

THÈSE DE DOCTORAT DE UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS CITÉ
École doctorale Galilée – Sciences, Technologie et Santé

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris XIII

réalisée au sein des Unités de recherche

EA2363 - HYPOXIE & POUMON - dirigée par Madame la Professeure Carole PLANES

UMR_S1158 - Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique - dirigée par Monsieur le Professeur Thomas SIMILOWSKI

**ÉTUDE DE LA MODULATION PAR L'ETONOGESTREL,
L'ERYTHROPOÏÉTINE ET LA LEPTINE DE LA REPONSE VENTILATOIRE A
L'HYPERCAPNIE**
**DETERMINATION DE CIBLES THERAPEUTIQUES POTENTIELLES POUR
LE TRAITEMENT DES SYNDROMES D'HYPOVENTILATION ALVEOLAIRE
CENTRALE**

Présentée et soutenue publiquement le 16 novembre 2018 par

Anne-Sophie PERRIN-TERRIN

dirigée par

Madame la Professeure Laurence BODINEAU et Monsieur le Docteur Nicolas VOITURON

JURY

Madame Nathalie CHARNAUX, <i>Professeure des Universités-Praticienne Hospitalière</i>	Présidente
Monsieur Gilles FORTIN, <i>Directeur de Recherche CNRS</i>	Rapporteur
Monsieur Jean-Christophe ROUX, <i>Directeur de Recherche INSERM</i>	Rapporteur
Madame Marie-Pia D'ORTHO, <i>Professeure des Universités-Praticienne Hospitalière</i>	Examinatrice
Madame Laurence BODINEAU, <i>Professeure des Universités</i>	Co-Directrice de thèse
Monsieur Nicolas VOITURON, <i>Maître de Conférences</i>	Directeur de thèse

PUBLICATIONS

Articles publiés

The c-FOS protein detection: a useful tool as a marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo and ex vivo

Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, Frugière A, Richalet JP, Bodineau L, Voituron N
Journal of Visualized Experiments, 2015, 110, e53613

Desogestrel enhance ventilation in Ondine patients. Possible involvement of serotonergic systems

Joubert F, **Perrin-Terrin AS**, Cardot P, Fiamma MN, Frugière A, Similowski T, Straus C, Bodineau L
Neuropharmacology, 2016, 107, pp.339-350

Key brainstem structures involved in strong hypoxic ventilatory depression in one-day-old mice highlight characteristics for modelling breathing network in premature infant

Perrin-Terrin AS*, Joubert F*, Loiseau C*, Cayetanot F, Frugière A, Voituron N, Bodineau L ; * co-premiers auteurs
Frontiers in Physiology, 2016, 7, p.609

Pharmacological but not genetically alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺ central chemosensitivity in postnatal mice

Laouafa S, **Perrin-Terrin AS**, Jeton F, Elliot-Portal E, Tam R, Bodineau L, Voituron N, Soliz J
Respiratory Physiology & Neurobiology, 2017, 242, pp.73-79

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

Loiseau C, Cayetanot F, Joubert F, **Perrin-Terrin AS**, Cardot P, Fiamma MN, Frugière A, Straus, Bodineau L
Current Neuropharmacology, 2017, doi: 10.2174/1570159X15666170719104605

Manuscrit à soumettre

Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-activated cells of the medulla oblongata with an increase in respiratory response to hypercapnia

Jeton F*, **Perrin-Terrin AS***, Soliz J, Del Rio R, Marchant D, Richalet JP, Pichon A#, Bodineau L#, Voituron N# ; * co-premiers auteurs et # co-derniers auteurs
À soumettre au journal *Neurosciences*

Manuscrit en préparation

Central involvement of leptin in the modulation of the ventilatory response to hypercapnia
Perrin-Terrin AS, Barka B, Hui M, Frugiere A, Voituron N*, Bodineau L* ; *co-derniers auteurs

À soumettre au journal *Journal of Physiology*

ABREVIATIONS

A

A1 à A7	Groupements cellulaires noradrénergiques 1 à 7
A5	Région noradrénergique A5
ADP	Adénosine diphosphate
Aica	Artère inférieure cérébelleuse antérieure
AKT	Protéine kinase B
AM	Acidose métabolique
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein complex 1
Aq	Aqueduc de Sylvius
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate

B

B1 à B9	Groupements cellulaires sérotoninergiques 1 à 9
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-derived neurotrophic factor)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BötC	Complexe de Bötzinger

C

C4	4 ^e racine nerveuse cervicale ventrale
C1 à C3	Groupements cellulaires adrénnergiques 1 à 3
c-FOS	FBJ osteosarcoma oncogene homolog (protéine humain/rongeur)
<i>c-fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene homolog (gène rongeur)
CCHS	Syndrome d'hypoventilation centrale congénitale (Congenital CHS)
CCR	Commande centrale respiratoire
ChAT	Acétylcholine transférase (Choline acetyltransferase)
CHS	Syndrome d'hypoventilation centrale (Central hypoventilation syndromes)
cNTS	Subdivision commissurale du noyau du tractus solitaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP response element binding protein

D

DHEAS	Déhydroépiandrostérone sulfate
dIPAG	Subdivision dorsolatérale de la substance grise périaqueducatale
DMH	Noyau hypothalamique dorsomédian
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dPAG	Subdivision dorsale de la substance grise périaqueducatale
DRG	Groupe respiratoire dorsal

E

E	Phase expiratoire
e-pF	Groupe parafacial embryonnaire
E1	Première phase de l'expiration ou expiration précoce
E2	Deuxième phase de l'expiration ou expiration tardive
EMG	Électromyogramme
Epo	Érythropoïétine
Epo-R	Récepteur à l'érythropoïétine
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ETO	Étonogestrel

F

FiCO ₂	Fraction en CO ₂ dans l'air inspiré
FiO ₂	Fraction en O ₂ dans l'air inspiré
f_R	Fréquence respiratoire

G

GABA	Acide gamma-aminobutyrique (Gamma-amino butyric acid)
GABA _A	Récepteur GABA de type A
GABA _B	Récepteur GABA de type B
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Gi	Protéine G inhibitrice de l'Adénylate cyclase
GPR4	Proton-sensing G-protein coupled receptor 4
Gq	Protéine G stimulatrice de la phospholipase C
Gs	Protéine G stimulatrice de l'adénylate cyclase

H

HIC	Hypoxie intermittente chronique
HIF-1 et -2	Hypoxia inducible factors 1 et 2
HRE	Hormone response element

I

I	Phase inspiratoire
IAH	Index d'apnées et d'hypopnées
ICAN	Courant cationique non sélectif activé par le calcium
IMC	Indice de masse corporelle
I _{NAP}	Courant entrant sodique persistant
IntC4	Amplitude de l'activité intégrée de la racine C4

K

KCC2	Co-transporteur potassium-chlorure, isoforme 2
KF	Noyau Kölliker-Fuse
KO	Knock-out

L

LC	Locus coeruleus
LCRa	Liquide céphalo-rachidien artificiel
LepR	Récepteur à la Leptine
LH	Aire hypothalamique latérale
LO-CCHS	CCHS à révélation tardive (Late onset-CCHS)
IPB	Subdivision latérale du noyau parabrachial
LPGi	Noyau réticulaire paragigantocellulaire latéral
LTF	Facilitation à long terme ou Long-term facilitation
LTP	Potentialisation à long terme ou Long-term potentiation

M

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC3/4-R	Récepteur aux mélanocortine de type 3 ou de type 4
MET	Méthysergide
mNTS	Subdivision médiane du noyau du tractus solitaire
mPB	Subdivision médiane du noyau parabrachial

M

mPR Récepteur membranaire à la progestérone

N

N₂ Diazote

NA Noradrénaline

NF-κB Nuclear factor kappa B

NK1R Récepteur à la neurokinine 1

NKCC1 Co-transporteur sodium-potassium-chlorure, isoforme 1

NMDA N-méthyl-D-aspartate

NPARM Mutation non liée à une expansion de répétition polyalanine

nPR Récepteur nucléaire à la progestérone

NPY Neuropeptide Y

NREM Sommeil lent (Non-rapid eye movement sleep)

NTS Noyau du tractus solitaire

O

O₂ Dioxygène

Ob-R Récepteur à la leptine

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

P

P2X Récepteurs ionotropiques à l'ATP

Pa Pression partielle artérielle

PaCO₂ Pression partielle artérielle en CO₂

PAG Substance grise périaqueductale ou Periaqueductal gray

PaLM Subdivision latérale magnocellulaire du noyau paraventriculaire

PaLP Subdivision latérale parvoocellulaire du noyau paraventriculaire

PaO₂ Pression partielle artérielle en O₂

PAQR Récepteurs de la famille des adipoQ

PARM Mutation d'expansion de répétition polyalanine

PB Noyau parabrachial

P_{ET}CO₂ Pression de CO₂ en fin d'expiration

PFA Paraformaldéhyde

pFRG Groupe respiratoire parafacial

P

PGRCM1	progesterone receptor membrane component 1
PH	Aire hypothalamique postérieure
<i>PHO2XB</i>	Paired-like Homeobox 2B (gène humain)
PHOX2B	Paired-like Homeobox 2B (protéine humain/rongeur)
<i>Phox2b</i>	Paired-like Homeobox 2B (gène rongeur)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PiCo	Complexe post-inspiratoire (Postinspiratory complex)
POMC	Pro-opiomélanocortine
Post-I	Phase post-Inspiratoire
PP	Groupe parapyramidal
PPSE	Potentiel post-synaptique excitateur
PPSI	Potentiel post-synaptique inhibiteur
PRE	Progesterone responsive element
pré-BötC	Complexe de pré-Bötzinger
PRG	Groupe respiratoire pontique
PS	Pregnenolone sulfate
PtCO ₂	Pression tissulaire en CO ₂
PtO ₂	Pression tissulaire en O ₂
PVN	Noyau paraventriculaire

R

REM	Sommeil paradoxal (Rapid eye movement sleep)
RMg	Raphé magnus
ROb	Raphé obscurus
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species)
RPa	Raphé pallidus
RTN	Noyau rétrotrépoïde
rVLM	Partie rostrale de la VLM

S

SAOS	Syndrome d'apnées obstructives du sommeil
SEM	Erreur standard à a moyenne
sEpo-R	Récepteur soluble à l'Epo
SNC	Système nerveux central

S

sOb-R	Récepteur soluble à la leptine
SST	Somatostatine
STAT	Signal transducteur and activator of transcription
SubC	Noyau subcoeruleus

T

TASK	Twik-related acid-sensitive K ⁺ channel
TH	Tyrosine hydroxylase
Tph	L-tryptophane hydroxylase

V

VAS	Voies aériennes supérieures
\dot{V}_E	Ventilation minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLM	Noyau réticulaire bulbaire ventro-latéral
vINTS	Subdivision ventro-latérale du noyau du tractus solitaire
vIPAG	Subdivision ventro-latérale de la substance grise périaqueductale
VM	Ventilation mécanique
VNI	Ventilation non invasive
VRG (c, i, r)	Groupe respiratoire ventral (partie caudale, intermédiaire, rostrale)
V_T	Volume courant

Autres

10N	Noyau dorsomédian du nerf vague
12N	Noyau hypoglosse
4V	Quatrième ventricule
5-HT	5-hydroxytryptamine
7N	Noyau facial
IX	Nerf glossopharyngien
X	Nerf vague
XII	Nerf hypoglosse
XI	Nerf spinal ou accessoire
μ OR	μ opioid receptor (récepteurs μ aux opioïdes)
$\alpha 1$ et $\alpha 2$	Récepteurs adrénergiques couplés aux protéines G Gq ($\alpha 1$) et Gi ($\alpha 2$)

ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique des grands processus de la physiologie respiratoire	4
Figure 2 : Vue d'ensemble de l'anatomie de l'appareil respiratoire	6
Figure 3 : Représentation schématique de la distinction des phases du cycle ventilatoire	8
Figure 4 : Représentation schématique de l'origine encéphalique de la commande centrale respiratoire.....	12
Figure 5 : Organisation de la commande centrale ventilatoire.....	12
Figure 6 : Identification des neurones respiratoires selon le moment de décharge.....	15
Figure 7 : Tracés électrophysiologiques illustrant les 6 catégories de neurones respiratoires.	15
Figure 8 : Représentation schématique de la distribution anatomique des principales structures bulbaires et pontiques participant à la CCR	17
Figure 9 : Découverte du préBötC, la structure indispensable à la rythmogenèse respiratoire.	19
Figure 10 : Activation spatio-temporelle des neurones du pFRG et du préBötC en période post-natale	21
Figure 11 : Localisation de PiCo et caractérisation de son activité au sein d'une tranche horizontale de bulbe rachidien	23
Figure 12 : Représentation schématique de la distribution des noyaux du raphé dans le tronc cérébral chez la souris	26
Figure 13 : Représentation sagittale du bulbe rachidien de souris montrant la localisation des 3 générateurs du rythme respiratoire et illustrant la théorie du « triple oscillateur ».....	34
Figure 14 : Représentation schématique de la réponse ventilatoire au CO ₂ chez l'Homme....	37
Figure 15 : Réponse ventilatoire au CO ₂ illustrant les variations différentielles de la fréquence respiratoire et du volume courant chez l'Homme	38
Figure 16 : Réponse ventilatoire au CO ₂ en fonction des stades de vigilance chez l'Homme	39
Figure 17 : Réponse ventilatoire au CO ₂ chez le rat au cours du développement post-natal...	40
Figure 18 : Localisation et innervation des chémorécepteurs périphériques	43
Figure 19 : Organisation cellulaire et innervation des corps carotidiens	44
Figure 20 : Modèle de la transduction du stimulus CO ₂ /H ⁺ dans la cellule chémoréceptrice de type 1 du corps carotidien chez l'adulte.....	46
Figure 21 : Vue d'ensemble de la chémoréception centrale au CO ₂ /H ⁺	47
Figure 22 : Les neurones sérotoninergiques du noyau du Raphé Obscurus sont intrinsèquement sensibles au CO ₂ /H ⁺ et stimulent des motoneurones respiratoires	51
Figure 23 : Les neurones Phox2b-postifs du RTN sont intrinsèquement sensibles au CO ₂ /H ⁺ et stimulent des motoneurones respiratoires	53
Figure 24 : Réponse de l'activité du nerf phrénique à une augmentation de PCO ₂ lors d'une lésion du RTN	53
Figure 25 : Implication des canaux TASK-2 et de GPR4 dans le mécanisme de chémosensibilité intrinsèque aux H ⁺ des neurones du RTN.	56
Figure 26 : Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus sont intrinsèquement sensibles au CO ₂ et stimulent des motoneurones respiratoires	59
Figure 27 : Structure moléculaire de la progestérone (C ₂₁ H ₃₀ O ₂).....	80
Figure 28 : Classes et générations de progestatifs.....	84
Figure 29 : Structure moléculaire du désogestrel et de l'étonogestrel	85
Figure 30 : Modes d'action génomique et non génomique des progestagènes.....	86
Figure 31 : Mode de liaison et effets des modulateurs allostériques sur les récepteurs GABA _A et NMDA.....	93

Figure 32 : Effet de l'alloprégnanolone sur la fréquence respiratoire de préparations <i>ex vivo</i> de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés	94
Figure 33 : Différents types d'effets allostériques positifs des neurostéroïdes sur les récepteurs NMDA et GABA _A	94
Figure 34 : Effet du déhydroépiandrostérone sulfate sur la fréquence respiratoire de préparations <i>ex vivo</i> de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés	95
Figure 35 : Effet d'une administration intraveineuse de doses croissantes de progestérone sur l'activité du nerf phrénique chez le chat adulte.....	102
Figure 36 : Représentation de la \dot{V}_E en fonction de la $P_{ET}CO_2$ chez une femme pendant et après sa grossesse	104
Figure 37 : Réponse ventilatoire au CO ₂ d'une patiente CCHS avant et pendant la prise de désogestrel	105
Figure 38 : Représentation des différents récepteurs de l'Epo.....	111
Figure 39 : Représentation des voies de signalisation intracellulaire activées par la fixation de l'Epo sur l'Epo-R	112
Figure 42 : Immunomarquage des récepteurs à l'Epo chez la souris adulte au niveau du bulbe rachidien	113
Figure 40 : Variables ventilatoires en normoxie chez des souris femelles Tg21 et Tg6.....	116
Figure 41 : Variables ventilatoires en normoxie après injection de sEpo-R (en noir) chez les mâles et les femelles.....	116
Figure 43 : Corrélation entre les concentrations de leptine sérique ou encéphalique et l'indice de masse corporelle	121
Figure 44 : Transport saturable de la leptine à travers la BHE	122
Figure 45 : Le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique par transcytose	125
Figure 46 : Structure des 6 isoformes du récepteur Ob-R chez la souris	129
Figure 47 : Phénotype ventilatoire des souris <i>ob/ob</i>	135
Figure 48 : Effet d'une supplémentation en leptine sur la ventilation des souris <i>ob/ob</i>	136
Figure 49 : Sites et mécanismes d'action potentiels de la leptine afin de moduler la CCR... ..	139
Figure 50 : Schéma du dispositif de pléthysmographie corps entier chez la souris.....	143
Figure 51 : Représentation schématique de la préparation <i>ex vivo</i> de SNC isolé de souris nouveau-née	144
Figure 52 : Schéma du dispositif d'induction des stimuli et d'enregistrement des signaux électrophysiologiques sur la préparation <i>ex vivo</i> de moelle épinière-bulbe rachidien isolé de souris nouveau-née	145

Présentation et objectifs scientifiques du travail doctoral

Les syndromes d'hypoventilation centrale (CHS) sont des pathologies neuro-respiratoires qui résultent de perturbations neurologiques affectant les structures encéphaliques responsables de l'élaboration et de la modulation de la commande centrale respiratoire et la rendent donc déficitaire. Ils se caractérisent par une abolition ou une réduction importante de la chémosensibilité au CO_2/H^+ . L'expression clinique se traduit par une hypoventilation alvéolaire pendant le sommeil mais aussi pendant l'éveil dans des cas sévères et par une altération de la réponse respiratoire à l'hypercapnie. A ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique efficace (Gozal, 1998, Cielo & Marcus, 2014). Ce constat nous a conduit à étudier les mécanismes de modulation de la CCR de base ou lors d'une hypercapnie par 3 molécules distinctes (i.e. l'étonogestrel, l'érythropoïétine, la leptine) dont l'implication dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie préalablement démontrée ou suggérée a éveillé un intérêt thérapeutique.

Les CHS regroupent différentes pathologies dont le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS ou syndrome d'Ondine) et le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (OHS). Le CCHS se caractérise par une diminution importante ou une abolition de la chémosensibilité au CO_2/H^+ se traduisant cliniquement par une hypoventilation profonde pendant le sommeil. Ce syndrome est dû à une mutation du gène *PHOX2B* qui affecte, entre autres, le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire (Amiel *et al.*, 2003). Une observation clinique fortuite a mis en évidence, chez deux patientes adultes souffrant du syndrome d'Ondine, une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ après 18 mois d'exposition à un contraceptif oral, le désogestrel (Straus *et al.*, 2010). En s'appuyant sur les effets facilitateurs déjà connus de la progestérone sur la CCR (Behan *et al.*, 2003), l'hypothèse d'une implication du désogestrel et par extension son métabolite biologiquement actif, l'étonogestrel, dans cette récupération de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie observée a été émise (Loiseau *et al.*, 2014). Les patients OHS se caractérisent par un $\text{IMC} > 30\text{kg/m}^2$, une hypoventilation à l'éveil et au cours du sommeil. Les causes de cette hypoventilation sont multiples et non exclusives i.e. dysfonctionnement des centres respiratoires, coût excessif du travail des muscles respiratoires, altération des systèmes leptinergiques (Pierce & Brown, 2015). Un des modèles animaux reproduisant le phénotype ventilatoire des patients OHS est la souris déficiente en leptine (*ob/ob*). Les travaux expérimentaux réalisés sur ce modèle murin démontrent que la leptine participe à la ventilation basale et module la réponse ventilatoire à l'hypercapnie en ayant une action stimulatrice sur la commande centrale respiratoire (O'Donnell *et al.*, 2000, Bassi *et al.*, 2016). Depuis quelques années, des études s'intéressent à l'implication de l'érythropoïétine dans les régulations centrales de la ventilation. En effet, les données de ces études indiquent que l'érythropoïétine cérébrale est un stimulant respiratoire qui augmente la ventilation basale (Yalcin *et al.*, 2007) mais accentue aussi la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Soliz *et al.*, 2005, Voituron *et al.*, 2014). Les régions encéphaliques impliquées dans ces effets de l'érythropoïétine sont également impliquées dans l'adaptation de la réponse ventilatoire à

l'hypercapnie. Nous avons donc suggéré que l'érythropoïétine pourrait aussi moduler la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

A travers la littérature et les études préliminaires, les données établissent ou suggèrent que la leptine, l'érythropoïétine et l'étonogestrel sont impliquées ou peuvent être impliquées dans les régulations centrales de la ventilation en hypercapnie. Cependant leurs mécanismes d'action ne sont pas bien connus. Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse est d'identifier et décortiquer les mécanismes d'action centraux par lesquels ces trois molécules contribuent à la modulation de la commande centrale respiratoire en hypercapnie. *In fine*, notre objectif a été de dégager d'éventuelles pistes thérapeutiques pour traiter les patients qui souffrent de syndromes d'hypoventilation centrale.

Plan du travail doctoral proposé

Le plan de ce travail est essentiellement basé sur l'étude de la modulation par l'ETO, l'Epo et la leptine de la CCR en condition basale mais aussi de son adaptation à une hypercapnie ou à des situations la modélisant. Les expérimentations menées ont été réalisées des souris sauvages recevant de l'étonogestrel, des souris génétiquement modifiées sous-exprimant l'érythropoïétine (Epo-Tag^h) et déficientes en leptine (*ob/ob*). Nos objectifs étaient d'une part de caractériser l'influence de ces molécules sur la ventilation de base et en hypercapnie et d'autre part de déterminer en parallèle leurs mécanismes d'action.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre 1: La commande centrale respiratoire	2
I. Les conceptions de la respiration de l'Antiquité à nos jours.....	2
II. La ventilation pulmonaire	5
1. Anatomie de l'appareil respiratoire.....	5
a. Les poumons.....	5
b. Les voies aériennes	6
- Les voies aériennes supérieures sont des zones de conduction	7
- Les voies aériennes inférieures sont des zones de conduction et d'échanges gazeux .	7
2. La mécanique ventilatoire	7
a. Les muscles de la ventilation.....	8
b. La mécanique de l'inspiration et de la post-inspiration.....	9
- Ventilation	9
- Échanges gazeux	10
c. La mécanique de l'expiration	10
- Ventilation	10
- Échanges gazeux	11
3. Régulation de la ventilation pulmonaire par une commande centrale composite	11
a. Principale boucle de régulation de la ventilation.....	12
b. Distribution spatio-temporelle de la commande ventilatoire	13
III. Le contrôle automatique de la ventilation pulmonaire : à la découverte de la CCR	13
1. Frise historique de la CCR de l'Antiquité à nos jours.....	13
2. Les acteurs de la CCR : les neurones respiratoires	14
a. Caractérisation	14
b. Classification	15
- Selon les modalités de décharge au cours d'une révolution respiratoire.....	15
- Selon les projections axonales.....	16
c. Localisation des neurones respiratoires	16
IV. Description anatomique et fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire	17
1. Au sein du bulbe rachidien.....	17
a. Le complexe de Pré-Bötzinger (préBötC) : générateur de l'inspiration.....	17
b. Le groupe respiratoire parafacial (pFRG) : générateur de l'expiration.....	19

