'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie couramment utilisée en clinique qui permet d'obtenir, de façon non invasive des images tridimensionnelles et en coupes, contrastées et de bonne résolution, de tout type de tissus biologiques explorés. La mise au point de cette technique a valu à Paul Lauterbur et Peter Mansfield le prix Nobel de médecine en 2003. Brièvement, lors de l'acquisition d'image IRM les tissus sont soumis à un champ magnétique puissant et stable, ce qui permet en se basant sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire des atomes d'hydrogène (<sup>1</sup>H constitué d'un noyau portant une seule charge positive), d'identifier la nature d'un tissu biologique. Le signal reçu est généralement analysé selon deux paramètres. Premièrement, le temps de relaxation longitudinal (T1) c'està-dire le temps que mettent les moments magnétiques nucléaires des atomes d'hydrogène à revenir dans l'axe longitudinal. Deuxièmement le temps de relaxation transversale (T2) qui correspond au temps de disparition de l'aimantation transversale. Les cinétiques de ces variables dépendent de la mobilité des molécules d'eau ou des molécules organiques où sont engagés les noyaux d'hydrogène et sont donc en lien avec la nature histologique et cellulaire du tissu considéré. En modifiant les paramètres d'acquisition on peut effectuer des pondérations dites en T1 ou en T2, ce qui offre la possibilité de faire varier les contrastes au regard du tissu que l'on veut explorer et de différencier la substance blanche de la substance grise et du liquide céphalo-rachidien pour mettre en évidence à la fois des lésions mécaniques, inflammatoires, infectieuses ou tumorales.

# III.2- Acquisition des images anatomiques et de diffusions

Les IRM anatomiques et de diffusions, ont été réalisées à l'ICM par le Dr Mathieu Santin. Une première acquisition, comparable à celle utilisée chez les patients, a été faite à 3T (Siemens Prisma) pendant 13H30 et a permis d'obtenir la séquence anatomique en T1. Cette étape a été immédiatement suivie par une acquisition IRM à 11,7T (Brucker) pendant 8H, toujours dans du Fluorinert, afin d'effectuer la séquence anatomique T2\*, puis les troncs cérébraux ont été soumis à la séquence de diffusion spin echo pendant 48H (Figure 39).

# IV- Investigations anatomiques et immunohistochimiques

# IV.1- Découpe du tissu

Après l'acquisition des images IRM, les tissus ont été progressivement refroidis pour être congelés et conservés jusqu'au jour de leur découpe. Ils ont ainsi été transférés de 37°C (température à l'intérieur de la machine IRM) à 4°C, puis -20°C et enfin placés dans la neige carbonique à -78°C pour être placés dans un congélateur à -80°C. La découpe au microtome à congélation (Tetrander, Richert-Jung, Heidelberg) a été réalisée perpendiculairement à l'axe du 4<sup>ième</sup> ventricule *i.e.* parallèle à la ligne ponto-mésencéphalique. Les coupes de 50 µM sont collectées dans 6 boites multipuits (Raaco), soit 100 puits en tout, contenant du PBS 0,1M supplémentée en azide de sodium à 0,4 % (Carl Roth GmbH). Un appareil photo (Nikon D-90) avec déclencheur à distance a été fixé sur une potence au-dessus du tronc cérébral. Avant chaque coupe, une photo du tronc cérébral a été prise de façon à ce que soit visible les repères placés de part et d'autre du tronc cérébral. Ces repères sont constitués de deux doubles décimètres et sont indispensables pour construire la représentation en 3D à partir des photographies.

# IV.2- Coloration Nissl et Luxol

En plus des protocoles d'immunomarquage, il a été entrepris de réaliser des colorations histologiques : la coloration Nissl et coloration de la myéline à l'aide du Luxol fast blue, illustrant la distribution respectivement des corps cellulaires et des faisceaux de fibres. Chacune des deux colorations des coupes ont été réalisées à intervalle régulier : toutes les 20 coupes et donc tous les 1000  $\mu$ M, le long du tronc cérébral, afin d'obtenir pour chaque niveau une représentation de la morphologie et de l'anatomie.

Le colorant utilisé dans la coloration de Nissl, le crésyl violet, lie les composés basophiles tels que la molécule d'ADN ou d'ARN permettant ainsi la visualisation au microscope des organites les contenant, en particulier le noyau. La coloration a été effectuée en mettant les coupes en présence d'une solution d'eau déminéralisée contenant du crésyl violet à 1% (C-1893, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et de l'acide acétique à 10% (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), selon les étapes décrites dans le tableau 3. Cette coloration a notamment permis de localiser des structures du tronc cérébral n'ayant pas besoin d'une caractérisation par immunohistochimie comme les olives supérieures et inférieures.

Etapes	Solutions	Durée		
Post-fixation	PF4%	12H sous légère agitation		
Déshydratation	Ethanol 70%	10 min		
Rinçage	Eau distillée	5 min		
Coloration	Solution de coloration de Nissl	3-5 min		
Rinçage	Eau distillée	1 min		
Déshydratation	Ethanol 70%	1 min		
	Ethanol 95% (supplémentée en acide acétique 10%)	1 min		
	Ethanol 95%	1 min		
	Ethanol 100%	2 x 1 min		
Eclaircissement	Xylène	2 x 5 min		

Tableau 3 : Tableau récapitulant les étapes successives d'une coloration Nissl.

Le colorant utilisé dans la coloration Luxol fast blue (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), a quant à lui une affinité pour les lipoprotéines. Il est couramment utilisé pour mettre en évidence les gaines de myéline et donc une importante proportion de fibres nerveuses. La coloration a été réalisée avec une solution préalablement chauffée à 56°C de Luxol fast blue 0,1% mis en solution dans d'éthanol 95% supplémenté en acide acétique glacial à 0,5%. Après l'étape de coloration, une étape dite de différenciation est nécessaire. Cette dernière permet de différencier la substance grise de la substance blanche. Pour cela la coupe

est mise en présence d'une solution de carbonate de lithium 0,025% dans de l'eau déminéralisée. Les étapes décrites dans le tableau 4 ont été respectées.

Etapes	Solutions	Durée	
Post-fixation	PF4%	9Н	
Rinçage	PBS 0,1M	30 sec	
Déshydratation	Ethanol 95%	30 sec	
Coloration	Solution de coloration Luxol fast blue	12H à 56°C	
Déshydratation	Ethanol 95%	1 min	
Rinçage	Eau distillée	1 min	
Différenciation	Carbonate de lithium	30 sec	
	Ethanol 70%	30 sec	
Rinçage	Eau distillée	1 min	
Déshydratation	Ethanol 95%	5 min	
	Ethanol 100%	2 x 5 min	
Eclaircissement	Xylène	2 x 5 min	

# Tableau 4 : Tableau récapitulant les étapes successives pour effectuer unecoloration Luxol Fast blue.

Cette coloration a permis de tracer les contours de différents faisceaux de fibres tels que : le tractus pyramidal, le lemnisque médian, le faisceau longitudinal médian, le pédoncule cérébelleux inferieur, le faisceau facial et le faisceau de l'hypoglosse.

# IV.3- Protocole d'immunomarquage

En nous basant sur les données de la littérature nous avons sélectionné différents marqueurs correspondant aux structures contrôlant la CCR du tronc cérébral que nous voulions caractériser (Tableau 5). Nous avons également utilisé le fait que certaines structures sont caractérisées par la non-expression d'un marqueur donné. En plus des repères anatomiques, comme les olives supérieures, le noyau ambigu et le noyau du nerf facial ont été marqués et ont pu servir de structure repère. Ainsi, nous avons choisis, pour les neurones du préBotz, de marquer NK1R, le marqueur communément admis pour définir anatomiquement la région du préBotz, et la SST qui permet caractériser un contingent de neurones parmi les neurones NK1R-positifs, essentiels à l'activité de l'oscillateur (Stornetta et al., 2003, Schwarzacher et al., 2011). Par ailleurs la TH, et la ChAT ont été détectées afin de discriminer respectivement les neurones du préBotz des neurones adrénergiques C1 et du noyau ambigu adjacents (Schwarzacher et al., 2011). Le noyau RTN/pFRG a été caractérisé par

l'expression de NK1R et par analogie avec les données animales, par l'expression du transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate (Guyenet and Mulkey, 2010, Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012). A noter que les neurones du noyau rétrotrapézoïde ont aussi été décrits par le fait d'être négatifs pour la TH (Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012). Malgré nos efforts exhaustifs, leur caractérisation aussi bien par à un anticorps anti-PHOX2B commercial (sc-13226, Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) que par un anticorps fourni par le Dr Jean-François Brunet (ENS Biologie, Paris) n'ont pas été assez convaincante pour être utilisées, nous avons donc employé la stratégie décrite ci-dessus. Les groupements sérotoninergiques à savoir, les noyaux du ROb, RPa, RMg ainsi que le noyau arqué bulbaire (qui correspond au groupe parapyramidal chez le rongeur) ont été caractérisés *via* la détection de la sérotonine (Kinney et al., 2007, Hilaire et al., 2010). Tandis que les structures majoritairement catécholaminergiques : le cNTS, mNTS et le locus coeruleus ont été identifiés par le fait qu'ils expriment la TH (Li and Nattie, 2006, Nobuta et al., 2015). La ChAT a été utilisée pour marquer les noyaux contenant des motoneurones comme le noyau ambigu, le noyau de l'hypoglosse, mais aussi le noyau moteur dorsal du nerf vague et le noyau facial.

	NK1R	SST	тн	vGLUT2	5-HT	ChAT	Nissl
Noyau de l'hypoglosse	-	-	-	-	-	+	+
Noyau Ambigu	-	-	-	-	-	+	+
Noyau tractus solitaire commissural et médian	-	-	+	-	-	-	+
Noyau moteur dorsal du nerf vague	-	-	-	-	-	+	+
Raphés Obscurus, Pallidus et Magnus	-	-	-	-	+	-	+
Complexe de pré-Bötzinger	+	+	-	-	-	-	+
Noyau arqué	-	-	-	-	+	-	+
Noyau tractus solitaire ventrolatéral	-	-	-	-	-	-	+
Noyau facial	-	-	-	-	-	+	+
Noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial	+	-	-	+	-	-	+
Locus Coeruleus	-	-	+	-	-	-	+

Tableau 5 : Tableau récapitulant les structures respiratoires et les antigènes ou colorations utilisés pour les caractériser.

Chacune des structures listées dans ce tableau est caractérisée par le fait d'être immunoréactive (+) ou non (-) pour chaque marqueur ou coloration donné. Par analogie avec les données animales on attribue aux structures ci-après, décrites chez l'Homme, un rôle dans l'élaboration d'une CCR adaptée : le complexe de pré-Bötzinger (Smith et al., 1991, Schwarzacher et al., 2011), le noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (Smith et al., 1989, Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi et al., 2012), le noyau du tractus solitaire ventrolatéral (Bianchi, 1971, Davies and Edwards, 1973), les noyaux du raphé Obscurus, Pallidus et Magnus et le noyau arqué bulbaire (le noyau arqué bulbaire chez l'Homme correspond au groupe parapyramidal chez le rongeur) qui constituent les groupements sérotoninergiques (Kinney et al., 2007, Hilaire et al., 2010), les structures catécholaminergiques comme le noyau tractus solitaire commissural et médian et le locus coeruleus (Finley and Katz, 1992, Furusawa et al., 1996, Li and Nattie, 2006, Nobuta et al., 2015). Des structures associées à la CCR ont également fait l'objet d'investigations : le noyau moteur dorsal du nerf vague (Nobuta et al., 2015), le noyau de l'hypoglosse qui contribue à l'ouverture et à la stabilité des voies aériennes supérieures, le noyau ambigu qui contient les motoneurones laryngés et pharyngés impliqués dans la déglutition (Bieger and Hopkins, 1987, Schwarzacher et al., 2011). Enfin le noyau facial a été détecté afin de

pouvoir repérer le noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (Rudzinski and Kapur, 2010, Lavezzi and Matturri, 2012, Lavezzi et al., 2012). Abréviations : NK1R : récepteur neurokinine 1 à la substance P, SST : somastostatine, TH : tyrosine hydroxylase, vGLUT2 : transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate, 5-HT : 5 hydroxyryptophane, ChAT : choline acétyltransférase.

Les marquages ont été effectués sur des séries c'est-à-dire un nombre donné de coupes espacées les unes des autres à intervalle régulier (Figure 41). L'intervalle entre les coupes (allant de 200  $\mu$ M à 1000  $\mu$ M), dévouées à la caractérisation d'une structure diffère selon l'étendue rostro-caudal de la structure considérée. Si les structures se chevauchent, une série peut servir à la détection de plusieurs structures (Figure 41). Pour chacune des séries allouées à une structure d'intérêt une stratégie a été développée, chacune d'elles a ensuite été replacée dans une stratégie globale en tenant compte de différents éléments : étendue rostro-caudale de la structure considérée, compatibilité des anticorps utilisés et des autres structures présentes au même niveau.



Repères anatomiques

NK1R

Ŧ

# Figure 41 : Représentation schématique de la localisation rostro-caudale des structures contrôlant la respiration de l'atlas.