-	Le noyau rétrotrapézoïde (RTN) associé au groupe respiratoire parafacial (pFRG).	21
c.	Le complexe post-inspiratoire (PiCo) : générateur de la post-inspiration.....	22
d.	Le groupe respiratoire dorsal (DRG).....	23
e.	Le groupe respiratoire ventral (VRG)	24
f.	Les structures cathécholaminergiques	25
-	Noyau réticulaire bulbaire ventro-latéral (VLM)- A ₁ C ₁	25
-	NTS commisural et médian - A ₂ C ₂	25
g.	Les structures sérotoninergiques	26
	Les noyaux des raphés.....	26
-	Raphé Obscurus (ROb – B1).....	27
-	Raphé Pallidus (RPa – B2).....	27
-	Raphé Magnus (RMg – B3)	27
	Le groupe parapyramidal (PP).....	28
2.	Au sein du pont	28
a.	Le groupe respiratoire pontique (PRG)	28
b.	Les structures cathécholaminergiques	29
-	A ₅	29
-	Locus coeruleus (A ₆).....	29
-	Partie dorsale du noyau subcoeruleus (A ₇).....	30
V.	Rôle spécifique de certaines structures supra-pontiques sur le réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique	31
1.	La substance grise périaqueducale (PAG)	31
2.	L'hypothalamus.....	31
a.	L'hypothalamus caudal.....	32
b.	L'hypothalamus rostral.....	32
VI.	Les mécanismes neuronaux de la genèse du rythme respiratoire.....	33
1.	Le modèle d'inhibition réciproque ou modèle réseau	34
2.	Le modèle pacemaker.....	35
3.	Le modèle hybride.....	35
Chapitre 2: Adaptation de la commande centrale respiratoire aux variations de CO₂/H⁺ 37		
I.	Réponse ventilatoire aux variations de CO ₂ /H ⁺	37
1.	Selon l'état de vigilance	39
2.	Selon le développement	40
II.	Le chémoréflexe responsable de la réponse ventilatoire aux variations de CO ₂ /H ⁺ 41	
1.	Définition	41
2.	Les acteurs du chémoréflexe : les chémorécepteurs	41

3.	Chemosensibilité des chémorécepteurs aux <i>stimuli</i> CO ₂ /H ⁺	42
a.	Une sensibilité directe au CO ₂ dissous	42
b.	Une sensibilité au H ⁺ - variations de pH	42
III.	Les chémorécepteurs périphériques	42
1.	Mise en évidence	42
2.	Description anatomique et localisation	43
3.	Description fonctionnelle	45
4.	Mécanisme de la chémoréception périphérique au CO ₂ /H ⁺	45
IV.	Les chémorécepteurs centraux	46
1.	Mise en évidence	46
2.	Description anatomique et localisation	47
3.	Description fonctionnelle	48
4.	Mécanisme de la chémoréception centrale au CO ₂ /H ⁺	49
a.	Au niveau des neurones sérotoninergiques des raphés	50
b.	Au niveau des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG	52
c.	Au niveau des neurones noradrénergiques du LC	57
Chapitre 3: Les syndromes d'hypoventilation centrale, défaillance de la commande centrale respiratoire.....		61
I.	Généralités sur les syndromes d'hypoventilation centrale (CHS)	61
1.	Définition	61
2.	Physiopathologie	61
3.	Prise en charge thérapeutique.....	62
a.	Ventilation mécanique	62
-	La ventilation en pression négative	63
b.	Stimulation diaphragmatique.....	63
c.	Traitements médicamenteux	64
II.	Le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (OHS).....	64
1.	Définition	65
2.	Sévérité.....	65
3.	Épidémiologie	65
4.	Étiologie	66
a.	Obésité et coût excessif du travail des muscles respiratoires	66
b.	Apnées obstructives du sommeil	66
c.	Défaillance de la commande centrale respiratoire et implication de la leptine	67
III.	Le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS).....	70
1.	Définition	70

2.	Sévérité.....	71
3.	Épidémiologie	72
4.	Étiologie	72
a.	Gène <i>PHOX2B</i> et défaillance de la commande centrale respiratoire	72
b.	Des génotypes.....	73
c.	...Aux phénotypes de certains acteurs de la CCR.....	73
d.	...Aux phénotypes respiratoires des patients CCHS	75
e.	Génotype PARM	75
f.	Génotype NPARM	75
IV.	Vers de nouveaux espoirs thérapeutiques.....	76
1.	L'étonogestrel.....	76
2.	L'érythropoïétine.....	77
3.	La leptine.....	77
Chapitre 4: Les systèmes de neurotransmission susceptibles de potentialiser la réponse ventilatoire à l'hypercapnie		79
I.	Le système progestéronergique.....	79
1.	La progestérone	79
a.	Description.....	79
b.	Biosynthèse périphérique et centrale	80
c.	Principaux effets biologiques	81
-	Périphériques	81
-	Centraux	82
2.	Les progestatifs de synthèse	83
a.	Description.....	83
b.	Un progestatif particulier, le désogestrel	84
c.	Les effets biologiques des progestatifs	85
3.	Les récepteurs cibles des progestagènes	85
a.	Les récepteurs nucléaires stéroïdiens des progestagènes	86
-	Description	86
-	Mécanisme d'action.....	87
-	Localisation	87
b.	Les récepteurs membranaires spécifiques des progestagènes	88
mPR.....		89
-	Description	89
-	Mécanisme d'action.....	89
-	Localisation	89
PGRMC1		90

-	Description	90
-	Mécanisme d'action.....	90
-	Localisation	90
c.	Les récepteurs membranaires non spécifiques des progestagènes	91
	Le récepteur GABA _A	91
-	Description	91
-	Mécanismes d'action.....	92
-	Localisation des récepteurs GABA _A au sein du SNC.....	96
	Les récepteurs NMDA.....	96
-	Description	96
-	Mécanismes d'action.....	97
-	Localisation des récepteurs NMDA	100
4.	La progestérone, les progestatifs et la ventilation	100
a.	Effet des progestagènes sur la ventilation basale	100
-	Observations.....	100
-	Action des progestagènes	101
b.	Effet des progestagènes sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	103
-	Observations.....	103
-	Action des progestagènes	104
c.	Pourquoi notre intérêt s'est-il porté sur un progestagène, le désogestrel ? ..	104
II.	Le système érythropoïétinergique	106
1.	L'érythropoïétine.....	106
a.	Description.....	106
b.	Synthèse périphérique et centrale	107
c.	Principaux effets biologiques	109
-	Périphériques.....	109
-	Centraux	109
2.	Le récepteur à l'érythropoïétine	110
a.	Le récepteur transmembranaire à l'Epo (Epo-R)	111
-	Description	111
-	Mécanisme d'action.....	111
-	Localisation	113
b.	Le récepteur soluble à l'Epo (sEpo-R)	113
-	Description	113
-	Mécanisme d'action.....	114
-	Localisation	114

3.	L'érythropoïétine et la ventilation.....	114
a.	Effet sur la ventilation de base	115
-	Observations.....	115
b.	Effet sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	117
-	Observations.....	117
-	Actions.....	117
III.	Le système leptinergique.....	118
1.	La leptine.....	118
a.	Description.....	118
b.	Synthèse périphérique et centrale	120
c.	Principaux effets biologiques	126
-	Périphériques	127
-	Centraux	127
2.	Les récepteurs à la leptine	128
a.	Le récepteur membranaire à la leptine (Ob-R).....	129
	L'isoforme longue Ob-Rb	129
-	Description	129
-	Mécanisme d'action.....	130
-	Localisation	131
	Les isoformes courtes Ob-Ra, c, d, f.....	131
-	Description	131
-	Mécanisme d'action.....	132
-	Localisation	132
b.	Le récepteur soluble à la leptine (sOb-R) – L'isoforme Ob-Re	133
-	Description	133
-	Mécanisme d'action.....	133
-	Localisation	133
3.	La leptine et la ventilation	133
a.	Effet sur la ventilation de base	134
b.	Effet sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	136
-	Actions.....	138
	Méthodologies expérimentales.....	141
I.	Pléthysmographie corps entier	142
II.	Electrophysiologie extracellulaire.....	143
III.	Détection immunohistochimique de la protéine c-FOS.....	146

- Article publié: <i>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</i>	146
1. Résumé	147
2. Texte publié.....	150
Résultats généraux	159
Partie 1: Modulation de la ventilation en normocapnie par l'étonogestrel	160
I. Article publié : <i>Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems</i>	161
1. Résumé	162
2. Texte publié.....	166
II. Article publié : <i>Current perspectives for the use of gonane progesterone drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes</i>	178
1. Résumé	179
2. Texte publié.....	184
Partie 2: Implication de l'érythropoïétine dans la ventilation en hypercapnie	205
I. Article publié : <i>Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺ central chemosensitivity in postnatal mice</i>	206
1. Résumé	207
2. Texte publié.....	210
II. Article à soumettre : <i>Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-activated cells of the medulla oblongata with an increase in respiratory response to hypercapnia</i>	217
1. Résumé	218
2. Texte à soumettre	223
Partie 3: Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie	255
Implication centrale de la leptine dans la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie	256
Objectif.....	256
Contexte scientifique.....	256
Matériel et méthodes	257
Résultats et discussion.....	262
I. La déficience en leptine modifie le phénotype ventilatoire des souris <i>ob/ob</i> par rapport aux WT	262
1. Phénotype ventilatoire des souris <i>ob/ob</i> et WT en normocapnie	262
2. Réponses ventilatoires au CO ₂ des souris <i>ob/ob</i> et WT	264
a. La réponse ventilatoire à l'hypercapnie-normoxique des souris <i>ob/ob</i> et WT	265

b.	Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique entre les souris <i>ob/ob</i> et WT	266
c.	La réponse ventilatoire à l'hypercapnie-hyperoxique des souris <i>ob/ob</i> et WT 266	
d.	Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique entre les souris <i>ob/ob</i> et WT	267
e.	Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique et à l'hypercapnie-hyperoxique des souris <i>ob/ob</i> et WT	267
II.	La déficience en leptine modifie l'expression de <i>c-fos</i> de base et induite par l'hypercapnie chez les souris <i>ob/ob</i> par rapport aux WT	269
1.	Conséquence de l'absence de leptine sur l'expression de <i>c-fos</i> en normocapnie 270	
2.	Induction de l'expression de <i>c-fos</i> par l'hypercapnie chez les souris WT et <i>ob/ob</i> 274	
3.	Comparaison du niveau d'expression de <i>c-fos</i> en hypercapnie entre les souris WT et les souris <i>ob/ob</i>	276
	Conclusion.....	278
	Discussion et perspectives	280
	Considérations méthodologiques	281
I.	La préparation de système nerveux central isolée, un modèle pour accéder à la CCR 281	
II.	La détection immunohistochimique de c-FOS comme marqueur d'activité neuronale 283	
III.	La technique de pléthysmographie corps entier comme mesure des variables ventilatoires	284
IV.	L'utilisation de souris transgéniques Epo-Tag ^h et <i>ob/ob</i>	286
V.	Expositions pharmacologiques : de la physiologie à l'expérimentation	287
1.	Exposition au désogestrel et à l'ETO, principal métabolite actif.....	287
2.	Exposition à la leptine	287
	Partie 1: Modulation de la ventilation en normocapnie par l'ETO.....	289
I.	Le désogestrel améliore la ventilation de base chez des patientes CCHS.....	289
II.	L'ETO exerce un effet facilitateur sur la f_R de base par des mécanismes bulbaires 290	
III.	Perspectives.....	293
	Partie 2: Implication de l'Epo dans la ventilation en hypercapnie.....	296
I.	La déficience chronique en Epo modifie la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez l'adulte.....	296
II.	Mécanismes sous tendant les effets de l'Epo sur la chémosensibilité au CO ₂ /H ⁺ chez l'adulte.....	297
III.	L'excès ou la déficience chronique d'Epo ne modifie pas la chémosensibilité centrale au CO ₂ /H ⁺ au 4 ^e jour post-natal (P4)	301

IV. Perspectives.....	302
Partie 3: Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie	305
I. Les souris <i>ob/ob</i> présentent une hypoventilation basale	305
II. Les souris <i>ob/ob</i> répondent à l'hypercapnie à un seuil de CO ₂ plus bas par rapport aux souris WT	306
III. Les souris <i>ob/ob</i> ont une réponse ventilatoire à l'hypercapnie diminuée par rapport aux souris WT	307
IV. La diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie observée chez les souris <i>ob/ob</i> ne semble pas dépendre de mécanismes périphériques.....	308
V. Cartographie des régions encéphaliques de souris <i>ob/ob</i> en hypercapnie	309
VI. Perspectives.....	313
Annexe	316
- Article publié : <i>Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants</i>	316
1. Résumé	317
2. Texte publié.....	323
RÉSUMÉ	337
BIBLIOGRAPHIE	338

INTRODUCTION

Nous rappellerons dans le premier chapitre introductif les différents aspects de la fonction ventilatoire chez les mammifères en décrivant l'anatomie de l'appareil respiratoire, la mécanique ventilatoire et sa régulation par une commande centrale dont nous avons abordé exclusivement la composante automatique. Le réseau neuronal respiratoire ainsi que d'autres structures pouvant l'influencer ont été décrits afin de donner une vision générale des groupes neuronaux impliqués dans l'élaboration et la modulation de la commande centrale respiratoire, nécessaire à la bonne lecture de ce travail.