Dans la partie Bulbe caudal, 3 séries de 1 coupe sur 10 (soit un intervalle de 500 µM entre chaque coupe marquée) ont été réalisées pour détecter la tyrosine hydroxylase, la 5-hydroxytryptamine et la choline acétyltransférase, ainsi que 2 séries de 1 coupe sur 20 pour faire une coloration de Nissl et un Luxol. Dans la partie Bulbe rostral, 3 séries de 1 coupe sur 4 (soit un intervalle de 200 µM entre chaque coupe marquée) ont été réalisées pour faire des doubles détections somastostatine-tyrosine hydroxylase, récepteur neurokinine 1 à la substance P-tyrosine hydroxylase, choline acétyltransférase-5-hydroxytryptamine et 2 séries de 1 coupe sur 8 (soit un intervalle de 40 0µM entre chaque coupe marquée) pour faire une coloration de Nissl et un Luxol. Dans la partie Pont caudal, 3 séries de 1 coupe sur 4 (soit un intervalle de 40 0µM entre chaque coupe marquée) pour faire une coloration de Nissl et un Luxol. Dans la partie Pont caudal, 3 séries de 1 coupe sur 4 (soit un intervalle de 40 0µM entre chaque coupe sur 4 ont été réalisées pour faire des doubles détections transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate- tyrosine hydroxylase, récepteur neurokinine 1 à la substance P-tyrosine hydroxylase, choline acétyltransférase- 5-hydroxytryptamine et 2 séries de 1 coupe sur 8 pour faire une coloration de Nissl et un Luxol. Enfin dans la partie Pont rostral les mêmes détections que dans la partie Bulbe caudal ont été effectuées. Abréviations : NK1R : récepteur neurokinine 1 à la substance P, SST : somastostatine, TH : tyrosine hydroxylase, vGLUT2 : transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate, 5-HT : 5-hydroxytryptamine, ChAT : choline acétyltransférase

Pour chacun des anticorps utilisés, les durées et températures d'incubations, la composition des solutions et les dilutions ont été déterminées lors d'expériences préliminaires (Tableau 6).

Anticorps	NK1R	SST	тн	vGLUT2	5HT	ChAT	
Anticorps	lapin	rat	souris	souris	chèvre	chèvre	
	NB300-119SS	Ab30788	22941	MAB5504	20079	AB144P	
Référence fournisseur	Novus biotechnolohie	abcam	Immunostar	Merck Millipore	Euromedex	Millipore	
rinçage		TBS 0.25M		PBS 0,1M			
Inhibition des peroxydases endogènes	Méthanol 20% +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%		Méthanol 209	Méthanol 20% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%			
	15 min			60 m	15 min		
Perméabilisation	TBS 0.251	S 0.25M + Triton 0,2% 5 min					
Solution de blocage 60 min	Sérum de chèvre 5% dans PBS 0,1M	Sérum de lapin 5% dans PBS 0,1M	Sérum de cheval 33% dans PBS 0,1M	Sérum de cheval 10% + BSA 5% dans PBS 0,1M+triton 0,3%	Sérum de lapin 5% + BSA 3% dans PBS 0,1M+triton 0,5%	Sérum de lapin 5% + BSA 2% dans PBS 0,1M+triton 0,5%	
rinçage	TBS 0,25M		PBS 0,1M				
Solution d'incubation	Sérum de chèvre 1% dans PBS 0,1M	Sérum de lapin 1% dans PBS 0,1M	Sérum de cheval 5% dans PBS 0,1M	PB 0,1M+triton 0,2%+sérum de cheval 10% + BSA 3%	Sérum de lapin 2% + BSA 1% dans PBS 0,1M+triton 0,5%	Sérum de lapin 2% + dans PBS 0,1M+triton 0,1%	
Dilution	1:1000	1:100	1:250	1:50	1:1000	1:100	
Durée et température d'incubation	72H à 4°C		2H à 4°C	48H à 4°C	72H à 4°C		
Anticorps secondaire au 1/250	Chèvre anti lapin biotinylé Vector	Lapin anti rat biotinylé Vector	Cheval anti souris biotinylé Vector	Cheval anti souris biotinylé Vector	Lapin anti Chèvre biotinylé Vector		
Rinçages	TBS 0,25M		PBS 0,1M + tween20 0,05% PBS 0,1M				
Révélation	DAB 0,05 %, TB 0,25M, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,004%, nickel ammonium sulfate 0,1%		DAB 0,05 % TB 0,25M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,004%	DAB 0.05 %, TB 0,25M, $H_2O_2$ 0,008%, nickel ammonium sulfate 0,2%			

Tableau 6 : Tableau récapitulant les étapes successives pour effectuer le marquage immunohistologique d'un anticorps donné.

# V- Acquisitions et traitement des données histologiques

# V.1- Acquisition et traitement des images

Chaque lame à analyser a été passée dans un scanner de lame Hamamatsu Nanozoomer RS2. En fonction du traitement subit, immunohistologique ou coloration, l'acquisition a été faite à des grossissements différents soit respectivement au x400 et au x200. Les images ainsi générées ont la qualité nécessaire et requises pour permettre d'examiner les faisceaux de fibres et les détails cytologiques des structures d'intérêt. A noter que la taille conséquente des images obtenues a nécessité un traitement (NDPI-split software) permettant de diviser l'image pour rendre possible l'analyse avec le logiciel d'imagerie.

# V.2- Délimitation des structures

En fonction de la structure considérée, il sera effectué respectivement : un traçage des contours ou un pointage des neurones, en effet dans le cas de certaines structures le traçage des contours n'est pas possible (Figure 42). Ce travail sera réalisé sur le logiciel Slicer 3D (version 4.5, Berkeley Software) en respectant une nomenclature basée sur les données de la littérature et notamment celle déjà présente dans des atlas de l'Homme (Olszewski, 1954, Paxinos, 1995). Les contours ou pointages seront effectués à partir des marquages immunohistochimiques en les confrontant là encore, pour les structures déjà décrites chez l'Homme adulte, aux données de la littérature disponibles et aux atlas existants. Dans le cas de certains noyaux le pointage un à un des neurones qui les colorations Luxol fast blue, les contours de nombreux faisceaux de fibres seront tracés, ceux présents tout le long du tronc cérébral seront privilégiés afin de valider la tractographie. Enfin pour faciliter la visualisation des structures dans 3D, un code couleur sera appliqué : des couleurs chaudes pour les noyaux et des couleurs froides pour les faisceaux.



Figure 42 : Exemple de délimitation des structures sur une coupe de bulbe rachidien numérisée du troisième tronc cérébral.

La coupe a subit une coloration au Nissl avant d'être numérisée. Les délimitations des structures ont été réalisées grâce au logiciel Icy (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) pour aider à la mise du point du protocole d'importation des données histologiques.

# V.3- Importation des données histologiques

Au préalable, les photographies 2D prise lors de la découpe du tronc cérébral seront alignées pour former un bloc 3D cohérent qui constituera un premier volume de référence. Des stratégies de recalages vont ensuite permettre de ramener dans un même espace ce bloc 3D et les images IRM acquise à 3T et 11,7 T constituant ainsi le bloc 3D-IRM. Pour pouvoir importer les données histologiques dans ce nouveau volume de référence, chaque contour ou pointage réalisé sur coupe histologique sera d'abord aligné sur la photographie correspondante. Ainsi les coordonnées des contours pourront être placées dans le bloc 3D-IRM. Le maillage 3D des structures sera alors obtenu par interpolation (Yelnik et al., 2007). Enfin les faisceaux tracés en histologie et par tractographie à partir des images de diffusion, seront également placés dans cet espace de référence. L'ensemble (images IRM et histologiques, maillages 3D des noyaux et faisceaux) constituera l'atlas anatomo-fonctionnel du tronc cérébral.

Les deux premiers troncs cérébraux inclus dans cette étude ont d'ors et déjà permis de mettre au point les marquages immunohistochimiques et d'ajuster les paramètres d'acquisition des images IRM. A l'heure actuelle les marquages immunohistochimiques ont été réalisés et les coupes numérisées sur le troisième tronc cérébral. Il reste à maintenant à réaliser les marquages sur le quatrième tronc cérébral et à tracer les contours ou pointer les neurones des structures d'intérêts avant d'être en mesure d'importer ces données histologiques dans le bloc 3D-IRM.

Les structures cérébrales du tronc cérébral activées par l'hypoxie chez les souris nouveau-née âgées d'un jour mettent en lumière des caractéristiques modélisant le réseau respiratoire du nouveau-né humain prématuré

Au cours de mon doctorat, en parallèle des travaux présentés précédemment, j'ai pris part à une série expérimentale qui concernait une thématique en lien avec le contrôle nerveux de la respiration mais décontextualisée de l'étude des progestatifs de la famille des gonanes et des hypoventilations centrales. Il s'agissait de caractériser le réseau neuronal du tronc cérébral activé par l'hypoxie chez la souris nouveau-née de 1 jour, un modèle caractérisé par son immaturité. Notre objectif était de nous approcher de la physiologie du nouveau-né prématuré.

# I- Contexte scientifique

La problématique de cette étude est en lien avec les caractéristiques de la commande ventilatoire du nouveau-né voire même du prématuré. La commande ventilatoire du nouveau-né et plus particulièrement du nouveau-né prématuré se caractérise par des apnées ou des bradypnées fréquentes qui engendrent la récurrence d'épisodes d'hypoxiques durant la période postnatale (Bryan et al., 1986, Carroll and Agarwal, 2010, Teppema and Dahan, 2010, Mathew, 2011). Le mammifère nouveau-né présente une réponse respiratoire à l'hypoxie biphasique avec une hyperventilation de courte durée suivie d'une dépression respiratoire dénommée dépression respiratoire hypoxique (Neubauer et al., 1990, Gozal and Gaultier, 2001, Carroll and Agarwal, 2010). L'hypoxémie qui résulte de la dépression respiratoire hypoxique, en particulier lorsqu'elle est fréquemment rencontrée, peut induire des effets néfastes sur les fonctions cardiovasculaires et neurocognitives à l'origine de profondes altérations de la qualité de vie. Un dysfonctionnement dans la mise en place de la réponse respiratoire à l'hypoxie a été suspectée comme intervenant dans certaines pathologies telles que le syndrome de mort subite du nourrisson *i.e.* une exagération de la dépression respiratoire hypoxique a été suspectée être due à l'activation d'un mécanisme de défense fœtal limitant la consommation d'O2 en stoppant l'activité respiratoire in utero (Poets et al., 1999, Hunt, 2001, Kinney et al., 2011, Lavezzi, 2015).

Les mécanismes à l'origine de la réponse respiratoire à l'hypoxie sont divers. L'hyperventilation transitoire est attribuée à la stimulation des chémorécepteurs périphériques qui engendre une élévation d'activité dans certaines structures du réseau respiratoire bulbo-pontique comme notamment le noyau du tractus solitaire commissural (NTSc), le noyau réticulaire bulbaire ventrolatéral (VLM) mais aussi le noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) et le noyau parabrachial latéral (IPB) (Vizek et al., 1987, Erickson and Millhorn, 1991, Finley and Katz, 1992, Erickson and Millhorn, 1994, Hayward and Felder, 1995, Waldrop and Porter, 1995, Hirooka et al., 1997, Blessing et al., 1999, Takakura et al., 2006a, Carroll and Agarwal, 2010, Teppema and Dahan,

2010, Guyenet and Bayliss, 2015) ; cette hyperventilation augmente avec la maturation du système nerveux central (SNC). A l'inverse, la dépression respiratoire secondaire est plus importante à la naissance que dans les jours qui suivent (Carroll and Agarwal, 2010, Teppema and Dahan, 2010). Cette dépression respiratoire semble dépendre de l'activation de mécanismes centraux encore imparfaitement élucidés parmi lesquels une hypoperfusion des sites CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-sensibles de la surface ventrale du bulbe rachidien (Neubauer et al., 1990), un hypométabolisme consécutif à une chute d'O<sub>2</sub> disponible (Mortola, 2004), le relargage de neurotransmetteurs ayant un effet modérateur sur la commande centrale respiratoire (CCR) (Runold et al., 1989, Neubauer et al., 1990, Kawai et al., 1995, Herman et al., 1999, Richter et al., 1999), ou encore l'activation intrinsèque de cellules qualifiées d'O<sub>2</sub>-sensibles au niveau du bulbe rachidien (Nolan and Waldrop, 1993, Bodineau et al., 2001, Voituron et al., 2006, Voituron et al., 2011). Globalement la réponse ventilatoire à l'hypoxie résulte d'une balance entre la puissance de l'hyperventilation et de la dépression respiratoire hypoxique. Alors que chez l'adulte cette balance est en faveur de l'hyperventilation, l'immaturité du nouveau-né fait que c'est la dépression respiratoire qui l'emporte. Celle-ci constitue par ailleurs un mécanisme d'adaptation efficace : la réduction de la quantité d'O<sub>2</sub> disponible est compensée par une diminution de sa consommation tout au moins au niveau des muscles respiratoires. Cependant, une telle situation trop fréquemment rencontrée ou prolongée trop longtemps prive de nombreuses cellules d'un niveau suffisant d' $O_2$  et peut induire les effets néfastes précités. Par ailleurs, une situation physiologique qui aurait pour conséquence un renforcement de la dépression respiratoire au détriment de l'hyperventilation conduirait à un manque exagéré d'O<sub>2</sub> ; et est une des hypothèses proposées concernant la survenue du syndrome de mort subite du nourrisson (Poets et al., 1999, Hunt, 2001, Kinney et al., 2011, Lavezzi, 2015).

Dans le cadre de notre étude, nous avons examiné les changements d'activité au niveau de structures du bulbe rachidien et du pont directement impliquées dans l'élaboration de la CCR ou sa régulation chez la souris nouveau-née de 1 jour. Notre hypothèse de travail était que la souris de 1 jour constitue un modèle privilégié du fait de l'immaturité de son SNC à la naissance en comparaison de celui de l'Homme mais aussi du rat (Teppema and Dahan, 2010, Mallard and Vexler, 2015, Darnall et al., 2016). Bien que depuis quelques années la souris soit devenue le modèle d'étude privilégié notamment du fait de la possibilité de travailler sur des souris génétiquement modifiées, la connaissance précise des populations neuronales activées par l'hypoxie, particulièrement à la naissance, n'était pas disponible. Nous avons donc mené une analyse étendue des modifications d'expression de *c-fos* dans les structures bulbo-pontiques dirigeant ou modulant la CCR. Des co-détections (c-FOS/tyrosine hydroxylase, c-FOS/5-HT, c-FOS/PHOX2B) nous ont permis de caractériser ou d'exclure certains phénotypes cellulaires au sein des structures présentant une élévation du niveau de neurones c-FOS-positifs.