Dans le second chapitre nous nous sommes intéressés à la régulation chimique de la ventilation et particulièrement à la réponse à l'hypercapnie. Nous avons d'abord décrit la réponse ventilatoire à l'hypercapnie puis décortiqué les mécanismes périphériques et centraux identifiés à ce jour comme responsables de cette réponse.

Le troisième chapitre s'est attaché à exposer certaines pathologies présentant un défaut de la commande centrale respiratoire, les syndromes d'hypoventilation centrale, et s'est conclu par un bref aperçu des pistes thérapeutiques engageant les trois molécules distinctes que sont l'étonogestrel, l'érythropoïétine et la leptine, dont l'implication dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie a été préalablement démontrée ou suggérée et qui pourraient être envisagées dans le traitement des pathologies présentant un défaut de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie dépeintes en amont.

Nous terminerons par un quatrième chapitre décrivant ces trois molécules d'intérêt susceptibles de potentialiser la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Nous nous sommes proposé d'aborder chacune d'entre elles, leurs récepteurs et mécanismes d'action, de dépendre quelques-uns de leurs principaux effets biologiques et de détailler spécifiquement leurs effets sur la ventilation.

Chapitre 1: La commande centrale respiratoire

L'étude de la commande centrale respiratoire ne pouvait se concevoir sans réunir préalablement quelques connaissances de physiologie respiratoire.

I. Les conceptions de la respiration de l'Antiquité à nos jours

L'observation du lien entre la vie et la respiration a suscité dès l'Antiquité de multiples interrogations. C'est à cette période que la science physiologique va connaître un développement considérable avec l'usage systématique des dissections et expérimentations animales et humaines qui ont permis la mise en place des bases de notre compréhension de la mécanique respiratoire et des échanges gazeux. Pour nous, l'acte de respirer, c'est-à-dire le flux d'air entrant et sortant des cavités nasale et buccale, sert évidemment le but de la respiration, c'est-à-dire l'échange vital de dioxygène (O₂) et de dioxyde de carbone (CO₂) entre un organisme et son environnement. Cependant, notre compréhension de la respiration est le résultat d'une longue succession de conceptions qui ont été tour à tour explorées sans qu'aucune ne l'emporte de manière décisive sur l'autre, à la recherche de ce qui justifiait l'absolue nécessité de l'air pour la vie (Debru, 2000).

Aristote (IV^e siècle avant J.-C.), philosophe et naturaliste, substitue la question du pourquoi des fonctions à celle du comment : « bien peu de naturalistes ont traité de la respiration ; et presque aucun parmi ceux qui ont étudié cette fonction, n'a recherché à quelle fin elle a été donnée aux animaux » (Aristote, 1965). Se fondant sur une multitude de dissections effectuées sur les animaux, Aristote formule la théorie de régulation thermique de la respiration. Selon cette théorie, l'air nouveau qui pénètre dans le corps a pour fonction de le rafraîchir et par là de maintenir la chaleur animale : « La vie est à ces conditions dans les animaux qui respirent » (Aristote, 1965). En l'absence d'autre élément d'analyse comme la composition chimique de l'air, l'analogie avec le maintien de la flamme tenait lieu d'explication. Cinq siècles plus tard, le médecin grec Claudius Galien (II^e siècle après J.-C.) affirmait que l'organisme retirait de l'air inspiré, les « esprits vitaux », et rejetait avec l'air expiré des « vapeurs fuligineuses » (Debru, 1996). Il a énuméré les voies et les organes de la respiration puis les muscles mis en jeu et enfin étudié l'action des paires de nerfs crâniens et spinaux sur la contraction de ces muscles. Andreas Vesalius (1515-1564), dans son traité *De humani corporis fabrica* démontra expérimentalement le mécanisme de la ventilation. Le modèle était porcin et l'insufflation s'effectuait « au travers d'un roseau introduit dans le canal respiratoire jusqu'à ce que les poumons se déplissent fournissant à l'animal l'air qu'il lui faut pour vivre » (Gay, 2005). Ces expérimentations ne seront reprises avec la notion d'échanges gazeux associée au phénomène mécanique qu'un siècle plus tard par Robert Hooke (1635–1703) qui, utilisant un modèle de poulet étranglé puis réanimé par ventilation manuelle au soufflet, démontra que « ce n'est pas

l'arrêt de la ventilation en lui-même qui est responsable du décès mais c'est le manque d'air frais » (West, 2014b). Ce premier pas dans la physiologie de la respiration sera complété par Joseph Black (1728–1799) qui mit en évidence dans l'air expiré un produit « méphitique » que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de dioxyde de carbone (CO_2) et par Joseph Priestley (1733–1804) qui isola le dioxygène (O_2), « the vital or dephlogisticated air » (West, 2014a). Enfin, Antoine Laurent de Lavoisier (1743–1794) démontra que la respiration est comparable à une combustion lente qui se produit dans les poumons, consomme de l' O_2 , rejette du CO_2 et de l'eau et dégage de la chaleur qui se diffuse dans l'organisme (Karamanou & Androustos, 2013). A partir du 20^e siècle, s'ajoute au concept de la respiration relativement abouti de Lavoisier, le concept de l'homéostasie (Brown & Fee, 2002) introduit en 1926 par Walter Cannon (pressenti de nombreuses fois pour l'attribution du prix Nobel) qui a décrit « la fight-or-flight response » c'est-à-dire la capacité des organismes vivants à survivre dans des environnements stressants et variables symbolisant leur capacité à maintenir un environnement interne stable. Il forgea sur le socle de cette observation le concept d'homéostasie, définissant le maintien, par des systèmes de contrôles physiologiques, des conditions de relative stabilité interne au sein des organismes. La ventilation participe à ce maintien et s'inscrit comme une grande fonction physiologique indispensable à la vie.

Aujourd'hui, avec l'apport de ces différentes conceptions, il apparaît que la respiration est subordonnée au fonctionnement de deux processus successifs, la ventilation pulmonaire et les échanges gazeux. La ventilation pulmonaire ou respiration physiologique est un phénomène mécanique qui définit la mobilisation cyclique d'un volume d'air depuis le milieu extérieur vers les alvéoles pulmonaires et assure ainsi le renouvellement des gaz alvéolaires. Les échanges gazeux définissent les processus impliqués pour transporter le gaz métaboliquement actif de l'air ambiant, l' O_2 , depuis l'espace alvéolaire vers la mitochondrie afin d'assurer la respiration cellulaire et, dans le sens inverse, le CO_2 , afin d'évacuer le déchet de la respiration cellulaire (Figure 1). C'est cette dernière qui sert *in fine* le but ultime de la respiration en régénérant, principalement par le biais de la chaîne respiratoire mitochondriale, la source d'énergie cellulaire, l'adénosine triphosphate, nécessaire au fonctionnement de notre organisme à tous les échelons (réactions chimiques du métabolisme, division cellulaire, transport actif d'espèces chimiques à travers les membranes biologiques), par combustion des glucides et des lipides en présence d' O_2 . Ce processus métabolique consomme de l' O_2 et produit du CO_2 . Ainsi la ventilation répond aux besoins d'un apport en O_2 aux cellules et d'élimination du CO_2 , déchet métabolique. La ventilation et les échanges gazeux sont donc régulés et adaptés constamment en fonction des différents besoins métaboliques de l'organisme ou aux conditions environnementales afin de maintenir l'homéostasie de son milieu intérieur.

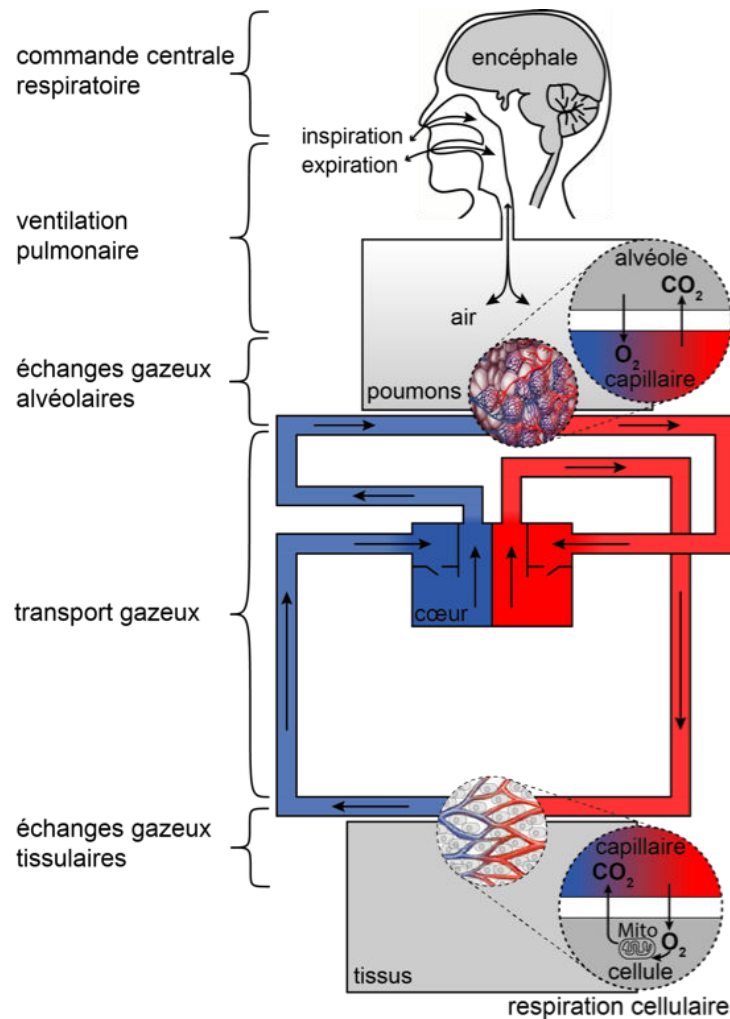


Figure 1 : Représentation schématique des grands processus de la physiologie respiratoire
La ventilation pulmonaire est un processus mécanique qui définit la mobilisation cyclique via l'inspiration et l'expiration d'un volume d'air depuis le milieu extérieur vers les alvéoles pulmonaires. Ce processus est sous le contrôle d'une commande centrale respiratoire. Les échanges gazeux définissent les processus impliqués dans les échanges des gaz depuis l'espace alvéolaire vers la mitochondrie et inversement. Les premiers échanges gazeux s'effectuent à travers la barrière alvéolo-capillaire pulmonaire. Les gaz sont ensuite transportés dans le sang via la circulation sanguine. Les seconds échanges gazeux ont lieu au niveau tissulaire par diffusion capillaro-tissulaire puis au sein de la mitochondrie. Mito : mitochondrie. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

Dans ce travail doctoral, nous nous intéresserons exclusivement à la ventilation chez les vertébrés, aux mécanismes de son contrôle et de son adaptation à l'hypercapnie.

Nota bene : Nous confondrons dans la suite du manuscrit le terme de ventilation avec celui de respiration, au sens de la respiration physiologique, comme le fait usuellement la communauté scientifique.

II. La ventilation pulmonaire

La ventilation pulmonaire est un processus physiologique cyclique et ininterrompu qui définit les mouvements d'air dans l'échangeur pulmonaire. Nous verrons successivement comment l'anatomie et la structure de cet échangeur permettent d'assurer la ventilation pulmonaire, comment la mécanique ventilatoire permet de faire parvenir de l'air depuis le milieu extérieur jusqu'aux alvéoles, comment se font les échanges gazeux permettant d'assurer la respiration cellulaire et enfin comment la ventilation est contrôlée et adaptée en fonction des besoins métaboliques.

1. Anatomie de l'appareil respiratoire

a. Les poumons

Les poumons sont contenus dans la cage thoracique, délimitée en arrière par le rachis dorsal, en avant par le sternum, latéralement par les 12 paires de côtes et les muscles intercostaux et en bas par le diaphragme (Figure 2). Le parenchyme pulmonaire est élastique et rend les poumons extrêmement distensibles. Les poumons sont accolés à la paroi thoracique par l'intermédiaire d'une membrane séreuse, la plèvre, dont le feuillet viscéral et le feuillet pariétal forment un espace virtuel où règne une pression négative. Cette dépression pleurale permet de maintenir les poumons contre la paroi thoracique lors du cycle ventilatoire en garantissant que les forces pulmonaires générées par la contraction ou le relâchement des muscles respiratoires et qui s'exercent sur la paroi thoracique soient transmises à l'ensemble du parenchyme pulmonaire.