# II- Description brève des procédures expérimentales et des résultats

Les expérimentations ont été menées chez des souris nouveau-nées de 24,6 ± 2,6 H.

# II.1- La réponse respiratoire à l'hypoxie

Les changements de la ventilation induits par l'hypoxie ont été appréciés par la technique de pléthysmographie (Bartlett and Tenney, 1970) sur une population de 12 souris nouveau-nées. Cette série expérimentale avait vocation à vérifier les caractéristiques de la réponse ventilatoire des souris nouveau-nées au regard des données de la littérature.

Alors que nous avons pu constater l'absence de modification de la ventilation de souris maintenues en normoxie, les souris placées en hypoxie ont présenté une réponse respiratoire biphasique avec une élévation de la ventilation observée dès les 2 premières minutes de l'exposition et une dépression constatée après 25 minutes d'exposition. Ces données sont conformes aux données de la littérature (Simakajornboon et al., 2004, Bairam et al., 2013).

# II.2- Induction de c-FOS et procédures d'immunohistochimiques et d'immunohistofluorescence

Deux groupes d'animaux ont été utilisés : des souris placées dans une enceinte et soumises à un challenge hypoxique (11% O2 ; 90 min) et des souris maintenues en normocapnie elles aussi dans la même enceinte. Toutes les précautions ont été prises afin de minimiser une expression de *c-fos* non spécifique.

A l'issue des 90 minutes soit d'hypoxie, soit de normoxie, les souris nouveau-nées ont été profondément anesthésiées au froid (Danneman and Mandrell, 1997) et les troncs cérébraux prélevés. Après post-fixation et cryoprotection, les blocs ont été découpés et les coupes obtenues engagées dans les protocoles d'immunodétection : c-FOS seul, c-FOS/TH, c-FOS/5-HT et c-FOS/PHOX2B en suivant les techniques couramment utilisées et maitrisées au laboratoire (Bodineau et al., 2011, Voituron et al., 2011, Joubert et al., 2016).

Le nombre de neurones c-FOS-positifs a été quantifié dans diverses structures à l'aide d'atlas (Paxinos and Franklin, 2001) et de repères anatomiques précis afin de standardiser les procédures (Berquin et al., 2000b, Stornetta et al., 2005, Voituron et al., 2006, Voituron et al., 2011, Huckstepp et al., 2015).

Les données obtenues ont mis en évidence une élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs dans diverses structures du réseau respiratoire bulbo-pontiques ((NTS, VLM, RTN/pFRG, noyau de l'hypoglosse (XIIN), noyau parabrachial médian (mPB) et IPB) et dans des structures ayant été impliquées dans la régulation de la commande respiratoire ((groupe parapyramidal (PP), raphé magnus (RMg), noyau subcoeruleus (dSubC)). Les co-détections nous ont permis de déterminer que : 1/ virtuellement aucun ou quasiment des neurones c-FOS-positifs en hypoxie au niveau du NTS et de la VLM n'était catécholaminergique ; 2/ qu'aucun des neurones c-FOS-positifs en hypoxie du RTN/pFRG n'était PHOX2B-positif ; 3/ qu'au niveau du PP et du RMg, respectivement 30% et 15% des neurones c-FOS-positifs en hypoxie étaient sérotoninergiques 4/ que 45% des neurones c-FOS-positifs du dSubC étaient catécholaminergiques.

# **III-** Discussion

La mise en perspectives de ces données avec les données de la littérature nous a conduit à formuler les principaux éléments de discussion ci-dessous.

III.1- Les neurones du noyau subcoeruleus, une aire encéphalique impliquée dans la dépression ventilatoire sous hypoxie chez le fœtus sont activés par l'hypoxie chez la souris de 1 jour

Chez la souris nouveau-née de 1 jour, l'hypoxie induit une élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs dans la région dorso-latéral du pont, au niveau du mPB et du dSubC. Une telle élévation lors d'une hypoxie n'avait pas été constatée chez d'autres rongeurs nouveau-nés (Berquin et al., 2000b). Par contre, chez le fœtus de mouton, la participation de ces groupes cellulaires à la mise en place de la dépression respiratoire hypoxique a déjà été rapportée et discutée (Gluckman and Johnston, 1987, Walker, 1995, Breen et al., 1997, Nitsos and Walker, 1999, Walker et al., 2000, Teppema and Dahan, 2010). Chez le mouton, une telle élévation existe chez le fœtus mais pas chez le nouveau-né ce qui a conduit à proposer que cette élévation serait liée à la présence de neurones O<sub>2</sub>-sensibles participant à la diminution de la CCR chez le fœtus dont l'effet serait perdu à la naissance du fait d'une inhibition issue des chémorécepteurs périphériques (Breen et al., 1997). Par ailleurs, au sein du dSubC nous observons qu'une forte proportion des neurones c-FOS-positifs sont catécholaminergiques, une donnée similaire à ce qui a été identifié chez le fœtus de mouton (Walker, 1995, Breen et al., 1997, Nitsos and Walker, 1999). Nous proposons donc que chez la souris nouveau-née de 1 jour il n'y ait pas d'inhibition de ce mécanisme fœtal qui contribuerait à renforcer la dépression respiratoire hypoxique. Dans la mesure où une telle activation n'est pas rencontrée chez le rat nouveau-né, notre hypothèse est que ce soit le caractère immature de la souris nouveau-née par rapport au rat nouveau-né qui soit à l'origine de cette différence. Des expériences complémentaires de détection de l'expression de *c-fos* chez la souris nouveau-née plus âgée permettraient de valider notre hypothèse. Ces données sont à mettre en relation avec une récente publication de Lavezzi et collaborateurs qui rapportent une hypoplasie dans la région dorso-latérale du pont chez des nouveau-nés décédés de mort subite du nourrisson (Lavezzi, 2015). Cela souligne l'intérêt qu'il pourrait y avoir à rechercher plus spécifiquement des altérations affectant le SubC dans le cas de troubles respiratoires chez le nouveau-né.

III.2- L'hypoxie induit une élévation du nombre de neurones c-FOS positifs dans le NTS et la VLM, deux structures qui participent à l'hyperventilation hypoxique mais il n'y a pas voire très peu de cellules catécholaminergiques activées

Chez la souris nouveau-née l'hypoxie induit une élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs au sein du NTS et de la VLM, deux structures pour lesquelles le niveau élevé d'activité pourrait être en lien avec l'hyperventilation hypoxique comme cela a précédemment été décrit (Finley and Katz, 1992, Nunez-Abades et al., 1993, Erickson and Millhorn, 1994, Hayward and Felder, 1995, Soulier et al., 1997, Teppema et al., 1997, Teppema and Dahan, 2010). Cependant, à l'inverse de ce qui a été établi chez des rats nouveau-nés ou adultes (Erickson and Millhorn, 1994, Soulier et al., 1997, Teppema et al., 1997, Kaur et al., 2001), nos données montrent que ce ne sont pas des neurones catécholaminergiques qui sont activés dans la VLM. Nous proposons que l'absence d'activation des neurones catécholaminergiques de la VLM contribue à minimiser l'hyperventilation hypoxique qui dépend en partie de ces neurones.

III.3- La surface ventrale du bulbe rachidien présente une augmentation du nombre de neurones c-FOS-positifs au sein de neurones sérotoninergiques mais pas PHOX2B-positifs

L'augmentation du nombre de neurones au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien chez la souris nouveau-née ne concerne pas les neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG mais des neurones 5-HT positifs au sein du PP.

L'absence d'élévation de l'expression de *c-fos* au sein des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG suggère que malgré l'hypoventilation observée chez la souris nouveau-née, celle-ci ne soit pas suffisante pour induire une élévation du CO<sub>2</sub> qui stimulerait les neurones  $CO_2/H^+$ -sensibles (Teppema et al., 1997, Nattie, 2001, Okada et al., 2002, Guyenet et al., 2005b, Stornetta et al., 2006, Teppema and Dahan, 2010, Guyenet and Bayliss, 2015). Ceci est à mettre en relation avec une très bonne efficacité de l'hypométabolisme qui contribue à maintenir l'isocapnie à ce stade de développement (Mortola, 2004).

En ce qui concerne l'augmentation d'expression de *c-fos* au sein d'une importante population de neurones sérotoninergiques dans le PP, il nous apparait pertinent de la mettre en relation avec le fait que cette structure, le PP, est considérée comme l'homologue de position du noyau raqué bulbaire chez l'Homme qui a été décrit comme l'objet d'hypoplasie chez des enfants décédés de mort subite du nourrisson (Filiano and Kinney, 1992, Paterson et al., 2006, Kinney et al., 2011). La juxtaposition de cette observation avec une récente étude ayant mis en évidence que la destruction de neurones sérotoninergiques dont ceux du PP augmentait la latence d'éveil induite par l'hypoxie chez le rat nouveau-né (Darnall et al., 2016), suggère que les neurones sérotoninergiques du PP pourraient avoir un rôle d'éveil critique au cours de la période post-natale. Une hypoplasie du tronc cérébral les affectant aurait alors pour conséquences de diminuer la capacité du nouveau-né à s'éveiller lors d'un épisode hypoxique ce qui renforcerait l'état d'hypoxie et contribuerait à la mise en danger de l'organisme.

# **IV-** Conclusion

Pour conclure, notre étude a permis de cartographier avec précision les modifications d'activité suggérées par l'expression de *c-fos* au sein du tronc cérébral d'un organisme très immature, la souris nouveau-née de 1 jour. En particulier les principaux résultats mis à jour

sont : 1/ une activation au sein du mPB et du dSubC suggérant la persistance d'un mécanisme dépresseur fœtal dans un SNC immature, 2/ l'absence d'activation de neurones catécholaminergiques, décrits comme participant à l'hyperventilation hypoxique, activés dans la VLM ce qui pourrait contribuer à minimiser l'hyperventilation hypoxique dans un organisme immature et enfin 3/ une activation conséquente des neurones sérotoninergiques du PP décrits comme impliqués dans l'éveil consécutif de l'hypoxie chez le rongeur nouveau-né. L'ensemble de ces éléments fournit des éléments de réflexion quant aux structures qui peuvent être impliquées dans la majoration de la dépression respiratoire hypoxique chez le nouveau-né et en particulier chez le prématuré.





# Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants

Fanny Joubert<sup>1†</sup>, Camille Loiseau<sup>1†</sup>, Anne-Sophie Perrin-Terrin<sup>1,2†</sup>, Florence Cayetanot<sup>3</sup>, Alain Frugière<sup>1</sup>, Nicolas Voituron<sup>2</sup> and Laurence Bodineau<sup>1\*</sup>

### **OPEN ACCESS**

#### Edited by:

Gregory D. Funk, University of Alberta, Canada

#### Reviewed by:

Ryan W. Bavis, Bates College, USA Christopher G. Wilson, Case Western Reserve University, USA

#### \*Correspondence:

Laurence Bodineau laurence.bodineau@upmc.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work.

#### Specialty section:

This article was submitted to Respiratory Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 16 August 2016 Accepted: 22 November 2016 Published: 09 December 2016

#### Citation:

Joubert F, Loiseau C, Perrin-Terrin A-S, Cayetanot F, Frugière A, Voituron N and Bodineau L (2016) Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants. Front. Physiol. 7:609. doi: 10.3389/fphys.2016.00609 <sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, Paris, France, <sup>2</sup> Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, EA2363 Hypoxie et Pournons, Bobigny, France, <sup>3</sup> Institut de Neurosciences de la Timone, Aix Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7289, Marseille, France

We mapped and characterized changes in the activity of brainstem cell groups under hypoxia in one-day-old newborn mice, an animal model in which the central nervous system at birth is particularly immature. The classical biphasic respiratory response characterized by transient hyperventilation, followed by severe ventilation decline, was associated with increased c-FOS immunoreactivity in brainstem cell groups: the nucleus of the solitary tract, ventral reticular nucleus of the medulla, retrotrapezoid/parafacial region, parapyramidal group, raphe magnus nucleus, lateral, and medial parabrachial nucleus, and dorsal subcoeruleus nucleus. In contrast, the hypoglossal nucleus displayed decreased c-FOS immunoreactivity. There were fewer or no activated catecholaminergic cells activated in the medulla oblongata, whereas  $\sim 45\%$ of the c-FOS-positive cells in the dorsal subcoeruleus were co-labeled. Approximately 30% of the c-FOS-positive cells in the parapyramidal group were serotoninergic, whereas only a small portion were labeled for serotonin in the raphe magnus nucleus. None of the c-FOS-positive cells in the retrotrapezoid/parafacial region were co-labeled for PHOX2B. Thus, the hypoxia-activated brainstem neuronal network of one-day-old mice is characterized by (i) the activation of catecholaminergic cells of the dorsal subcoeruleus nucleus, a structure implicated in the strong depressive pontine influence previously reported in the fetus but not in newborns, (ii) the weak activation of catecholaminergic cells of the ventral reticular nucleus of the medulla, an area involved in hypoxic hyperventilation, and (iii) the absence of PHOX2B-positive cells activated in the retrotrapezoid/parafacial region. Based on these results, one-day-old mice could highlight characteristics for modeling the breathing network of premature infants.

Keywords: c-FOS, catecholamine, hypoxic ventilatory depression, serotonin, PHOX2B, subcoeruleus nucleus

1

# INTRODUCTION

Human infants, particularly premature infants, display frequent episodes of apnea, and bradypnea, and thus very common episodes of hypoxia during the postnatal period (Bryan et al., 1986; Carroll and Agarwal, 2010; Teppema and Dahan, 2010; Mathew, 2011). In newborn mammals, hypoxia elicits a biphasic respiratory response, characterized by a transient increase followed by a severe decline of ventilation called the hypoxic ventilatory depression (HVD; Neubauer et al., 1990; Gozal and Gaultier, 2001; Carroll and Agarwal, 2010; Teppema and Dahan, 2010). The hypoxemia resulting from HVD, especially when frequently repeated, may negatively affect cardiovascular and neurocognitive functions, neurocognitive outcome, and longterm quality of life. Dysfunction of the hypoxic ventilatory response (HVR) is suspected in respiratory diseases such as Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). SIDS victims typically experience a centrally mediated life-threatening apnea, possibly related to exaggerated HVD, due to the activation of a defense mechanism of the fetus that limits its O2 consumption by stopping the respiratory activity in utero under hypoxemia (Poets et al., 1999; Hunt, 2001; Kinney et al., 2011; Lavezzi, 2015).

The magnitude of the initial hyperventilation in most mammalian species increases with maturation, whereas the magnitude of the late decline is greatest in newborns and decreases with maturity (Carroll and Agarwal, 2010; Teppema and Dahan, 2010). Preterm infants with a birth weight <1500 g, exhibit no initial hyperventilation (Alvaro et al., 1992; Mathew, 2011). Hyperventilation mainly results from the activation of structures of the medulla oblongata by excitatory inputs coming from peripheral chemoreceptors (Vizek et al., 1987; Finley and Katz, 1992; Waldrop and Porter, 1995; Blessing et al., 1999; Carroll and Agarwal, 2010; Teppema and Dahan, 2010): cells of the commissural and medial parts of the nucleus of the solitary tract (cNTS and mNTS) and the ventral reticular nucleus of the medulla (VLM), many of which are catecholaminergic (Erickson and Millhorn, 1991, 1994; Hirooka et al., 1997). Second order projections transmit the message to other neuronal populations, such as the CO2activated neurons of the retrotrapezoid/parafacial respiratory group region (RTN/pFRG) shown to be PHOX2B-positive (Takakura et al., 2006; Guyenet and Bayliss, 2015), and neurons of the lateral parabrachial nucleus (IPB; Hayward and Felder, 1995). Central mechanisms contribute to a decline in ventilation in parallel with peripheral chemoreceptor activation; if the initial hyperventilation fails to restore sufficient  $PO_2$  in arterial blood, the central mechanisms reduce the metabolic demand of the respiratory musculature by lowering ventilation (Neubauer et al., 1990; Carroll and Agarwal, 2010; Teppema and Dahan, 2010). Various mechanisms underlying the hypoxic decline in ventilation have been proposed including: (*i*) hyperperfusion of medullary CO<sub>2</sub>-sensitive areas (Neubauer et al., 1990); (*ii*) hypometabolism leading to a drop in CO<sub>2</sub> production (Mortola, 2004); (*iii*) release of neuromodulators such as adenosine (Runold et al., 1989; Neubauer et al., 1990; Kawai et al., 1995) or serotonin (5-HT) (Herman et al., 1999; Richter et al., 1999); and (*iv*) intrinsic activation of cells in the medulla oblonga by low PO<sub>2</sub> (Nolan and Waldrop, 1993; Bodineau et al., 2001; Voituron et al., 2006, 2011).

Here, we examined hypoxia-induced changes in the activity of brainstem neuronal populations in one-day-old mice to characterize the neuronal brainstem component of the HVR encountered under hypoxia in newborn mammals, in particular in premature mammals. Our working hypothesis was that oneday-old mice constitute a pertinent model because their central nervous system at birth is immature relative to other newborn mammals, such as humans and rats, with respect to their neuroanatomy, neurogenesis, gliogenesis, myelinisation, and molecular and biochemical dynamics in telencephalic regions (Teppema and Dahan, 2010; Darnall et al., 2016; Mallard and Vexler, 2015). Cats and rats have been used for many years in studies to identify the underlying mechanisms of the hypoxic ventilatory response, but much work has focused on mice over the past decade because of the increasing availability of genetic mouse models (Gaultier et al., 2003). Cell populations involved in the HVR of mice, particularly at birth, are not fully known. Thus, we performed an expanded analysis of changes in *c*-FOS expression under hypoxia in brainstem areas related to respiratory control. Dual labeling allowed us to characterize various activated c-FOS-positive cell populations by assessing their catecholaminergic, serotoninergic, or PHOX2B immunoreactivites.

# MATERIALS AND METHODS

All experiments, approved by the Charles Darwin Ethics Committee for Animal Experimentation (Ce5/2011/05), were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September, 2010 and French law (2013/118). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Animals were maintained on a 12-h light-dark cycle with free access to food and water.

Experiments were performed on 31 newborn C57Bl6J mice (24.6  $\pm$  2.6 h old; Charles River Laboratories, l'Arbresle, France).

# The Hypoxic Respiratory Response Recording of Respiratory Variables

Changes in ventilatory variables were non-invasively measured during the apnea-free period using a home-made whole body plethysmograph (Bartlett and Tenney, 1970) on 12 newborn mice. Animals were placed in an experimental chamber (20 ml)

Abbreviations: 5HT, serotonin; A5, A5 region; cNTS, commissural part of the nucleus of the solitary tract; cVLM, caudal part of the ventrolateral reticular nucleus of the medulla; dSubC, dorsal part of the subcoeruleus nucleus;  $f_R$ , respiratory frequency; HVD, hypoxic ventilatory depression; HVR, hypoxic ventilatory response; KF, Kölliker-Fuse nucleus; LC, locus coeruleus nucleus, IPB, lateral parabrachial nucleus; mNTS, medial part of the nucleus of the solitary tract; mPB, medial parabrachial nucleus; R7, facial nucleus; PP, parapyramidal group; RMg, raphe magnus nucleus; ROb, raphe obscurus nucleus; RPa, raphe pallidus nucleus; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group region; rVLM, rostral part of the ventrolateral reticular nucleus of the medulla; SIDS, Sudden Infant Death Syndrome; TH, tyrosine hydroxylase;  $\dot{V}_E$ , ventilation minute; vlNTS, ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract; rost the Subcoeruleus nucleus;  $V_T$ , tidal volume.

in which they freely moved. The chamber was connected to a reference box of the same size equipped with a temperature sensor (Newport Electronic, Santa Ana, CA, USA) that permits temperature control. The temperature of the animals was measured before and after each experiment via an oral probe. During recording sessions, the chamber was sealed and air flow to the chamber interrupted for 20s (2 and 25 min after the beginning of hypoxia), leading to a change in pressure because the volume of the chamber was fixed. Between two recording sessions, the chamber was ventilated either with a humidified normoxic mixture (21% O<sub>2</sub>, 79% N<sub>2</sub>) or a hypoxic mixture (11% O2, 89% N2) heated to a temperature of ~31°C, the thermoneutral zone (Gordon, 1993), using an external heat source. The pressure change induced by the respiratory flow was assessed by connecting a differential pressure transducer (Valydine DP 45, Northridge, CA, USA) using an adaptation of the previously described barometric method (Bartlett and Tenney, 1970). The pressure signal was digitized through a Spike 2 data analysis system (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Measurement of the ventilatory variables was made on this signal *i.e.*, respiratory frequency ( $f_{\rm R}$ ), tidal volume (V<sub>T</sub>), minute ventilation ( $\dot{V}_{\rm E}$ ), and the number of apneas per min (a ventilatory pause longer than twice the duration of the preceding respiratory cycles; Matrot et al., 2005; Menuet et al., 2011). The V<sub>T</sub> was calculated using Drorbaugh and Fenn's equation (Drorbaugh and Fenn, 1955).

### **Respiratory Variables Observation**

Prior to each experimental session, newborn mice were exposed to normoxic conditions for 20 min to become habituated to the chamber. Recordings were made under normoxic conditions for a further 15 min to define the control values. During the test period, the chamber was either flushed with the normoxic mixture (control group; n = 4) or the hypoxic mixture (hypoxic group; n = 8). Use of the control group ensured that the long period of retention in the recording chamber did not induce changes in the respiratory variables. At the end of the test period, newborn mice were removed from the chamber and the buccal temperature was taken. The respiratory variables were measured during the apnea-free periods during the hypoxic test (2 and 25 min after the beginning of hypoxia) and expressed as the percentage of control values. For the V<sub>T</sub> calculation under hypoxia, the buccal temperature used was that measured before mice were placed in the recording chamber for the value at 2 min of hypoxia and that measured immediately at the end of the test for the value at 25 min of hypoxia.

Each recording session lasted ~20 s; a calibration volume of 100  $\mu l$  was injected into the plethysmographic chamber with a Hamilton syringe toward the end of each recording session. Each newborn mouse was exposed only one time to the protocol. Recordings were made during 20-s periods when the chamber was sealed, and not continuously. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). D'Agostino-Pearson omnibus normality test was realized to assess the distribution of the data. The hypoxic ventilatory response was evaluated by one-way ANOVA for repeated measures followed by a Tukey's multiple

comparisons test (GraphPad Prism5 San Diego California USA). Differences were considered to be significant if p < 0.05.

### Analysis of Hypoxia-Responding Brainstem Areas Induction of c-FOS

The detection of c-FOS requires minimizing manipulations that could induce changes of cell activity unrelated to the studied stimulus and a sufficiently long induction period to induce detectable changes in *c-fos* expression (Herdegen and Leah, 1998; Perrin-Terrin et al., 2016). The protocol used for inducing c-FOS expression was similar to that used for analyzing the effect of hypoxia on respiratory variables with two exceptions: (i) the duration of the test period was 90 min (to facilitate c-FOS induction as c-FOS protein has a half-life of 90-100 min; Herdegen and Leah, 1998) and (ii) the absence of a recovery period to exclude the possibility that changes of neuronal activity revealed by c-FOS protein detection might be related to posthypoxic neuronal mechanisms (Morris et al., 2003). At the end of the hypoxic period, newborn mice were placed under deep cold anesthesia (Danneman and Mandrell, 1997) and the brainstems removed.

### Immunohistological Procedures

Immunohistochemical analysis for c-FOS was carried out in mouse brainstems exposed to either normoxia or hypoxia (n = 19) to identify hypoxia-induced changes in cell activity. Brainstems were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 48 h at 4°C (Voituron et al., 2011). They were then cryoprotected for 48 h in 30% sucrose in 0.1 M PBS and stored at  $-20^{\circ}$ C for subsequent use. Standard immunohistochemical procedures were used to locate c-FOS on 40  $\mu$ m-thick coronal free-floating sections obtained using a cryostat (Leica CM 1510S; Bodineau et al., 2011; Voituron et al., 2011).

The detection of c-FOS was coupled with that of tyrosine hydroxylase (TH), 5-HT, or PHOX2B to characterize the cells displaying changes in activity revealed by c-FOS analysis.

The manufacturer verified the specificity of primary antibodies in all cases and in addition, control sections were processed in parallel, but with the omission of the primary or secondary antibodies; we observed no labeling in the absence of the primary or secondary antibodies.

### c-FOS Immunohistochemistry

Sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-52; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:2000) for 48 h at 4°C. They were then incubated for 2 h with a biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories, Burlington, Canada; 1:500) followed by an avidin-biotin-peroxidase complex (Novostain Super ABC kit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK; 1:250) for 1 h. Peroxidase activity was detected using 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.04% nickel ammonium sulfate, and 0.01%  $H_2O_2$  in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

Sections were mounted in sequential caudo-rostral order on silane-treated slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene, and coverslipped using Depex.

# Dual Immunohistochemistry for c-FOS/TH and c-FOS/5-HT

c-FOS was detected using a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-253 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:8000; 48 h; 4°C) according to the same protocol as above. The free-floating sections were then incubated with either a mouse polyclonal antibody against TH (MAB318, Millipore, 1:4000) or a rabbit polyclonal antibody against 5-HT (S5545, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; 1:500; 48 h; 4°C). Sections were subsequently incubated for 2 h with biotinylated horse anti-mouse (Vector Laboratories, Burlington, Canada; 1:500) or goat anti-rabbit (Vector Laboratories, Burlington, Canada; 1:500) antibodies, and then with an avidin-biotin-peroxidase complex (1:250). The TH and 5-HT immunoreactivities were detected by incubation for 3–5 min in NovaRED (Vector Laboratories, Burlington, Canada).

Sections were mounted in sequential caudo-rostral order on silane-treated slides as for the single immunohistochemical detection of c-FOS. They were air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene, and coverslipped using Entellan<sup>®</sup> (VWR International S.A.S).

### Dual Immunohistofluorescence for c-FOS/PHOX2B

Sections were first incubated with a primary antibody against PHOX2B (sc-13226, Santa Cruz biotechnology INC, Santa Cruz, CA, USA; 1:500; 48 h, 4°C), then with an Alexa 488-labeled donkey anti-goat antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, 2 h at room temperature). Sections were then incubated with a c-FOS rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein (sc-253 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:4000; 48 h; 4°C), and then with an Alexa 555-labeled goat anti-rabbit antibody concomitantly with DAPI at 1:4000 (Molecular Probes, Eugene, OR, 2 h at room temperature). Sections were then washed, mounted in sequential caudo-rostral order on silane-treated slides, air-dried, and coverslipped using AquaPolyMount (Biovalley, Marne La Vallée, France).