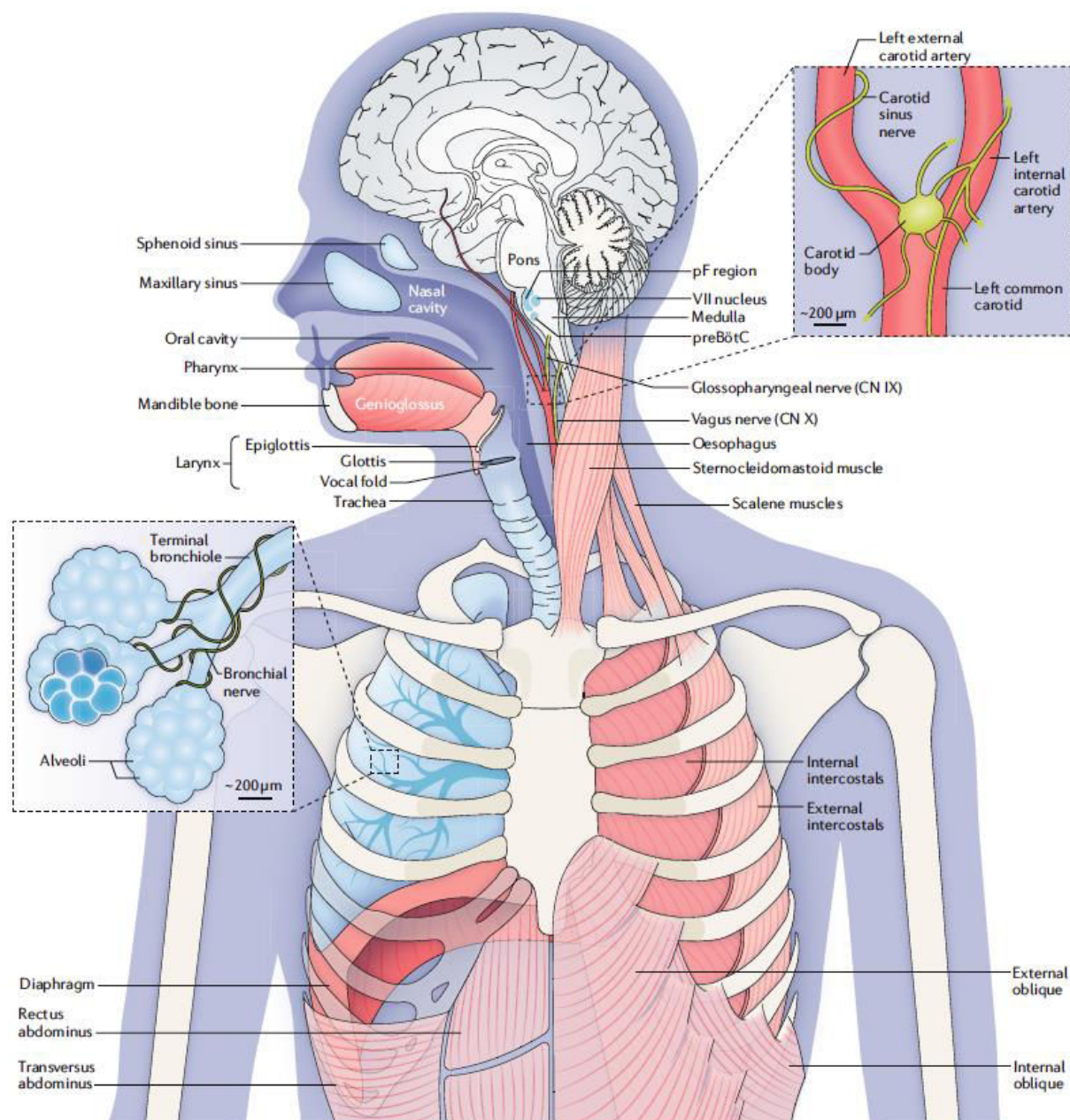


Figure 2 : Vue d'ensemble de l'anatomie de l'appareil respiratoire
 Représentation schématique des principaux muscles ventilatoires et des principales structures qui constituent les voies aériennes supérieures et inférieures. Le contrôle nerveux de la ventilation repose essentiellement sur un réseau de neurones bulbo-pontiques et sa régulation en partie sur les chémorécepteurs périphériques (corps carotidiens) et centraux (RTN noté ici pF region). D'après (Del Negro *et al.*, 2018).

b. Les voies aériennes

Les voies aériennes assurant le passage de l'air lors du cycle ventilatoire entre le milieu extérieur et les poumons se divisent anatomiquement par les voies aériennes supérieures (VAS) composées des cavités nasale et buccale, du pharynx et du larynx et par les voies aériennes inférieures appelées aussi arbre bronchique, comprenant la trachée et les bronches de la 1^{re} à la 23^e génération (Figure 2). D'un point de vue fonctionnel, il est à noter quelques distinctions.

- **Les voies aériennes supérieures sont des zones de conduction**

Elles véhiculent l'air inhalé et ne participent pas aux échanges gazeux. Les cavités nasale et buccale ainsi que le pharynx permettent le réchauffement, l'humidification et la filtration de l'air inspiré. Le larynx a pour fonction d'empêcher les aliments de pénétrer dans la trachée. Le pharynx est un conduit souple « collabable » encadré de deux structures rigides, en haut la cavité nasale, en bas le larynx. Cette déformabilité pharyngée répond aux besoins des fonctions de phonation et de déglutition mais constitue paradoxalement un élément de faiblesse pour la ventilation, nous l'expliciterons lorsque nous évoquerons le rôle important des VAS dans la mécanique ventilatoire.

- **Les voies aériennes inférieures sont des zones de conduction et d'échanges gazeux**

En effet, les voies aériennes inférieures peuvent être divisées en deux parties, selon qu'elles participent ou non aux échanges gazeux.

La zone de conduction comprenant la trachée, les bronches, les bronchioles puis les bronchioles terminales, ne participe pas aux échanges gazeux et a pour fonction principale de véhiculer l'air inspiré entre le milieu extérieur et les alvéoles mais aussi de purifier l'air inspiré. En effet, l'épithélium bronchique est tapissé de cellules caliciformes qui sécrètent le mucus et de cellules ciliaires qui permettent le déplacement du mucus vers le pharynx. Ces cellules jouent un rôle fondamental dans la clairance muco-ciliaire et participent à la lutte contre les agressions extérieures en évacuant les particules se déposant sur les bronches qui sont alors captées par le tapis muco-ciliaire et dégluties.

La zone des échanges gazeux s'étend des bronchioles respiratoires aux alvéoles pulmonaires. Ces multiples divisions assurent une surface d'échange alvéolaire importante pour un volume restreint.

2. La mécanique ventilatoire

Si l'on s'en tient à la dynamique du débit gazeux, la ventilation pulmonaire se compose de deux phases : l'inspiration et l'expiration (Figure 3). En réalité, si l'on tient compte de l'activité musculaire, la ventilation est un acte moteur qui se décompose en trois phases successives : l'inspiration, la phase post-inspiratoire et l'expiration (Figure 3).

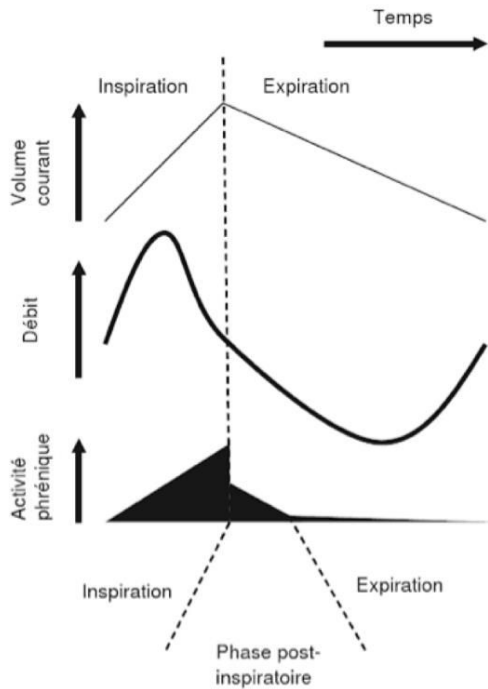


Figure 3 : Représentation schématique de la distinction des phases du cycle ventilatoire

Les tracés de débit et de volume courant ne permettent d'identifier que deux phases au cycle ventilatoire, l'inspiration et l'expiration. D'un point de vue neurophysiologique en se basant par exemple sur l'activité du nerf phrénique, on distingue en réalité trois phases : l'inspiration, la post-inspiration et l'expiration. L'inspiration correspond à une activité importante du nerf phrénique. La post-inspiration correspond au freinage de l'expiration par la persistance d'une activité modérée du nerf phrénique. L'expiration est passive au repos chez l'Homme mais elle peut s'accompagner d'une contraction des muscles abdominaux à l'effort. Chez certains animaux comme les rongeurs par exemple, l'expiration est toujours active. D'après (Straus & Fiamma, 2009).

La mobilisation d'un volume d'air dans les voies aériennes au cours d'une révolution ventilatoire introduit la notion de débit ventilatoire. Pour générer un débit ventilatoire à travers les voies aériennes, une différence de pression entre l'entrée et la sortie de ces voies doit être appliquée, cette différence de pression étant qualifiée de pression motrice. Lors de la ventilation, les pressions mises en jeu sont la pression atmosphérique en amont et la pression intra-pulmonaire en aval. D'après la loi de Boyle-Mariotte qui stipule qu'à température constante, la pression d'un gaz est inversement proportionnelle à son volume, la ventilation est fonction des variations de volume et de pression. Il faut donc agir sur les volumes pulmonaires pour modifier la pression intra-pulmonaire. Ce sont ces modifications de pression qui vont permettre d'assurer l'entrée ou la sortie d'air dans les poumons, les gaz s'écoulant des zones de plus hautes pressions vers les zones de plus basses pressions afin d'équilibrer les pressions de part et d'autre du conduit respiratoire.

Ce sont les structures musculaires de la paroi thoracique qui permettent de faire varier le volume thoracique (Figure 2, page 6) et par extension le volume pulmonaire. En effet, les poumons sont solidaires de la cage thoracique et leurs propriétés élastiques s'additionnent à celles de la paroi thoracique.

a. Les muscles de la ventilation

D'un point de vue fonctionnel, les muscles respiratoires ou « pompes » peuvent être divisés en muscles inspiratoires et expiratoires (Figure 2, page 6). L'appareil ventilatoire est activé par la contraction rythmique de ces muscles qui sont les principaux effecteurs de la pompe respiratoire et sont innervés par des motoneurones spinaux. Cette pompe respiratoire doit être coordonnée avec les VAS qui jouent le rôle de valve par rétrécissement ou

élargissement de la lumière pharyngo-laryngienne, régulant ainsi le débit ventilatoire. Ce sont d'autres muscles qui participent à la régulation du débit ventilatoire en contrôlant la résistance des VAS, les muscles des VAS, principalement pharyngés, dits « dilatateurs des VAS » (Figure 2, page 6). Ils sont innervés par des motoneurons crâniens. Ces muscles « dilatateurs » sont connectés aux structures osseuses adjacentes et/ou fusionnent avec d'autres muscles linguaux et pharyngés qui jouent aussi un rôle au cours du cycle ventilatoire.

b. La mécanique de l'inspiration et de la post-inspiration

- Ventilation

L'inspiration résulte de la contraction des muscles inspiratoires qui vont permettre d'augmenter les volumes thoracique et pulmonaire. L'ensemble de ces muscles regroupe le diaphragme, les muscles intercostaux externes et les muscles inspiratoires accessoires regroupant en leur sein les sterno-cléido-mastoïdiens et les scalènes. Le diaphragme, principal muscle inspiratoire innervé par le nerf phrénique, va s'abaisser en se contractant et donc augmenter le volume thoracique en refoulant vers le bas le contenu abdominal. La contraction des muscles intercostaux externes, innervés par les nerfs intercostaux, déplace les côtes en haut, en avant et latéralement, induisant une élévation des côtes et provoquant une augmentation du diamètre antéro-postérieur de la cavité thoracique. Les muscles inspiratoires accessoires, innervés respectivement par le 11^e nerf crânien et des branches des plexus cervical et brachial, ne sont mobilisés qu'à l'effort ou en cas de détresse respiratoire et concourent à stabiliser la cage thoracique et à majorer le volume thoracique. L'augmentation des volumes thoracique et pulmonaire induit une diminution de la pression intra-pulmonaire suffisante pour induire un déplacement d'air dans les poumons puisqu'elle devient inférieure à la pression atmosphérique. Comme la pression intra-pulmonaire est en-dessous de la pression atmosphérique, on dira qu'elle est négative. Pour l'inspiration, on parle donc de ventilation en pression négative. Afin que le débit inspiratoire ne soit pas limité par un collapsus pharyngé, il y a principalement une contraction des muscles dilatateurs qui le composent. Cette contraction précède celle des muscles inspiratoires et permet au flux inspiratoire de rencontrer la moindre résistance possible lors de son passage à travers les voies aériennes supérieures afin de limiter l'énergie dépensée par les muscles de la pompe ventilatoire.

La post-inspiration qui suit l'inspiration favorise d'une part l'échange gazeux alvéolaire en augmentant la durée de séjour de l'air dans les poumons et d'autre part le flux d'air expiratoire laminaire qui diminue la probabilité d'effondrement des VAS. Elle est le lieu principal d'expression de comportements moteurs nécessitant un ajustement respiratoire tels la vocalisation, la déglutition (Gestreau *et al.*, 1996, Gestreau *et al.*, 2005, Bautista *et al.*, 2010). Au niveau de la pompe ventilatoire, elle est caractérisée par un relâchement des muscles inspiratoires de la pompe respiratoire. Cependant, il peut persister une activité résiduelle post-inspiratoire sur le nerf phrénique, permettant d'éviter un retour brutal à l'état de repos du

diaphragme, susceptible d'induire un collapsus alvéolaire. Cette activité résiduelle est particulièrement visible chez les gros mammifères comme le chat, mais moindre chez les plus petits mammifères comme la souris (Paton, 1996). Au niveau des VAS, il y a principalement une adduction partielle des cordes vocales, induite par une décharge décroissante du nerf laryngé récurrent, qui provoque une légère pression positive expiratoire contribuant également à éviter un collapsus alvéolaire et à maximiser le temps des échanges gazeux alvéolaires (Bautista et al., 2010). Le relâchement des muscles abducteurs du pharynx participe également à réduire le diamètre interne des VAS pendant la post-inspiration

- **Échanges gazeux**

L'air ainsi inspiré, contenant les gaz métaboliquement actifs, l'O₂ et le CO₂, termine sa course au sein de l'alvéole où les premiers échanges gazeux vont s'effectuer à travers la barrière alvéolo-capillaire pulmonaire. La direction et le volume des mouvements de gaz vont être déterminés par leurs pressions partielles au sein des deux compartiments. En effet, un gaz diffuse depuis un compartiment où sa pression partielle est élevée vers un compartiment où sa pression partielle est basse ; et plus la pression qu'il exerce sur un compartiment liquidien est importante plus il se dissoudra dans ce compartiment (Loi de Henry). La pression partielle en O₂ est supérieure dans l'air alvéolaire à ce qu'elle est dans le sang des capillaires pulmonaires. Sa diffusion se fait dans le sens alvéole vers capillaires. Le CO₂, négligeable dans l'air inspiré (environ 0,04% de CO₂ versus 20,95% d'O₂), arrive jusque dans les alvéoles mais ne passe pas la barrière alvéolo-capillaire car sa pression partielle est bien plus importante dans les capillaires que dans les alvéoles. L'O₂ est ensuite transporté dans le sang par convection, à l'état dissous ou combiné ; enfin, les échanges gazeux se poursuivent au niveau tissulaire par diffusion capillaro-tissulaire selon les mêmes principes physiques.

c. La mécanique de l'expiration

- **Ventilation**

Les muscles inspiratoires sont indissociables des structures osseuses qui constituent la cage thoracique. Ces structures osseuses, déformables lors de l'inspiration sous l'effet des contractions des muscles inspiratoires, possèdent des propriétés élastiques qui permettent à la cage thoracique de revenir spontanément et passivement à sa position d'équilibre. Chez l'Homme, l'expiration au repos constitue un acte passif. À la fin de l'inspiration, les muscles inspiratoires se relâchent, entraînant la cavité thoracique à revenir spontanément à sa position initiale. Ce repositionnement induit une diminution des volumes thoracique et pulmonaire et donc une augmentation de la pression intra-pulmonaire qui devient supérieure à la pression atmosphérique, entraînant alors l'expulsion des gaz présents dans les alvéoles. Pour l'expiration, on parle alors de ventilation en pression positive. Au niveau des VAS, on a essentiellement une constriction des muscles pharyngiens, innervés par la branche

pharyngienne du nerf X, qui réduit le diamètre interne des VAS et permet la conservation d'un volume résiduel pulmonaire.

En cas d'effort important, l'expiration est forcée et devient un phénomène actif. Les muscles expiratoires regroupant les muscles abdominaux et les intercostaux internes, innervés principalement par les nerfs intercostaux correspondants, se contractent. La contraction des muscles abdominaux entraîne une compression des viscères permettant de pousser le diaphragme vers le thorax et la contraction des muscles intercostaux internes entraîne une diminution du volume de la cavité thoracique. Cela contribue à augmenter la pression intrapulmonaire de manière plus importante que lors de l'expiration passive et à évacuer alors un volume plus important en gaz alvéolaire hors des poumons. Chez les rongeurs, l'expiration au repos est active car elle s'accompagne d'une contraction des muscles expiratoires. Elle s'apparente alors à l'expiration forcée chez l'Homme.

- **Échanges gazeux**

Les échanges gazeux se font dans le sens inverse de l'inspiration, selon les mêmes principes physiques. Il en résulte que le CO₂, déchet de la respiration cellulaire, est évacué de la circulation sanguine où il se trouve sous une forme dissoute ou combinée vers les alvéoles et que l'O₂ qui n'a pas été utilisé par les processus métaboliques demeure dans le sang à l'état de réserve.

3. Régulation de la ventilation pulmonaire par une commande centrale composite

Les muscles respiratoires présentent la particularité de devoir maintenir une activité phasique tout au long de l'existence afin d'assurer la ventilation pulmonaire de façon ininterrompue.

La contraction phasique des muscles respiratoires est gouvernée par une commande extrinsèque cérébrale et composite qui permet le maintien de l'homéostasie en adaptant la ventilation lors de situations physiologiques (exercice), pathologiques (hypercapnie, hypoxie) ou environnementales (altitude) (Feldman *et al.*, 2003).

La première composante est automatique, inconsciente et vitale car elle assure la pérennité de la ventilation tout au long de la vie en générant le rythme respiratoire et ses adaptations homéostatiques. Elle prend sa source dans le tronc central, au niveau d'un réseau neuronal bulbo-pontique (Figure 4).

La deuxième composante est volontaire, consciente ou émotionnelle, d'origine supra-pontique et corticale, et permet des modulations de la ventilation en fonction des états de vigilance et lors d'activités cognitives (apprentissage, attention, etc.), volontaires (phonation, apnée, etc.) ou comportementales (rires, pleurs, etc.). Elle se combine à la première composante en la modulant (Figure 4).

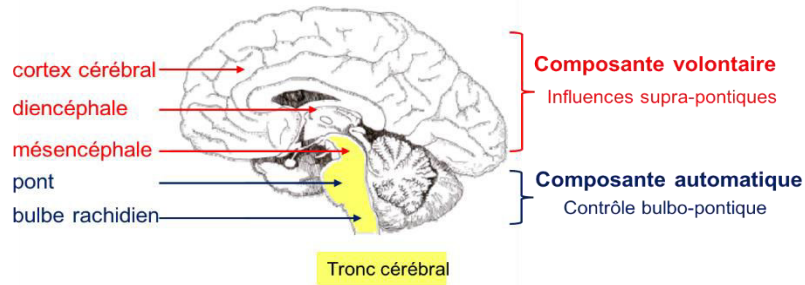


Figure 4 : Représentation schématique de l'origine encéphalique de la commande centrale respiratoire

La commande centrale respiratoire est constituée d'une composante automatique provenant du pont et du bulbe rachidien et d'une composante volontaire issue du mésencéphale, du diencephale et du cortex cérébral. Adaptée à partir d'éléments sans source. © Tous droits réservés.

a. Principale boucle de régulation de la ventilation

Le **système de contrôle** responsable de l'automatisme ventilatoire (Feldman et al., 2003) comporte trois acteurs principaux, des **récepteurs** (**chémorécepteurs** et **mécanorécepteurs**) percevant les variations des paramètres à réguler (O_2 , CO_2 , pH) qu'ils transmettent à des **centres respiratoires**, largement connectés à **d'autres formations nerveuses**, où une réponse adaptée est générée puis transmise à des **effecteurs**, les **muscles respiratoires** « pompe » et des VAS qui, en mobilisant les gaz dans les poumons, vont assurer la ventilation (Figure 5).

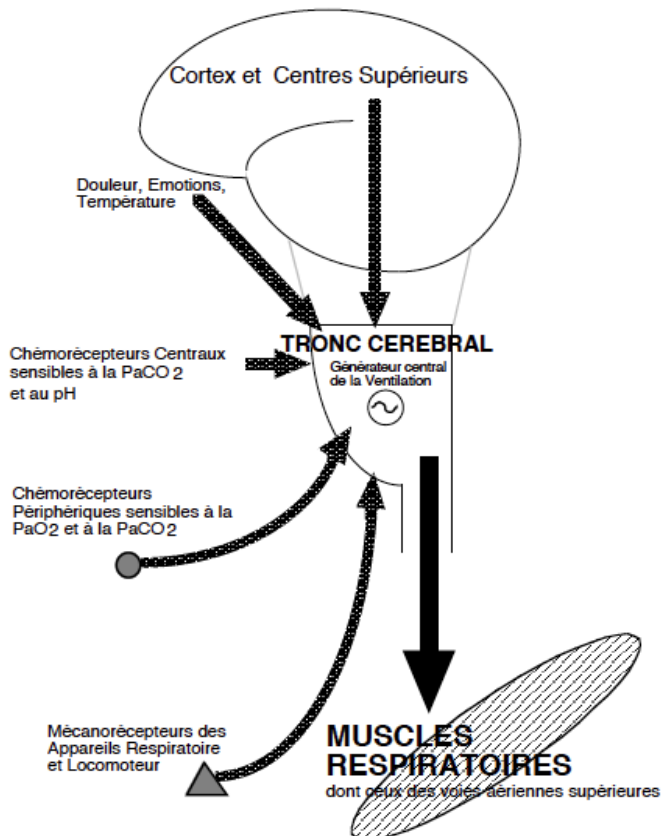


Figure 5 : Organisation de la commande centrale ventilatoire

La ventilation doit s'adapter à des multiples contraintes métaboliques ou mécaniques. La régulation de la commande ventilatoire motrice dépend de l'intégration de multiples signaux afférents ici représentés (influences corticales, supra-pontiques, chémorécepteurs périphériques et centraux, mécanorécepteurs) reçus au niveau du réseau respiratoire bulbo-pontique où se trouvent les différents générateurs du rythme respiratoire. *In fine* cette commande active d'abord les muscles des VAS qu'elle stabilise, ce qui permet d'éviter leur collapsus puis, après un petit délai, les muscles respiratoires. D'après (Straus & Fiamma, 2009)

Il existe **deux principales boucles de régulation chimique** faisant intervenir les trois acteurs principaux du système de contrôle automatique de la ventilation cités ci-dessus : la **réponse à l'hypercapnie** que nous détaillerons dans ce manuscrit puisqu'elle fait l'objet de notre intérêt et la **réponse à l'hypoxémie**. Le CO₂ est le plus puissant stimulus de régulation de la ventilation. La ventilation augmente de manière linéaire avec la capnie afin d'éliminer le CO₂. L'hypoxémie constitue un stimulus de la ventilation de moindre importance que l'hypercapnie, la ventilation augmente de manière hyperbolique à mesure que baisse la PaO₂.

b. Distribution spatio-temporelle de la commande ventilatoire

La commande ventilatoire organise la contraction des muscles respiratoires en une séquence finement coordonnée par le biais des neurones respiratoires qui sont chargés de sa distribution. La commande ventilatoire se distribue d'abord aux muscles des VAS, qui se contractent au tout début de l'inspiration, avant d'atteindre le diaphragme et les muscles de la cage thoracique (Hilaire & Pasaro, 2003) dont la contraction assure la mobilisation de l'air dans les poumons. La phase expiratoire est passive et correspond au relâchement complet des muscles inspiratoires. Elle est précédée de la phase post-inspiratoire qui correspond principalement à un freinage du débit expiratoire par la persistance d'une activité des muscles inspiratoires. Notons que l'expiration peut être forcée et devenir un processus actif nécessitant la mise en jeu des muscles expiratoires par la commande ventilatoire.