### Quantitative Analysis of the Effect of Hypoxia on the Number of c-FOS-Positive Cells and Their Characterization

Sections were examined under a light and fluorescence microscope (Leica DM 2000, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). We analyzed c-FOS-positive cells in brainstem structures related to respiratory control: the A5 region (A5), IPB and medial parabrachial nucleus (mPB), Kölliker-Fuse nucleus (KF), locus coeruleus nucleus (LC), subcoeruleus nucleus (SubC; the dorsal and ventral parts were separated at the level of the ventral boundary of the trigeminal motor nucleus *i.e.*, dSubC and vSubC) at the pontine level and the VLM, hypoglossal nucleus (12N), dorsal motor nucleus of vagus (10N), cNTS, mNTS, and ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract (vINTS), *raphe magnus, obscurus*, and *pallidus* nuclei (RMg, ROb, and RPa), facial nucleus (n7), and the ventral medullary surface. Definitions of boundaries of these structures were made

according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001; Paxinos et al., 2007). The VLM is a neuronal column ventral to the ambiguus nucleus including the A1C1 group of neurons and extending from the pyramidal decussation to the caudal edge of the facial nucleus. We made a distinction between the caudal part of the VLM (cVLM; from the pyramidal decussation to the caudal edge of the lateral paragigantocellulaire nucleus) and the rostral part of the VLM (rVLM; from the caudal edge of the lateral paragigantocellulaire nucleus to the caudal edge of the facial nucleus) using standard landmarks as previously described (Voituron et al., 2011). The pre-Bötzinger complex is located in the caudal part of the rVLM. We also distinguished near the ventral surface of the medulla: (i) the lateral and medial part of the RTN/pFRG i.e., the lateral RTN/pFRG and medial RTN/pFRG and (ii) a more medial area at the lateral edge of the pyramidal tract, the parapyramidal group (PP) (Berquin et al., 2000a; Stornetta et al., 2005; Voituron et al., 2011), based on previously published data (Voituron et al., 2006, 2011; Huckstepp et al., 2015). We localized all of these structures with the aid of numerous ventral, dorsal, and lateral landmarks (such as those indicated in Figures 2-5) to delimit the entire volume of each structure.

The distribution of c-FOS cells was plotted onto drawings with the aid of a drawing tube attached to the microscope to illustrate their distribution (Figure 2). c-FOS and doublelabeled cells were also photographed with a digital camera (Leica DFC450C, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). C-FOS counts were performed by eye using a counting grid in the eyepiece of the microscope at x400 to count all immunolabeled cells by varying the micrometer of the microscope, which was essential for tissue sections of 40 µm. For dual labeling, the counts were performed either by eye (at x400 except for the locus coeruleus, the pallidus, and obscurus raphe nuclei where x1000 magnification was used due to the high density of TH and 5-HT in labeled cells) or using images obtained with a digital camera (c-FOS/PHOX2B). We compared the total number of cells under normoxia and hypoxia for each analyzed area (Table 1). We analyzed the differences between the mean numbers of neurons obtained under normoxia or hypoxia using GraphPad (GraphPad Prism5 San Diego California USA) and used the Mann-Whitney tests to determine significance. Differences were considered to be significant if p < 0.05.

# RESULTS

The mean age of the pups assessed in the study (n = 31) was 24.6  $\pm$  2.6 h and the mean weight 1.42  $\pm$  0.02 g. Their mean  $f_{\rm R}$  was 139.0  $\pm$  14.4 breaths·min<sup>-1</sup>, mean V<sub>T</sub> 25.6  $\pm$  7.6  $\mu$ l·g<sup>-1</sup>, and mean  $\dot{V}_{\rm E}$  3.8  $\pm$  1.0 ml·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> (n = 12).

# Hypoxia Induced the Classical Biphasic Respiratory Response Observed in Newborns: An Early and Transient Increase Followed by a Severe Decline in Ventilation

The respiratory variables of unrestrained one-day-old mice maintained in the recording chamber under normoxia remained stable throughout the recording period (n = 4). Baseline values

were defined after 20 min of adaptation in the chamber and the following values of the respiratory variables expressed as the percentage baseline. At the end of the recording period, the mean  $f_{\rm R}$  and mean  $V_{\rm T}$  were 106.9  $\pm$  14.3% and 120.9  $\pm$  7.6% of control values, respectively, leading to a mean  $\dot{V}_{\rm E}$  of 131.2  $\pm$  12.4% of control values. This observation shows the stability of the respiratory variables during the period of retention in the recording chamber.

The mean  $f_{\rm R}$  was 166.1  $\pm$  12.5 breaths min<sup>-1</sup>, the mean V<sub>T</sub> 35.6  $\pm$  9.6  $\mu l \cdot g^{-1},$  and the mean  $\dot{V}_{\rm E}$  5.4  $\pm$  1.2 ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1} during the normoxic control period in the unrestrained one-dayold mice that were subsequently submitted to hypoxia (n = 8). The mean  $\dot{V}_{\rm E}$  tended to peak at 158.1  $\pm$  29.4% of control values 2 min after the onset of hypoxic exposure (Figure 1). It then decreased significantly dropping below control (p < 0.04) and below the high values observed at the onset of hypoxia (p < 0.03) to 68.9  $\pm$  10.0% of control values 25 min after the onset of hypoxic exposure (Figure 1). Changes in  $\dot{V}_{\rm E}$  were related to the respective effects of hypoxia on both  $f_{\rm R}$  and  $V_{\rm T}$ . The mean  $f_{\rm R}$  was at 115.4  $\pm$  19.0% of control values 2 min after the onset of hypoxic exposure and at 86.5  $\pm$  7.5% of control values 25 min after the onset of the hypoxic test. The mean  $V_T$  was at 138.8  $\pm$  18.6% of control values 2 min after the onset of hypoxic exposure and at 73.7  $\pm$  15.8% of control values 25 min after the onset of hypoxic exposure.

# Brainstem Areas that Participate in Respiratory Control Have a Low Number of c-FOS-Positive Cells under Normoxic Conditions

One-day-old mice maintained under normoxic conditions (control animals) had a relatively small number of c-FOS-positive cells both in respiratory related areas of the medulla oblongata: NTS, VLM, RTN/pFRG, PP, 10N, 12N, and medullary raphe nuclei (Table 1; Figures 2A,C,G,I,K), and related respiratory areas of the pons:. PB, KF, A5, LC, and SubC (Table 1; Figures 2E,M).



# TABLE 1 | Average number of C-FOS-positive cells in brainstem respiratory areas.

	Normoxia	Нурохіа
MEDULLA		
cNTS	16.0 ± 1.7	$39.7 \pm 8.0^{*}$
		P < 0.033
mNTS	$35.4\pm6.4$	$139.8 \pm 17.8^{**}$
		P < 0.008
VINTS	$42.8\pm9.6$	$130.5 \pm 19.9^{*}$
		P < 0.011
ROb	$153.4 \pm 11.7$	$87.6\pm21.1$
		ns
RPa	$107.2 \pm 31.6$	$180.1 \pm 44.0$
		ns
RMg	$21.0 \pm 2.0$	$50.2 \pm 6.8^{*}$
		P < 0.023
rVLM	$38.2 \pm 9.7$	$66.0 \pm 16.7$
		ns
CVLM	$18.6 \pm 5.4$	81.9 ± 16.4**
		P < 0.002
PP	$19.4 \pm 7.9$	80.6 ± 20.9 <sup>×</sup>
	105 1 0 1	P < 0.02
RTN/PFRG	12.3 ± 2.1	30.7 ± 7.2
71	075   9.0	P < 0.03
/ 11	275 ± 0.0	210.0 ± 43.0
10N	67+24	$23.6 \pm 5.7$
TON	0.7 ± 2.4	20.0 ± 0.7
12N	$182.1 \pm 25.5$	122.2 + 11.31*
		P < 0.033
PONS		
A5	$21.5 \pm 6.6$	$30.3 \pm 6.14$
		ns
LC	$37 \pm 7.9$	$41 \pm 9.4$
		ns
dSubC	$42.6 \pm 9.1$	$170.1 \pm 32.3^{*}$
		P < 0.048
vSubC	$26.4 \pm 11.2$	$56.6\pm8.5$
		ns
mPB	$7.4 \pm 1.4$	$46.0 \pm 12.7^{**}$
		P < 0.008
IPB	$6.8 \pm 2.1$	27.4 $\pm$ 6.35 *
		P < 0.037
KF	$7.2\pm2.9$	$15.8\pm6.1$
		20

Values presented are total number of c-FOS-positive cells  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.05, hypoxic values relative to normoxic values. \*\*P < 0.01, hypoxic values relative to normoxic values. ns, not significant.

cNTS, commissural part of nucleus of the tractus solitarius; cVLM, caudal part of the ventrolateral reticular nucleus of the medulla; dSubC, dorsal part of the subcoeruleus nucleus; KF, Kölliker fuse nucleus; LC, locus coeruleus; IPB, lateral part of the parabrachial nucleus; mNTS, medial part of nucleus of the tractus solitarius; mPB, medial part of the parabrachial nucleus; mPB, parapyramidal group; RMg, nucleus of the raphe magnus; RPa, nucleus of the raphe pallidus; ROb, nucleus of the raphe obscurus; rVLM, rostral part of the ventrolateral reticular nucleus of the medulla; RTN/pFRG, retrotrapezoid/parafacial region; vINTS, ventrolateral part of nucleus of the solitary tract; vSubC, ventral part of the subcoeruleus.



**FIGURE 2** | c-FOS-positive cells in the medulla oblongata and pons of one-day-old mice under hypoxia. Drawings of representative sections from the medulla oblongata (A–D) and pons (E,F) under normoxia (A,C,E) and hypoxia (B,D,F). Scale bar = 500 μm. Photomicrographs of c-FOS immunoreactivity in the mNTS (G,H), the RPa and ROb (I,J), the PP (K,L), and the dSubC (M,N) under normoxia (G,I,K,M) and hypoxia (H,J,L,N). Scale bar = 100 μm. 7N, facial nucleus; 10N, dorsal motor nucleus of the vagus 12N, hypoglossal nucleus; A5, A5 region; Amb: ambiguus nucleus; AP, area postrema; dSubC, dorsal part of the subcoeruleus nucleus; mNTS, median part of the nucleus of the tractus solitarius; cVLM, caudal part of the ventrolateral medullary reticular nucleus; PP, parapyramidal group; Py, pyramidal tract; RPa, *raphe pallidus* nucleus; RMg, *raphe magnus* nucleus; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group; vINTS, ventrolateral part of the nucleus of the tractus solitarius; vSubC, ventral part of the subcoeruleus nucleus.

# Hypoxia Induces an Increase in c-FOS Expression in Brainstem Areas that Participate in Respiratory Control Medulla Oblongata

### Nucleus of the solitary tract

The three analyzed subdivisions of the NTS *i.e.*, cNTS, mNTS, and vlNTS, especially the mNTS, had significantly more c-FOS positive cells under hypoxic than normoxic conditions (**Table 1**; **Figures 2B,H**; +148, +235, and +205%, respectively). Virtually none of the c-FOS-positive cells were immunolabeled for TH (**Figures 3A,D**); we observed no dually labeled cells in the cNTS and vlNTS and only 0.3% in the mNTS. In

addition, some of the c-FOS-positive cells of the cNTS and mNTS were also immunoreactive for PHOX2B: 18 and 25%, respectively.

### Hypoglossal nucleus

There were slightly, but significantly, fewer c-FOS-positive cells in the 12N under hypoxia than normoxia (Table 1; Figure 2B; -33%).

### Dorsal motor nucleus of vagus

We observed a higher of number of c-FOS-positive cells in the 10N under hypoxia than normoxia, but the difference was not significant (**Table 1**).



**FIGURE 3** | **Catecholaminergic character of hypoxic c-FOS-positive cells of one-day-old mice.** Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS (white points) or both c-FOS and TH (black points) in the mNTS, vINTS (**A**), VLM (**B**), and dSubC and vSubC (**C**) under hypoxic conditions. Scale bar = 100  $\mu$ m. Photomicrographs of sections double-immunolabeled for c-FOS (gray) and TH (brown) in the mNTS (**D**), VLM (**E**), and dSubC (**F**) corresponding to the regions outlined by the black rectangles in (**A–C**), respectively. Scale bar = 100  $\mu$ m. (**G**) photomicrograph representing an enlargement of the black rectangle in (**F**) Scale bar = 10  $\mu$ m. Black arrows indicate c-FOS-positive neurons that are also immunoreactive with TH. Amb: ambiguus nucleus; cc: central canal; DMX, dorsal motor nucleus of vagus; dSubC, dorsal part of the subcoeruleus nucleus; mNTS, median part of the nucleus of the tractus solitarius; Mo5, motor trigeminal nucleus; VLM, ventrolateral medullary reticular nucleus; vINTS, ventrolateral part of the nucleus of the tractus solitarius; vSubC, ventral part of the subcoeruleus.

### Ventrolateral reticular nucleus of the medulla

The cVLM, but not the rVLM, which encompasses the pre-Bötzinger complex, had more c-FOS-positive cells under hypoxic than normoxic conditions (**Table 1**; **Figures 2A,B**; +340%). Only a few of the hypoxic-c-FOS-positive cells of the cVLM were also immunoreactive for TH (**Figures 3B,E**; 5%).

### Retrotrapezoid/parafacial region

The RTN/pFRG region also had significantly more c-FOSpositive cells (~146%) under hypoxia than normoxia (**Table 1**; **Figures 3C,D**). None of the c-FOS-positive cells of the RTN/pFRG region were immunolabeled for PHOX2B (**Figure 4**).



FIGURE 4 | Hypoxic c-FOS-positive cells of the RTN/pFRG in one-day-old mice are not immunolabeled for PHOX2B. Drawing illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS and PHOX2B in the RTN/pFRG (A). Scale bar = 100  $\mu$ m. Solid black triangles indicate neurons that express PHOX2B and white points indicate c-FOS-positive neurons. Photomicrographs of a section double-immunolabeled for c-FOS (in red, B,D) and PHOX2B (in green, C,D) in the RTN/pFRG corresponding to the region outlined by the black rectangle (A). Scale bar = 50  $\mu$ m. n7, facial nucleus; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group.

# Parapyramidal group

The group of cells adjacent to the RTN/pFRG, called the PP, also had more c-FOS-positive cells under hypoxia than normoxia (**Table 1**; **Figures 2A–D,K,F**; +315%). A substantial portion of these cells, 30%, were also immunoreactive for 5-HT (**Figures 5A,C,E**).

# Medullary raphe nuclei

Among medullary *raphe* nuclei, the RMg displayed more c-FOSpositive cells under hypoxic than normoxic conditions (**Table 1**; **Figures 2C,D**; +139%). Only a small portion of RMg hypoxicc-FOS-positive cells, 15%, were also immunoreactive for 5-HT (**Figures 5B,D,F**). In contrast, there were fewer c-FOS-positive cells under hypoxia than normoxia in the ROb but the difference was not significant (**Table 1**; **Figures 2A–D,I,J**; –43%) and no change in the number of c-FOS-positive cells in the RPa (**Table 1**; **Figures 2B,J**).

# Pons

# Parabrachial and Kölliker fuse nuclei

In the PB complex, both the lPB and mPB showed substantially more c-FOS-positive cells under hypoxia than normoxia (**Table 1**; **Figures 2E,F**; +303 and +522%, respectively). In contrast, there was no significant difference in the number of c-FOS-positive cells in the KF under hypoxia (**Table 1**; **Figures 2E,F**).

# Locus coeruleus and subcoeruleus nucleus

There were significantly more c-FOS-positive cells in the dSubC under hypoxic conditions (**Table 1**; **Figures 2E,F,M,N**; +299%) but not in the vSubC (**Table 1**; **Figures 2E,F**). Among the hypoxic-c-FOS-positive cells of the dSubC, 45% were also immunoreactive for TH (**Figures 3C,F,G**). Additionally, there was no difference in the number of c-FOS-positive cells in the LC (**Table 1**; **Figures 2E,F**).

# A5 region

We observed no difference in the number of c-FOS-positive cells in A5 between hypoxic and normoxic conditions (**Table 1**; **Figures 2E,F**).

# DISCUSSION

We described and characterized the brainstem neuronal network activated by hypoxia in one-day-old mice by analyzing c-FOS protein levels by immunohistochemistry. Our main finding is that one-day-old mice displayed activation of catecholaminergic cells of the dSubC, an area implicated in the strong depressive pontine influence under hypoxia previously reported in the fetus, but not in newborns or adults of other mammalian species (Breen et al., 1997; Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000a,b; Bodineau and Larnicol, 2001). Our results also revealed that the hypoxia-activated brainstem neuronal network of oneday-old mice is characterized by weak or absent activation of cells in areas involved in hypoxic hyperventilation *i.e.*, catecholaminergic neurons of the VLM and PHOX2B cells of the retrotrapezoid/parafacial region (Erickson and Millhorn, 1991, 1994; Takakura et al., 2006) as suggested by the scarcity or



**FIGURE 5** | **Serotoninergic character of hypoxic c-FOS-positive cells of one-day-old mice.** Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS (white points) or both c-FOS and 5-HT (black points) in the PP **(A)** and RMg **(B)** under hypoxic conditions. Scale bar = 100 µm. Photomicrographs of sections double-immunolabeled for c-FOS (gray) and 5-HT (brown) in the PP **(C)** and RMg **(D)** corresponding to the regions outlined by the black rectangles of **(A,B)**, respectively. Scale bar = 100 µm. **(E,F)** photomicrographs representing an enlargement of the black rectangles in **(C,D)**, respectively. Scale bar = 50 µm. Black arrows indicate c-FOS-positive neurons that are also immunoreactive for 5-HT. RPa, *raphe pallidus* nucleus; RMg, *raphe magnus* nucleus; PP, parapyramidal group; Py, pyramidal tract.

absence of TH-positive or PHOX2B-positive cells among the c-FOS-positive-cells.

# Whole Body Flow Barometric Plethysmography in One-day-old Mice

We measured respiratory variables using whole-body flow barometric plethysmography in freely moving newborn mice to limit confinement-related stress. This is a commonly used technique to measure pulmonary ventilation in unrestrained and non-anesthetized animals that consists of recording the changes of pressure in a chamber caused by breathing (Tree et al., 2014). As the inspired gas is warmed and humidified from the ambient to the pulmonary values, the total pressure in the recording chamber increases; the opposite occurs during expiration. The accuracy of V<sub>T</sub> calculations based on wholebody plethysmography data of small animals has been questioned (Enhorning et al., 1998; Mortola and Frappell, 1998). The body temperature, humidity, and temperature of the recording chamber are difficult to control due to the small size of the devices used for such small animals, leading to highly variable absolute  $V_T$  and  $\dot{V}_E$  values. These values should thus be viewed with caution. This has led researchers to base their analysis on the changing values of  $V_T$  and  $\dot{V}_E$  as a percentage of control values. Furthermore, small mammals, particularly newborns, develop hypoxic hypothermia due to hypometabolism and increased heat loss. In our experiments, the temperature of the animal was evaluated before and after each experiment via an oral probe because of the difficulty to measure body temperature continuously with our home-made plethysmograph. Thus, our plethysmographic data should be taken with caution. Indeed, the plethysmography was used primarily to simply assure the presence of a biphasic respiratory response in one day old mice, as classically described in other newborns (Simakajornboon et al., 2004; Bairam et al., 2013).

In addition to these considerations, the pups were isolated from their mother for a long time during the plethysmographic recordings. We observed no significant modification of the respiratory variables in animals maintained under normoxia despite this long separation that may have led to physiological changes. This indicates that changes in the respiratory variables developed by newborn mice submitted to hypoxic conditions are effectively due to the reduction in  $O_2$ , and not their long retention.

# Neurons of the Subcoeruleus Nucleus, an Area Implicated in the Strong Depressive Pontine Influence under Hypoxia in the Fetus, Are Activated by Hypoxia in One-day-old Mice

Analysis of c-FOS protein revealed increased activity in neurons of the mPB and dSubC. Such an increase has not been reported in other newborn rodents (see the Figure 3 in Berquin et al., 2000b). In the fetus of sheep, the participation of cells located in the dorsolateral part of the pons to HVD, more precisely those in the mPB, KF, and SubC, has already been discussed in the literature (Gluckman and Johnston, 1987; Walker, 1995; Breen et al., 1997; Nitsos and Walker, 1999; Walker et al., 2000; Teppema and Dahan, 2010). Hypoxia induces an increase in *c*-*FOS* expression in neurons of the mPB and SubC in fetal, but not newborn, sheep (Breen et al., 1997; Nitsos and Walker, 1999). The hypoxia-activated cells of the SubC have been proposed to be  $O_2$  sensors and to strongly inhibit breathing in fetal sheep,

but to lose this effect after birth because of their inhibition by peripheral chemoreceptors (Breen et al., 1997). The present observed increase in c-FOS-positive cells in the dSubC, of which a significant portion are catecholaminergic, may be indicative of activated cells with similar properties to those identified in the fetus by Walker and collaborators (Walker, 1995; Breen et al., 1997; Nitsos and Walker, 1999). In such a model, they may be involved in HVD in one-day-old mice and constitute a noninhibited fetal mechanism at birth different from that of other studied newborn mammals, such as newborn rats, which are more mature at birth than mice (Gauda, 2006). This feature of one-day-old mice may make this model particularly suitable for mechanistic studies on the occurrence of excessive HVD in premature newborns or even on the occurrence of SIDS. Indeed, SIDS has been hypothesized to result from the awakening of a defense mechanism of the fetus consisting of a strong depressive response to hypoxemia that limits O<sub>2</sub> consumption (Lavezzi, 2015). A recent publication by Lavezzi and collaborators emphasized hypoplasia and neurochemical alterations of KF neurons underlying the pathogenetic mechanisms of SIDS (Lavezzi, 2015). Our present data and previously published work in fetal and newborn sheep (Breen et al., 1997) underscore the interest in searching for possible alterations in the integrity of dSubC neurons in the brainstems of infants who died of SIDS.

In rats, SubC and mPB have been shown to contain premotoneurons that innervate hypoglossal motoneurons involved in maintaining upper airway patency during breathing (Dobbins and Feldman, 1995; Fay and Norgren, 1997). The presently observed decrease in c-FOS protein levels in the hypoglossal nucleus cells may be linked to an inhibitory drive coming from the dSubC and mPB during hypoxia. This hypothetic inhibitory pathway may contribute to HVD by reducing the airway opening when activated under hypoxia. Noradrenergic cells of the dSubC innervate the hypoglossal nucleus, of which the motoneurons are activated by noradrenalin (Aldes et al., 1992; Fenik et al., 2008; Funk et al., 2011). If dSubC cells are involved in the decrease in the expression of *c*-FOS in the hypoglossal nucleus, they would not be those immunoreactive for TH. Further experiments are necessary to determine the pharmacological phenotype of the c-FOS-positive, but TH-negative, cells of the dSubC.

# Hypoxia in One-day-old Mice Induces an Increase in the Number of C-FOS-Positive Cells in the Nucleus *Raphe Magnus*, an Area Previously Described as Having a Hypoxic Respiratory Depressive Influence

We observed a large increase in the number of c-FOS-positive cells under hypoxia in the RMg. Such an increase has not been reported in newborns of other species (Breen et al., 1997; Teppema et al., 1997; Horn et al., 2000; Berquin et al., 2000b) or adults subjected to moderate hypoxia (Berquin et al., 2000a), but has been reported in adults under severe hypoxia (Erickson and Millhorn, 1994). Based on data from the literature, we suggest that hypoxia-activated RMg neurons contribute to HVD. Indeed, activation of RMg neurons attenuate the activation of NTS neurons by peripheral chemoreceptors (Perez and Ruiz, 1995)

and RMg neurons exert a moderating influence on the  $V_T$  under hypoxic conditions (Gargaglioni et al., 2003). Thus, activation of RMg neurons in one-day-old mice may participate in the HVD. With the exception of a few cells, the hypoxic c-FOS-positive cells that we observed were not serotoninergic. In addition to serotoninergic neurons, the RMg contains GABAergic neurons that could be involved in HVD. This is supported by the fact that *iv* administration of bicuculline, a GABA<sub>A</sub> antagonist, reduces the respiratory inhibition that occurs after electrical stimulation of the RMg (Cao et al., 2006).

# Hypoxia Induces an Increase in c-FOS Expression in NTS and VLM, Two Structures that Participate in Hypoxic Hyperventilation, but There Is Little or No c-FOS Protein in Catecholaminergic Neurons

Hypoxia induced an increase in the number of c-FOSpositive cells in areas recognized to be involved in early hypoxic hyperventilation triggered by stimulation of peripheral chemoreceptors (see for revue Teppema and Dahan, 2010) i.e., the cNTS, mNTS, and lPB. The cNTS and mNTS constitute the major central site for the integration of inputs from peripheral chemoreceptors whereas only few afferents from peripheral chemoreceptors project toward the VLM (Finley and Katz, 1992). The two subnuclei of the NTS are the first relay between peripheral afferences and the VLM and IPB (Nunez-Abades et al., 1993; Hayward and Felder, 1995). All of these connections conceivably provide a common basis for the hypoxic increase in c-FOS expression that we observed in these structures in oneday-old mice and that has been observed in other species at several stages of development (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000b).

The dual detection of c-FOS and TH revealed that no, or only very few, neurons activated by hypoxia in the cNTS, mNTS, and VLM were catecholaminergic. Previous data about the catecholaminergic character of c-FOS-positive hypoxia-activated cells in these structures made in adult mammals have showed that no, or very few, c-FOS hypoxia-activated neurons in the NTS are also catecholaminergic, whereas a large portion of c-FOS hypoxia-activated neurons in the VLM are also immunoreactive for TH (Erickson and Millhorn, 1994; Soulier et al., 1997; Teppema et al., 1997). The only data from the literature concerning this issue in newborn animals is the study of c-FOS expression in newborn rats under high-altitude conditions showing that an altitude of 8000 m induces an increase in the number of c-FOS positive cells in the NTS and VLM with a large portion of them in the VLM also immunoreactive for TH (Kaur et al., 2001). Taking into account these data, our results suggest that the effect of hypoxia on the VLM differed in one-day-old mice from other studied newborn or adult mammals. This difference may depend on the maturation state of either VLM neurons or brainstem connections. The absence of VLM catecholaminergic neuron activation in one-day-old mice could conceivably participate in HVD, and even strengthen it in this model, as they have been associated with hypoxic hyperventilation (Erickson and Millhorn, 1994; Soulier et al., 1997; Teppema et al., 1997). If this observation is likely due to the degree of immaturity of the central nervous system of the oneday-old mice as we assume (Teppema et al., 1997; Gauda, 2006; Mallard and Vexler, 2015), a similar mechanism may be involved in exacerbating the respiratory problems encountered at birth in premature infants.