Ce travail doctoral se limite à la physiologie de la commande centrale respiratoire (CCR) sous-entendue automatique et à sa transmission aux motoneurones des muscles respiratoires dans le cadre d'un stimulus hypercanique.

III. Le contrôle automatique de la ventilation pulmonaire : à la découverte de la CCR

1. Frise historique de la CCR de l'Antiquité à nos jours

Dès l'Antiquité (2^e siècle), le célèbre Claudius Galien fut le premier à soupçonner l'existence de formations nerveuses situées au niveau du tronc cérébral comme responsables de l'activité ventilatoire spontanée après avoir constaté une paralysie respiratoire chez un homme victime d'une fracture de la colonne cervicale haute. En 1760, Lorry a observé chez le lapin (Lorry, 1760) que les mouvements respiratoires persistent après ablation du cervelet et des hémisphères cérébraux excluant ainsi la possibilité que ces régions soient le siège de la rythmogenèse respiratoire (Lorry, 1760). C'est à partir du 19^e siècle que la localisation des centres respiratoires fut précisée avec les travaux de Legallois (Legallois, 1812) et de Flourens (Flourens, 1842, Flourens, 1851) chez le lapin par des expériences de sections étagées du tronc

cérébral qui démontreront que le rythme respiratoire est généré au niveau du pont et du bulbe rachidien, plus particulièrement dans une région spécifique du bulbe rachidien, que Flourens baptisa « nœud vital ». Des travaux pionniers du début du 20^e siècle, réalisés chez le chat, ont permis d'identifier l'étendue des régions du tronc cérébral nécessaires pour générer le rythme respiratoire. Des expériences de lésions et de stimulations électriques localisées au sein du tronc cérébral ont été effectuées chez le chat dans le but d'identifier les sites nécessaires à la genèse du rythme respiratoire et ont été à l'origine de la conception de centres respiratoires étagés et interconnectés, constituant un réseau respiratoire au niveau du pont et du bulbe rachidien (Lumsden, 1923a, Lumsden, 1923b, Pitts *et al.*, 1939, Pitts, 1941, Pitts, 1946). La localisation des structures neuronales responsables de l'automatisme ventilatoire a été caractérisée plus en détail beaucoup plus tard avec le développement de préparations *in vitro* de système nerveux central de plus en plus sophistiquées.

Ces études ont été suivies de nombreuses publications (Gesell *et al.*, 1936, Stella, 1938, Pitts *et al.*, 1939, Gesell *et al.*, 1940, Pitts, 1941, Pitts, 1946, Suzue, 1984, Smith *et al.*, 1991, Feldman *et al.*, 2003) qui, en multipliant les approches et les modèles animaux, ont décrit, localisé et caractérisé des groupes de neurones dits respiratoires à l'origine de la commande centrale respiratoire (CCR). Les éléments de connaissance les plus importants qu'elles ont apportés seront résumés dans les pages qui vont suivre.

2. Les acteurs de la CCR : les neurones respiratoires

a. Caractérisation

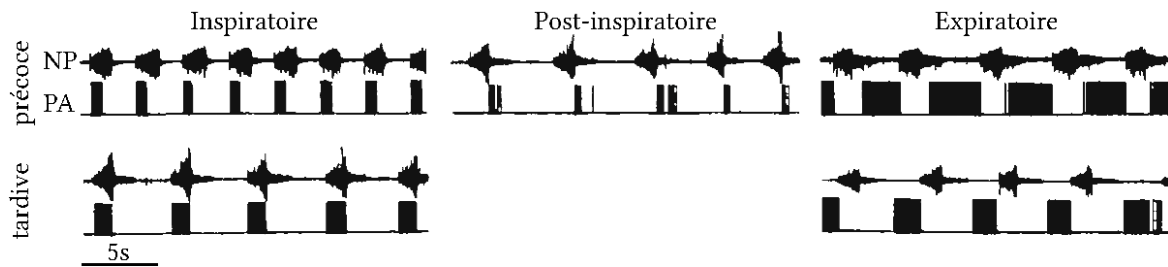
Dans les années 1930-40, Gesell et ses collaborateurs ont été les premiers à enregistrer, dans le tronc cérébral de chien, l'activité électrique unitaire de neurones ayant des décharges en phase avec l'inspiration ou l'expiration (Gesell *et al.*, 1936, Gesell *et al.*, 1940). Effectivement, ces neurones ont, contrairement à la plupart des neurones du système nerveux central, un patron d'activité en phase avec le rythme respiratoire, c'est-à-dire que leur activité est corrélée à celle des sorties motrices respiratoires.

C'est en enregistrant chez le chat *in vivo* l'activité électrique du nerf phrénique qui innerve le diaphragme, simultanément avec l'activité électrique d'un neurone inspiratoire, que Diethelm W. Richter a permis de révéler en 1982 un rythme respiratoire composé de trois phases distinctes (Richter, 1982).

Le début de la phase inspiratoire (I) se traduit par une augmentation brusque de l'activité du nerf phrénique se poursuivant par une phase d'activité croissante formant progressivement la « rampe inspiratoire » qui sera brutalement interrompue par une diminution accrue de l'activité du nerf phrénique marquant le début de l'expiration. Cette activité résiduelle du nerf phrénique à la fin de la « rampe inspiratoire » correspond à la phase post-inspiratoire (PI), puis le nerf devient silencieux pendant la phase expiratoire (E) (Richter, 1982, Bianchi *et al.*, 1995a).

Ces phases ont pour origine des neurones respiratoires dont l'activité rythmique est contemporaine de la période d'activité ou de silence du nerf phrénique (Figure 6).

Figure 6 : Identification des neurones respiratoires selon le moment de décharge



Les phases respiratoires sont définies en fonction de l'activité des motoneurones phréniques et les neurones respiratoires sont classés en fonction de la phase respiratoire pendant laquelle ils déchargent. Le tracé du haut représente les activités électriques du nerf phrénique (NP), le tracé du bas les potentiels d'action des neurones respiratoires (PA). Les enregistrements sont effectués sur le chat anesthésié. Adaptée d'après (Richter, 1982).

b. Classification

La description des modalités de décharges au cours d'un cycle respiratoire et des sites de projection axonale des neurones respiratoires a permis de définir plusieurs classes de neurones respiratoires selon deux classifications.

- Selon les modalités de décharge au cours d'une révolution respiratoire

Un grand nombre d'études (Feldman, 1986, Von Euler, 1986, Bianchi et al., 1995a, Bellingham, 1998) ont permis de décrire plusieurs types de neurones respiratoires en fonction de la phase privilégiée du cycle pendant laquelle ceux-ci déchargeaient (inspiratoire, post-inspiratoire, expiratoire) et leur motif de décharge (croissante, décroissante, transitionnelle). Ainsi, selon ces critères, 6 catégories de neurones respiratoires ont pu être établies : les neurones pré-inspiratoires (pré-I), les neurones inspiratoires précoces (e-I), globaux (I-aug) et tardifs (Late-I), les neurones post-inspiratoires (post-I) et les neurones expiratoires (Figure 7).

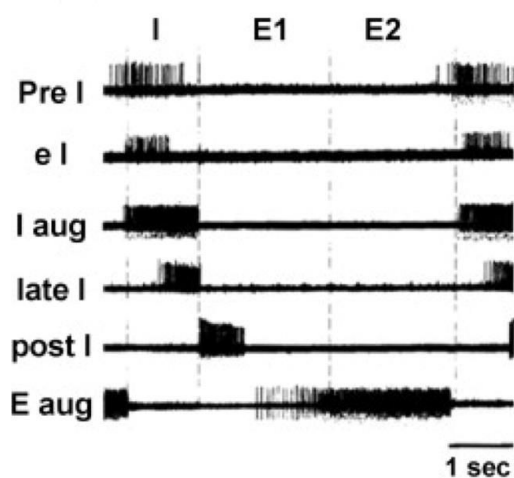


Figure 7 : Tracés électrophysiologiques illustrant les 6 catégories de neurones respiratoires

L'ensemble des tracés représente les décharges des différents neurones respiratoires au cours du cycle respiratoire chez le chat décérébré. Les neurones e-I, I-aug et Late-I déchargent pendant l'inspiration (I), les neurones Post-I déchargent pendant la post-inspiration ou expiration précoce (E1), les neurones E-aug pendant l'expiration précoce et tardive (E1 et E2) et les neurones Pre-I en fin d'expiration tardive E2 et en début d'inspiration (I). D'après (Bianchi & Gestreau, 2009)

- **Selon les projections axonales**

Les différentes fonctions des neurones respiratoires ont pu être déduites par les connexions anatomiques qu'ils entretiennent avec d'autres structures neuronales (Bianchi et al., 1995a). Pour cela, la méthode de traçage rétrograde et antérograde a permis de différencier trois types cellulaires caractérisés par leur site de projection axonale (Merrill, 1970, Bianchi, 1971, Portillo *et al.*, 1994, Gaytan & Pasaro, 1998). Les motoneurones crâniens innervent les muscles lisses des voies aériennes supérieures (Bianchi, 1971, Bianchi, 1974) ; les interneurones bulbo-spinaux ou neurones pré-moteurs (Merrill, 1970, Bianchi, 1971) projettent du bulbe rachidien vers les motoneurones spinaux innervant les muscles respiratoires et enfin les interneurones proprio-bulbaires dont les projections axonales sont confinées au tronc cérébral (Richter, 1982). Ils sont à l'origine des activités finement coordonnées des autres neurones respiratoires (Duffin, 2004). Parmi ces derniers se trouvent les neurones à l'origine du rythme respiratoire.

c. Localisation des neurones respiratoires

Les neurones respiratoires sont repartis dans différents groupes respiratoires au niveau du pont et du bulbe comme le soupçonnaient déjà Legallois et Flourens au début du 19^e siècle. L'ensemble de ces groupes forment ce que l'on appelle communément le réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique (Figure 8). Chaque groupe respiratoire se compose de populations hétérogènes de neurones respiratoires. Les fonctions de chacun de ces groupes ont été déduites par l'observation des modifications de l'activité respiratoire engendrées suite à leur lésion ou stimulation au sein du tronc cérébral (Bianchi *et al.*, 1995b, Feldman et al., 2003). *In fine*, ces travaux ont permis d'évaluer la contribution fonctionnelle de ces différents groupes respiratoires dans la genèse et la modulation du rythme respiratoire, le traitement des afférences et l'élaboration de la commande pré-motrice (Duffin, 2004). Les paragraphes suivants seront consacrés à la présentation de ce réseau neuronal respiratoire.