# The Ventral Medullary Surface Displays Increased c-FOS Expression in One-day-old mice in Serotonin- but Not PHOX2B-Positive Neurons

We observed an increase in the number of c-FOS-positive cells in the RTN/pFRG. The RTN/pFRG is involved in the respiratory adaptation to both hypercapnia (Teppema et al., 1997; Nattie, 2001; Okada et al., 2002; Guyenet et al., 2005; Stornetta et al., 2006; Teppema and Dahan, 2010; Guyenet and Bayliss, 2015) and hypoxia (Bodineau et al., 2000a, 2001; Bodineau and Larnicol, 2001; Takakura et al., 2006; Voituron et al., 2006, 2011; Teppema and Dahan, 2010). The RTN/pFRG contains both CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> sensor cells (Guyenet et al., 2005; Voituron et al., 2006, 2011; Onimaru et al., 2008; Lazarenko et al., 2009; Guyenet and Mulkey, 2010) and also integrates chemosensory inputs from peripheral chemoreceptors (Berquin et al., 2000a; Bodineau et al., 2000b; Takakura et al., 2006). The well-identified CO2-sensor cells of the RTN/pFRG (Lazarenko et al., 2009; Guyenet and Mulkey, 2010) are derived from neurons that express Phox2b, Atoh-1, and Egr-2, and are characterized by the presence of PHOX2B, NK1 receptors, VGLUT2, TASK-2, GPR4, and GALANIN (Weston et al., 2004; Stornetta et al., 2006; Onimaru et al., 2008; Dubreuil et al., 2009; Rose et al., 2009; Guyenet and Mulkey, 2010; Guyenet and Bayliss, 2015; Ruffault et al., 2015). In the present work, none of the c-FOS positive cells of the RTN/pFRG were PHOX2B-positive. This suggests that although the one-day-old mice displayed severe hypoventilation under hypoxia, hypoventilation may not entail an increase in CO2 that should have been detected by the PHOX2B cells of the RTN/pFRG. Regardless of the mechanisms responsible for HVD, the concomitant hypometabolism that maintains isocapnia, which constitutes a feature of the newborn response to hypoxia (Mortola, 2004), appears to be extremely effective in one-day-old mice. The activation of PHOX2Bnegative RTN/pFRG cells may depend on intrinsic O2-sensing properties that we previously demonstrated by measuring *c-FOS* expression in brainstem spinal cord preparations from newborn rodents (Voituron et al., 2006, 2011). It is unlikely that the increase in the number of c-FOS-positive/PHOX2B-negative cells in RTN/pFRG depends on peripheral chemoreceptor inputs. Takakura and collaborators have shown that such indirect activation implicates cNTS glutamatergic neurons projecting to PHOX2B RTN/pFRG cells (Takakura et al., 2006). This suggests possible immaturity of the connection between cNTS cells activated by peripheral chemoreceptors and RTN/pFRG PHOX2B-positive cells.

We observed a greater increase in *c-FOS* expression in the more medial group, called PP, with 30% of the c-FOS-positive

cells containing 5-HT, than for the RTN/pFRG. This group of cells has been suggested to be the positional homolog of the human medullary arcuate nucleus (Filiano and Kinney, 1992), a structure in which abnormalities have been reported in infants who died of SIDS (Filiano and Kinney, 1992; Paterson et al., 2006; Kinney et al., 2011). The increase in c-FOS protein levels induced by hypoxia in the PP is of particular interest given the possible involvement of both the arcuate nucleus and abnormalities in the respiratory response to hypoxia in SIDS (Paterson et al., 2006; Kinney et al., 2011). The PP contains GABAergic and serotoninergic neurons (Stornetta and Guyenet, 1999; Weston et al., 2004; Stornetta et al., 2005) and displays multiple sites of projections including the pre-Bötzinger complex and intermediolateral column (Holtman et al., 1990; Jansen et al., 1995). Functionally, the PP has been reported to be involved in autonomic regulation under hypoxia. Darnall and collaborators reported that the destruction of 5-HT medullary neurons, including those of the ROb and PP increase the arousal latency from sleep induced by hypoxia in newborn rats (Darnall et al., 2016). In the relatively immature one-day-old mouse (Gauda, 2006), we only observed an increase in c-FOS- and 5-HT-positive cells in the PP, but not in the ROb, where the number of c-FOS-positive cells tended to decrease. Thus, our results suggest that 5-HT PP neurons must have a critical role in arousal from sleep under hypoxia in immature newborn mammals. Our results combined with the fact that hypoplasia of this region has been shown in newborn death due to SIDS, suggests that the dysfunction of 5-HT neurons of the PP in infants, and particularly in premature infants, could result in a high risk situation due to the decrease of arousal from sleep during hypoxia.

# CONCLUSION

This study significantly contributes to the knowledge of key brainstem cell populations, for which the activity is modulated during hypoxia using an animal model characterized by its immaturity relative to other mammals, the one-day-old mouse (Gauda, 2006; Gaultier et al., 2006; Teppema and Dahan, 2010; Darnall et al., 2016; Mallard and Vexler, 2015). Our results highlight changes in the activity of cell populations that may participate in the respiratory depression of this animal model *i.e.*, the activation of catecholaminergic cells of the dSubC, an area previously implicated in a strong depressive pontine influence in the fetus but not in newborns. Also, we did not observe an increase in the number of c-FOS-positive cells commonly associated with the development of hypoxic hyperventilation, catecholaminergic cells of VLM, and PHOX2B-postive neurons of the RTN/pFRG. This was suggested by the scarcity or absence of TH-positive or PHOX2B-positive cells among the c-FOSpositive-cells. Finally, our results suggest that 5-HT neurons of the PP, shown to be involved in arousal from sleep, are the only serotoninergic medullary neurons activated by hypoxia in immature mammals. Some physiopathological conditions in which depressant and arousing mechanisms would be more or less potent might lead to life-threatening situations, especially in premature infants. In conclusion, one-day-old mice highlight characteristics to model dysfunction of the breathing network in premature infants. In the absence of data in the literature, future experiments to explore c-FOS expression in older mice, displaying a mature hypoxic ventilatory response, would help to exclude the possibility that the pattern of c-FOS expression observed in one-day-old mice is simply species specific and not due to their relative immaturity.

# **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

FJ, CL, and AP performed experiments, analyzed data, and generated the figures. FC performed experiments, analyzed data, and made comments on the manuscript. AF discussed the results and their significance and made comments on the manuscript. NV performed experiments, generated a figure, analyzed, and interpreted data, discussed the results and their significance, and made comments on the manuscript. LB designed and supervised

# REFERENCES

- Aldes, L. D., Chapman, M. E., Chronister, R. B., and Haycock, J. W. (1992). Sources of noradrenergic afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. *Brain Res. Bull.* 29, 931–942. doi: 10.1016/0361-9230(92)90168-W
- Alvaro, R., Alvarez, J., Kwiatkowski, K., Cates, D., and Rigatto, H. (1992). Small preterm infants (less than or equal to 1500 g) have only a sustained decrease in ventilation in response to hypoxia. *Pediatr. Res.* 32, 403–406. doi: 10.1203/00006450-199210000-00007
- Bairam, A., Lumbroso, D., and Joseph, V. (2013). Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 515–525. doi: 10.1016/j.resp.2012.11.001
- Bartlett, D. Jr., and Tenney, S. M. (1970). Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384–395. doi: 10.1016/0034-5687(70) 90056-3
- Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., and Larnicol, N. (2000a). Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.* 857, 30–40. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02304-5
- Berquin, P., Cayetanot, F., Gros, F., and Larnicol, N. (2000b). Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res.* 877, 149–159. doi: 10.1016/S0006-8993(00) 02632-9
- Blessing, W. W., Yu, Y., and Nalivaiko, E. (1999). Medullary projections of rabbit carotid sinus nerve. *Brain Res.* 816, 405–410. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01147-0
- Bodineau, L., and Larnicol, N. (2001). Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience* 108, 643–653. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00442-0
- Bodineau, L., Cayetanot, F., and Frugiere, A. (2000a). Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an *in vitro* study in neonatal rat. *Neurosci. Lett.* 295, 67–69. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01590-1
- Bodineau, L., Cayetanot, F., and Frugiere, A. (2001). Fos study of ponto-medullary areas involved in the *in vitro* hypoxic respiratory depression. *Neuroreport* 12, 3913–3916. doi: 10.1097/00001756-200112210-00012
- Bodineau, L., Frugiere, A., Marlot, D., and Wallois, F. (2000b). Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci. Lett.* 280, 111–114. doi: 10.1016/S0304-3940(00)00770-9
- Bodineau, L., Taveau, C., Le Quan Sang, H. H., Osterstock, G., Queguiner, I., Moos, F., et al. (2011). Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology* 152, 3492–3503. doi: 10.1210/en.2011-0206

all experiments, obtained funding, shaped, and interpreted the data, generated a figure, discussed the results, and their significance, and wrote the manuscript.

# FUNDING

This work received financial support from the "Legs Poix, Chancellerie des Universités de Paris" (Legs 1504) and the French Government-Institut Hospitalo-Universitaire-A-Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (IHU-A-ICM) "Investissement d'Avenir" ANR-10-IAIHU-06 program. FJ was supported by the "Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire 2012."

# ACKNOWLEDGMENTS

We thank William Hempel (Alex Edelman & associates) for editing the English text.

- Breen, S., Rees, S., and Walker, D. (1997). Identification of brainstem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. *Brain Res.* 748, 107–121. doi: 10.1016/S0006-8993(96)01273-5
- Bryan, A., Bowas, G., and Maloney, J. (1986). "Control of breathing in the fetus and the newborn," in *Handbook of Physiology, The Respiratory System, Control* of Breathing, Vol 2, eds N. S. Cherniack and J. G. Widdicombe (Washington, DC: American Physiological Society), 621–647.
- Cao, Y., Matsuyama, K., Fujito, Y., and Aoki, M. (2006). Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci. Res.* 56, 322–331. doi: 10.1016/j.neures.2006.08.001
- Carroll, J. L., and Agarwal, A. (2010). Development of ventilatory control in infants. *Paediatr. Respir. Rev.* 11, 199–207. doi: 10.1016/j.prrv.2010. 06.002
- Danneman, P. J., and Mandrell, T. D. (1997). Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab. Anim. Sci.* 47, 386–395.
- Darnall, R. A., Schneider, R. W., Tobia, C. M., and Commons, K. G. (2016). Eliminating medullary 5-HT neurons delays arousal and decreases the respiratory response to repeated episodes of hypoxia in neonatal rat pups. J. Appl. Physiol. 120, 514–525. doi: 10.1152/japplphysiol.00560.2014
- Dobbins, E. G., and Feldman, J. L. (1995). Differential innervation of protruder and retractor muscles of the tongue in rat. J. Comp. Neurol. 357, 376–394. doi: 10.1002/cne.903570305
- Drorbaugh, J. E., and Fenn, W. O. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81–87.
- Dubreuil, V., Thoby-Brisson, M., Rallu, M., Persson, K., Pattyn, A., Birchmeier, C., et al. (2009). Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J. Neurosci.* 29, 14836–14846. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2623-09.2009
- Enhorning, G., Van, S. S., Lundgren, C., and Vargas, I. (1998). Wholebody plethysmography, does it measure tidal volume of small animals? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 945–951. doi: 10.1139/y99-002
- Erickson, J. T., and Millhorn, D. E. (1991). Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. *Brain Res.* 567, 11–24. doi: 10.1016/0006-8993(91)91430-9
- Erickson, J. T., and Millhorn, D. E. (1994). Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. J. Comp. Neurol. 348, 161–182. doi: 10.1002/cne.903480202
- Fay, R. A., and Norgren, R. (1997). Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. III. Lingual muscle motor systems. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25, 291–311. doi: 10.1016/S0165-0173(97)00028-3

- Fenik, V. B., Rukhadze, I., and Kubin, L. (2008). Inhibition of pontine noradrenergic A7 cells reduces hypoglossal nerve activity in rats. *Neuroscience* 157, 473–482. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.069
- Filiano, J. J., and Kinney, H. C. (1992). Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 51, 394–403. doi: 10.1097/00005072-199207000-00002
- Finley, J. C., and Katz, D. M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572, 108–116. doi: 10.1016/0006-8993(92)90458-L
- Funk, G. D., Zwicker, J. D., Selvaratnam, R., and Robinson, D. M. (2011). Noradrenergic modulation of hypoglossal motoneuron excitability: developmental and putative state-dependent mechanisms. *Arch. Ital. Biol.* 149, 426–453. doi: 10.4449/aib.v149i4.1271
- Gargaglioni, L. H., Coimbra, N. C., and Branco, L. G. (2003). The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapyrexia in rats. *Neurosci. Lett.* 347, 121–125. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00671-2
- Gauda, E. B. (2006). Introduction: knowledge gained from animal studies of the fetus and newborn: application to the human premature infant. *ILAR J.* 47, 1–4. doi: 10.1093/ilar.47.1.1
- Gaultier, C., Dauger, S., Simonneau, M., and Gallego, J. (2003). Genes modulating chemical breathing control: lessons from mutant animals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 136, 105–114. doi: 10.1016/S1569-9048(03)00075-2
- Gaultier, C., Matrot, B., and Gallego, J. (2006). Transgenic models to study disorders of respiratory control in newborn mice. *ILAR J.* 47, 15–21. doi: 10.1093/ilar.47.1.15
- Gluckman, P. D., and Johnston, B. M. (1987). Lesions in the upper lateral pons abolish the hypoxic depression of breathing in unanaesthetized fetal lambs *in utero. J. Physiol.* 382, 373–383. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016372
- Gordon, C. (1993). Temperature Regulation in Laboratory Rodents. New York, NY: Cambridge University Press.
- Gozal, D., and Gaultier, C. (2001). Evolving concepts of the maturation of central pathways underlying the hypoxic ventilatory response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 325–329. doi: 10.1164/ajrccm.164.2.2011133
- Guyenet, P. G., and Bayliss, D. A. (2015). Neural control of breathing and CO2 homeostasis. *Neuron* 87, 946–961. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.001
- Guyenet, P. G., and Mulkey, D. K. (2010). Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 244–255. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.005
- Guyenet, P. G., Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., and Bayliss, D. A. (2005). Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J. Neurosci.* 25, 8938–8947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2415-05.2005
- Hayward, L. F., and Felder, R. B. (1995). Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat. Am. J. Physiol. 268, R707–R714.
- Herdegen, T., and Leah, J. D. (1998). 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. doi: 10.1016/S0165-0173(98)00018-6
- Herman, J. K., O'halloran, K. D., Mitchell, G. S., and Bisgard, G. E. (1999). Methysergide augments the acute, but not the sustained, hypoxic ventilatory response in goats. *Respir. Physiol.* 118, 25–37. doi: 10.1016/S0034-5687(99)00070-5
- Hirooka, Y., Polson, J. W., Potts, P. D., and Dampney, R. A. (1997). Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 80, 1209–1224. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00111-5
- Holtman, J. R. Jr., Marion, L. J., and Speck, D. F. (1990). Origin of serotonincontaining projections to the ventral respiratory group in the rat. *Neuroscience* 37, 541–552. doi: 10.1016/0306-4522(90)90422-Z
- Horn, E. M., Kramer, J. M., and Waldrop, T. G. (2000). Development of hypoxiainduced Fos expression in rat caudal hypothalamic neurons. *Neuroscience* 99, 711–720. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00221-9
- Huckstepp, R. T., Cardoza, K. P., Henderson, L. E., and Feldman, J. L. (2015). Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. J. Neurosci. 35, 1052–1067. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2953-14.2015
- Hunt, C. E. (2001). Sudden infant death syndrome and other causes of infant mortality: diagnosis, mechanisms, and risk for recurrence in siblings. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 346–357. doi: 10.1164/ajrccm.164.3.9910045

- Jansen, A. S., Nguyen, X. V., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C., and Loewy, A. D. (1995). Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science* 270, 644–646. doi: 10.1126/science.270.5236.644
- Kaur, C., You, Y., Singh, J., Peng, C. M., and Ling, E. A. (2001). Expression of Fos immunoreactivity in some catecholaminergic brainstem neurons in rats following high-altitude exposure. *J. Neurosci. Res.* 63, 54–63. doi: 10.1002/1097-4547(20010101)63:1<54::AID-JNR7>3.0.CO;2-X
- Kawai, A., Okada, Y., Muckenhoff, K., and Scheid, P. (1995). Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. *Respir. Physiol.* 100, 25–32. doi: 10.1016/0034-5687(94)00124-I
- Kinney, H. C., Broadbelt, K. G., Haynes, R. L., Rognum, I. J., and Paterson, D. S. (2011). The serotonergic anatomy of the developing human medulla oblongata: implications for pediatric disorders of homeostasis. *J. Chem. Neuroanat.* 41, 182–199. doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.05.004
- Lavezzi, A. M. (2015). A new theory to explain the underlying pathogenetic mechanism of sudden infant death syndrome. *Front. Neurol.* 6:220. doi: 10.3389/fneur.2015.00220
- Lazarenko, R. M., Milner, T. A., Depuy, S. D., Stornetta, R. L., West, G. H., Kievits, J. A., et al. (2009). Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. J. Comp. Neurol. 517, 69–86. doi: 10.1002/cne.22136
- Mallard, C., and Vexler, Z. S. (2015). Modeling ischemia in the immature brain: how translational are animal models? *Stroke* 46, 3006–3011. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.007776
- Mathew, O. P. (2011). Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. J. Perinatol. 31, 302–310. doi: 10.1038/jp.2010.126
- Matrot, B., Durand, E., Dauger, S., Vardon, G., Gaultier, C., and Gallego, J. (2005). Automatic classification of activity and apneas using whole body plethysmography in newborn mice. J. Appl. Physiol. 98, 365–370. doi: 10.1152/japplphysiol.00803.2004
- Menuet, C., Kourdougli, N., Hilaire, G., and Voituron, N. (2011). Differences in serotoninergic metabolism possibly contribute to differences in breathing phenotype of FVB/N and C57BL/6J mice. J. Appl. Physiol. 110, 1572–1581. doi: 10.1152/japplphysiol.00117.2011
- Morris, K. F., Baekey, D. M., Nuding, S. C., Dick, T. E., Shannon, R., and Lindsey,
  B. G. (2003). Invited review: neural network plasticity in respiratory control. *J. Appl. Physiol.* 94, 1242–1252. doi: 10.1152/japplphysiol.00715.2002
- Mortola, J. P. (2004). Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 345–356. doi: 10.1016/j.resp.2004.01.011
- Mortola, J. P., and Frappell, P. B. (1998). On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 937–944. doi: 10.1139/y99-001
- Nattie, E. E. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir. Physiol.* 129, 257–268. doi: 10.1016/S0034-5687(01)00295-X
- Neubauer, J. A., Melton, J. E., and Edelman, N. H. (1990). Modulation of respiration during brain hypoxia. J. Appl. Physiol. 68, 441–451.
- Nitsos, I., and Walker, D. W. (1999). Characterization of pontine neurons which respond to hypoxia in fetal sheep. *Neurosci. Lett.* 266, 33–36. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00249-9
- Nolan, P. C., and Waldrop, T. G. (1993). In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. Brain Res. 630, 101–114. doi: 10.1016/0006-8993(93)90648-7
- Nunez-Abades, P. A., Morillo, A. M., and Pasaro, R. (1993). Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections. J. Auton. Nerv. Syst. 42, 99–118. doi: 10.1016/0165-1838(93)90042-S
- Okada, Y., Chen, Z., Jiang, W., Kuwana, S., and Eldridge, F. L. (2002). Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. J. Appl. Physiol. 93, 427–439. doi: 10.1152/japplphysiol.00620.2000
- Onimaru, H., Ikeda, K., and Kawakami, K. (2008). CO2-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J. Neurosci.* 28, 12845–12850. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3625-08.2008
- Paterson, D. S., Trachtenberg, F. L., Thompson, E. G., Belliveau, R. A., Beggs, A. H., Darnall, R., et al. (2006). Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296, 2124–2132. doi: 10.1001/jama.296.17.2124

- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, CA: Academic Press.
- Paxinos, G., Halliday, G., Watson, C., Koutcherov, Y., and Wang, H. (2007). Developing Mouse Brain. London: Elsevier Academic Press.
- Perez, H., and Ruiz, S. (1995). Medullary responses to chemoreceptor activation are inhibited by locus coeruleus and nucleus raphe magnus. *Neuroreport* 6, 1373–1376. doi: 10.1097/00001756-199507100-00003
- Perrin-Terrin, A. S., Jeton, F., Pichon, A., Frugière, A., Richalet, J. P., Bodineau, L., et al. (2016). 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. 110:e53613. doi: 10.3791/53613
- Poets, C. F., Meny, R. G., Chobanian, M. R., and Bonofiglo, R. E. (1999). Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr. Res.* 45, 350–354. doi: 10.1203/00006450-199903000-00010
- Richter, D. W., Schmidt-Garcon, P., Pierrefiche, O., Bischoff, A. M., and Lalley, P. M. (1999). Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J. Physiol.* 514(Pt 2), 567–578. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.567ae.x
- Rose, M. F., Ren, J., Ahmad, K. A., Chao, H. T., Klisch, T. J., Flora, A., et al. (2009). Math1 is essential for the development of hindbrain neurons critical for perinatal breathing. *Neuron* 64, 341–354. doi: 10.1016/j.neuron.2009. 10.023
- Ruffault, P. L., D'Autréaux, F., Hayes, J. A., Nomaksteinsky, M., Autran, S., Fujiyama, T., et al. (2015). The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO<sub>2</sub>. *Elife* 4:e07051. doi: 10.7554/eLife.07051
- Runold, M., Lagercrantz, H., Prabhakar, N. R., and Fredholm, B. B. (1989). Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. J. Appl. Physiol. 67, 541–546.
- Simakajornboon, N., Vlasic, V., Li, H., and Sawnani, H. (2004). Effect of prenatal nicotine exposure on biphasic hypoxic ventilatory response and protein kinase C expression in caudal brain stem of developing rats. J. Appl. Physiol. 96, 2213–2219. doi: 10.1152/japplphysiol.00935.2003
- Soulier, V., Gestreau, C., Borghini, N., Dalmaz, Y., Cottet-Emard, J. M., and Pequignot, J. M. (1997). Peripheral chemosensitivity and central integration: neuroplasticity of catecholaminergic cells under hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 118, 1–7. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00369-6
- Stornetta, R. L., and Guyenet, P. G. (1999). Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. J. Comp. Neurol. 407, 367–380. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990510)407:3<367::AID-CNE5>3.0.CO;2-6
- Stornetta, R. L., Moreira, T. S., Takakura, A. C., Kang, B. J., Chang, D. A., West, G. H., et al. (2006). Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J. Neurosci.* 26, 10305–10314. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2917-06.2006
- Stornetta, R. L., Rosin, D. L., Simmons, J. R., McQuiston, T. J., Vujovic, N., Weston, M. C., et al. (2005). Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and gamma-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. *J. Comp. Neurol.* 492, 477–494. doi: 10.1002/cne.20742

- Takakura, A. C., Moreira, T. S., Colombari, E., West, G. H., Stornetta, R. L., and Guyenet, P. G. (2006). Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats. *J. Physiol.* 572, 503–523. doi: 10.1113/jphysiol.2005.103788
- Teppema, L. J., and Dahan, A. (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol. Rev.* 90, 675–754. doi: 10.1152/physrev.00012.2009
- Teppema, L. J., Veening, J. G., Kranenburg, A., Dahan, A., Berkenbosch, A., and Olievier, C. (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. J. Comp. Neurol. 388, 169–190. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19971117)388:2<169::AID-CNE1>3.0.CO;2-#
- Tree, K. C., Scotto Di Perretolo, M., Peyronnet, J., and Cayetanot, F. (2014). In utero cannabinoid exposure alters breathing and the response to hypoxia in newborn mice. Eur. J. Neurosci. 40, 2196–2204. doi: 10.1111/ejn.12588
- Vizek, M., Pickett, C. K., and Weil, J. V. (1987). Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin. J. Appl. Physiol. 63, 1658–1664.
- Voituron, N., Frugiere, A., Champagnat, J., and Bodineau, L. (2006). Hypoxiasensing properties of the newborn rat ventral medullary surface *in vitro*. *J. Physiol.* 577, 55–68. doi: 10.1113/jphysiol.2006.111765
- Voituron, N., Frugiere, A., Mc Kay, L. C., Romero-Granados, R., Dominguez-Del-Toro, E., Saadani-Makki, F., et al. (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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.07.062
- Waldrop, T. G., and Porter, J. P. (1995). "Hypothalamic involvement in respiratory and cardiovascular regulation," in *Regulation of Breathing*, ed J. A. Dempsey (New York, NY: Marcel Dekker), 315–364.
- Walker, D. W. (1995). Hypoxic inhibition of breathing and motor activity in the foetus and newborn. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 533–536. doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb02062.x
- Walker, D. W., Lee, B., and Nitsos, I. (2000). Effect of hypoxia on respiratory activity in the foetus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 110–113. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03201.x
- Weston, M. C., Stornetta, R. L., and Guyenet, P. G. (2004). Glutamatergic neuronal projections from the marginal layer of the rostral ventral medulla to the respiratory centers in rats. J. Comp. Neurol. 473, 73–85. doi: 10.1002/cne.20076

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Joubert, Loiseau, Perrin-Terrin, Cayetanot, Frugière, Voituron and Bodineau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# RESUME

Ce travail doctoral avait pour objectif de mieux comprendre le mécanisme d'action central de l'étonogestrel (ETO), un progestatif de la famille des gonanes, afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  de patientes Ondine exposées à cette molécule.

Le syndrome d'Ondine est une pathologie neurorespiratoire rare, caractérisée par une abolition ou une réduction importante de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  qui entraine la survenue de profondes hypoventilations. Dans le laboratoire où ce projet doctoral a été mis en place, il a été observé une récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  chez deux patientes Ondines, concomitante avec la prise de désogestrel, un progestatif appartenant à la famille des gonanes (Straus et al., 2010). Au vu des données de la littérature concernant les effets facilitateurs de la progestérone sur la ventilation de base et la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Bayliss et al., 1990; Jensen et al., 2005; Slatkovska et al., 2006), il a été suggéré que le desogestrel ou plutôt l'ETO, le métabolite biologiquement actif du désogestrel, avait permis d'induire cette récupération de la chémosensibilité au  $CO_2/H^+$  (Straus et al., 2010).

Afin appréhender les mécanismes centraux mis en jeu par l'ETO lors d'une hypercapnie, nous avons couplé des approches pharmacologiques à de l'histologie fonctionnelle sur des préparations *ex vivo* de système nerveux central de rat nouveau-né.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de mettre en évidence que l'ETO était en mesure, dans une gamme de concentration précise proche de l'exposition clinique, de renforcer la réponse respiratoire au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> et que ce mécanisme nécessitait la présence du diencéphale. Plus précisément nos données d'électrophysiologie et d'immunohistochimie suggèrent que ce mécanisme ait pour origine l'activation des neurones orexinergiques localisés dans l'hypothalamus caudal. L'analyse du profil d'expression de *c-fos* réalisée nous a également permis de montrer que différentes structures du tronc cérébral impliquées dans l'adaptation de la commande centrale respiratoire étaient activées ou suractivées en présence d'ETO. Pour la majorité de ces structures leur activation ou suractivation semblent dépendre de la signalisation orexinergique puisque l'effet de l'ETO est absent lors de l'antagonisation des récepteurs à l'orexine, OX1R et OX2R. A l'inverse, l'activation des noyaux des raphés bulbaires en réponse à l'ETO, persiste lors du blocage de la signalisation orexinergique ; leur participation à l'effet de l'ETO semble donc être indépendante de la stimulation des neurones orexinergiques. Dans la mesure où les structures activées ou suractivées par l'ETO ne semblent pas déficientes chez les patientes Ondine, notre hypothèse est que la récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sous désogestrel implique, au moins en partie, les voies neuronales révélées dans notre étude.

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral permettent donc de progresser dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chez des patientes Ondines et contribuent à mieux appréhender les conditions dans lesquelles les progestatifs de la famille des gonanes pourraient constituer un traitement.