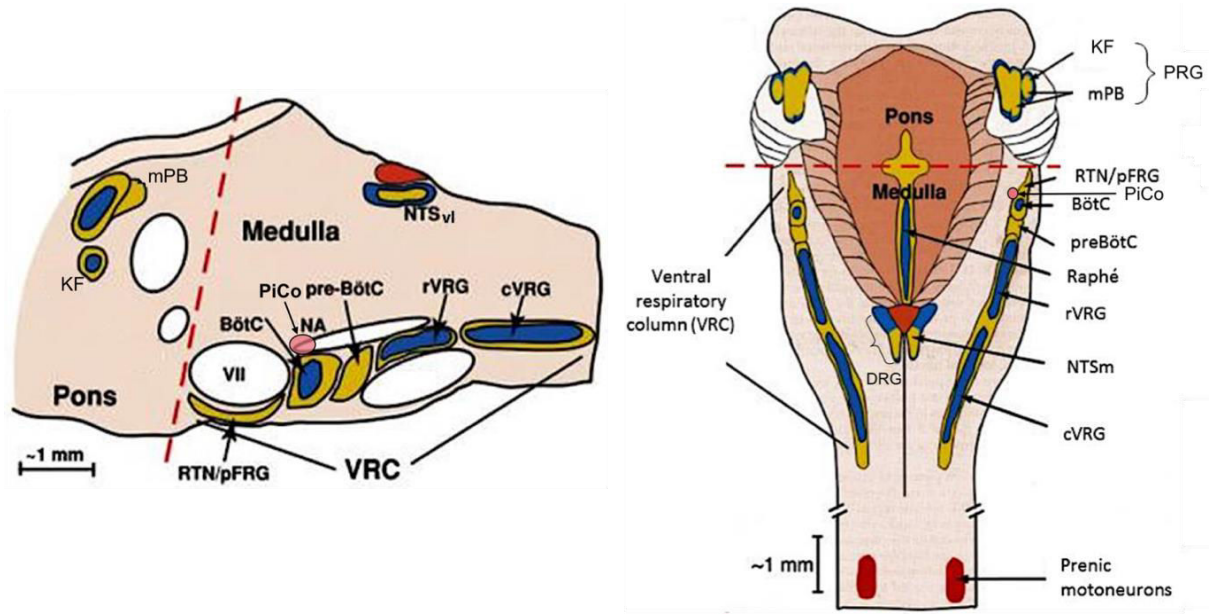


Figure 8 : Représentation schématique de la distribution anatomique des principales structures bulbaires et pontiques participant à la CCR

Vue sagittale (gauche) et dorsale (droite) du tronc cérébral chez le rongeur. mPB : noyau parabrachial médian ; KF : noyau de Kölliker-Fuse ; VII : noyau facial ; RTN/pFRG : noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial ; PiCo : complexe post-inspiratoire ; BötC : complexe de Bötzinger ; NA : noyau ambigu ; preBötC : complexe de pré-Bötzinger ; NTSvl : subdivision ventro-latérale du noyau du tractus solitaire ; rVRG : région rostrale du groupe respiratoire ventral ; cVRG : région caudale du groupe respiratoire ventral ; VRC : colonne respiratoire ventrale ; DRG : groupe respiratoire dorsal. Adaptée de (Lindsey *et al.*, 2012).

IV. Description anatomique et fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire

Les prochaines lignes établiront une description fonctionnelle des différents groupes respiratoires selon leur localisation.

1. Au sein du bulbe rachidien

a. Le complexe de Pré-Bötzinger (préBötC) : générateur de l'inspiration

Smith et collaborateurs (Smith *et al.*, 1991) parvinrent à isoler en 1991 une petite région ventro-médullaire, nommée le complexe de pré-Bötzinger (préBötC), qui apparaît dès lors essentielle à l'expression du rythme respiratoire, le fameux « nœud vital » de Flourens (Figure 9, page 19). Depuis sa découverte, de nombreuses expériences visant à léser spécifiquement les neurones du préBötC ou à interférer avec leur activité ont conforté son rôle crucial dans la genèse du rythme respiratoire (Tan *et al.*, 2008, Gray *et al.*, 2001, McKay *et al.*, 2005). Ce générateur est formé de deux groupes de neurones bilatéralement synchronisés (Smith *et al.*, 1991). Ces groupes se composent d'une population de neurones pré-inspiratoires et

inspiratoires, tous deux glutamatergiques, ainsi que de neurones inspiratoires précoces inhibiteurs glycinergiques (Connelly *et al.*, 1992, Molkov *et al.*, 2013). L'enregistrement en patch clamp dans une tranche de bulbe rachidien comprenant l'intégralité du préBötC a permis d'identifier dans ce complexe des neurones possédant des propriétés oscillatoires voltage-dépendantes leur conférant une fonction de pacemakers conditionnels (Smith *et al.*, 1991, Rekling & Feldman, 1998). Le terme pacemaker « conditionnel » provient du fait que le déclenchement de leur activité autorythmique implique l'existence d'entrées excitatrices toniques pour induire une légère dépolarisation de leur membrane nécessaire à l'initiation d'un potentiel d'action. Les neurones pacemakers du préBötC présentent des propriétés voltage-dépendantes spécifiques et constituent une population hétérogène. Deux types de neurones pacemakers ont été identifiés en fonction de leurs patrons de décharges : ceux présentant une décharge longue et à basse fréquence et ceux présentant une décharge courte à haute fréquence (Thoby-Brisson & Ramirez, 2001). Cette différence est liée à la présence de diverses conductances membranaires. En effet, l'activité rythmique de certains neurones dépend d'une conductance membranaire sodique voltage-dépendante, le courant entrant sodique persistant (I_{NaP}), et celle d'autres neurones est liée à la fois aux courants calciques (I_{Ca}) et aux courants cationiques non-spécifiques, indépendants du voltage et activés par le calcium (I_{CAN}) (Thoby-Brisson & Ramirez, 2001, Del Negro *et al.*, 2002, Pena *et al.*, 2004, Del Negro *et al.*, 2005). Ces populations neuronales représentent respectivement entre 5-15% et 7-10% des neurones du préBötC. Il est intéressant de noter que l'activité rythmique du préBötC disparaît lorsque les deux populations de neurones pacemakers sont mises au silence, mais se maintient lorsqu'une seule d'entre elles est affectée. Le rôle du préBötC dans la genèse de la phase inspiratoire a pu être démontré *in vivo* grâce à des approches génétiques (Bouvier *et al.*, 2010), pharmacologiques (Tan *et al.*, 2008, Gray *et al.*, 2001) ou optogénétiques (Abdala *et al.*, 2015).

Cette région peut être anatomiquement caractérisée par la co-expression, à la surface des neurones qui la constituent, de récepteurs aux opioïdes de type μ , de récepteurs de la substance P de type NK1 (Gray *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2001a, Thoby-Brisson *et al.*, 2005) et du neuropeptide somatostatine (Stornetta *et al.*, 2003, Thoby-Brisson *et al.*, 2005). Ces caractéristiques, anatomiques et fonctionnelles du préBötC décrites à la naissance, sont déjà présentes à l'instant de sa mise en place chez l'embryon (Thoby-Brisson *et al.*, 2005). D'autres marqueurs plus ou moins discriminants sont également décrits comme étant présents tels que les récepteurs à la neurotrophine BDNF (Thoby-Brisson *et al.*, 2003), le récepteur à l'adénosine triphosphate et à ses métabolites (Huxtable *et al.*, 2009) etc. C'est en partie sur cette co-expression de neuromodulateurs et de leurs récepteurs que reposent les propriétés des neurones du préBötC.

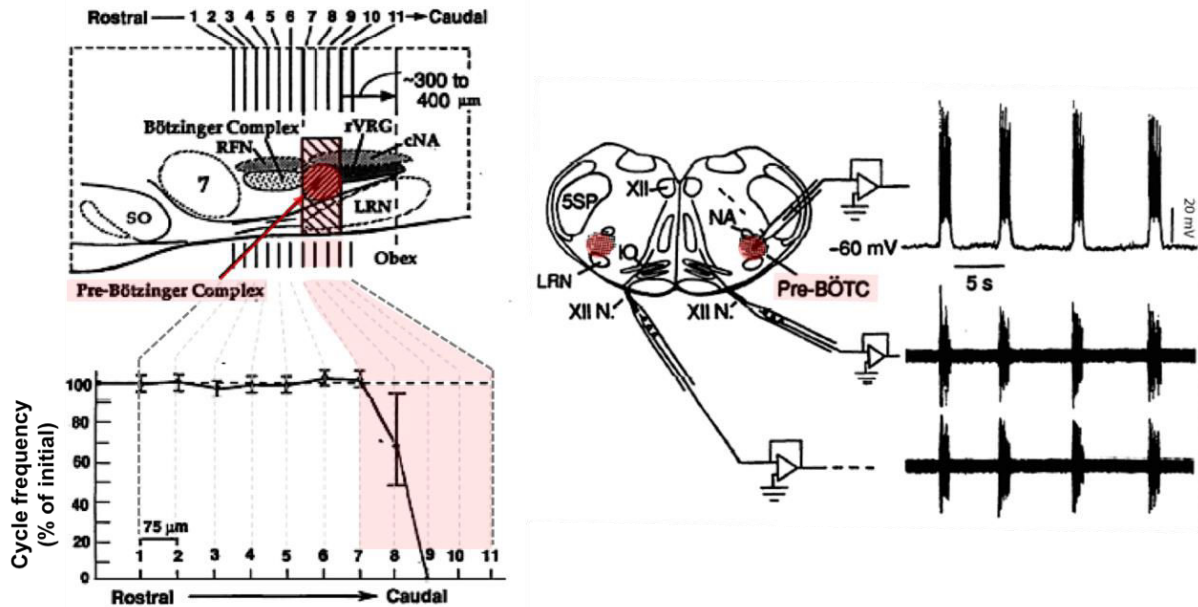


Figure 9 : Découverte du préBötC, la structure indispensable à la rythmogénèse respiratoire.

Représentation schématique du tronc cérébral en vue sagittale illustrant la position du préBötC au niveau du bulbe rachidien qui s'étend depuis la face caudale du noyau rétro-facial (RFN) jusqu'à environ 200 μm de l'obex (en haut à gauche). Les lignes verticales numérotées au-dessus du schéma indiquent les positions rostro-caudales de sections transversales étagées réalisées sur une préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolée de rat adulte. En bas à gauche, le graphique représente l'évolution de la fréquence respiratoire enregistrée au niveau de la racine cervicale ventrale C4 suite aux sections transversales. Les sections rostrales au préBötC (ligne de 1 à 7) n'entraînent aucune modification de la fréquence respiratoire tandis que celles réalisées en son sein (ligne de 8 à 10) abolissent la fréquence respiratoire, démontrant le caractère nécessaire du préBötC. A droite de l'illustration se trouve une représentation schématique d'enregistrements réalisés sur une tranche transversale de 500 μm d'épaisseur contenant le préBötC. L'enregistrement des racines motrices du nerf hypoglosse montre une activité rythmique bilatérale synchronisée. L'enregistrement des neurones du préBötC en patch clamp met en évidence que leur activité est en phase avec l'activité des sorties motrices du nerf hypoglosse. Ce sont ces neurones qui seraient la source de l'activité rythmique. 5SP : noyau spinal du trijumeau ; LRN : noyau réticulaire latéral ; IO : olives inférieures ; cNA : noyau ambigu caudal ; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral ; SO : olives supérieures ; 7 : noyau facial ; XII : noyau de l'hypoglosse ; XII N : nerf hypoglosse. Adaptée de (Smith et al., 1991).

b. Le groupe respiratoire parafacial (pFRG) : générateur de l'expiration

Une seconde structure rythmique dont le profil d'activité suggérait une implication directe dans la genèse du rythme respiratoire a été décrite. Les neurones de cette structure baptisée groupe respiratoire parafacial (pFRG) (Onimaru & Homma, 2003), localisée à la surface ventro-latérale du noyau moteur du nerf facial, présentaient un patron de décharge particulier. C'est-à-dire que leur décharge avait lieu majoritairement au cours de la phase post-inspiratoire et une autre partie pendant la phase pré-inspiratoire (Onimaru *et al.*, 1987, Onimaru *et al.*, 1988, Onimaru *et al.*, 1995). Ils démontrent également qu'une stimulation électrique de cette région a la capacité d'activer ces neurones pré-inspiratoires avec pour conséquence

l'initiation d'une nouvelle phase inspiratoire et que cette activité pré-inspiratoire, après isolation de la partie rostrale du bulbe correspondant au pFRG, perdure de manière autonome. Ce n'est qu'en 2003 que cette zone se verra attribuer le nom de pFRG et que son rôle dans la genèse de la phase expiratoire active deviendra incontestable, lui valant le titre de générateur de l'expiration, sous-entendu expiration active (Onimaru & Homma, 2003, Feldman & Del Negro, 2006). Onimaru et ses collaborateurs décrivent l'émergence fonctionnelle du pFRG aux stades post-nataux (Onimaru & Homma, 2005a). L'utilisation d'autres approches expérimentales, notamment d'imagerie calcique, a permis de dater une émergence bien plus précoce, au stade E14,5 (Thoby-Brisson *et al.*, 2009). A ce stade, il a été en effet possible d'observer des activités rythmiques au niveau de deux populations cellulaires bilatéralement localisées à la surface ventrale, au niveau des noyaux moteurs du facial (7N) sur des tranches transversales de bulbe de souris. Ces activités rythmiques préservées sur des préparations de tranches transversales provenaient donc d'un générateur de rythme embryonnaire qui fut alors baptisé oscillateur parafacial embryonnaire (e-pF pour embryonic parafacial) préfigurant le pFRG post-natal et le pFRG associé au RTN adulte. L'e-pF est composé d'environ 500 neurones dérivants de territoires rhombomériques exprimant *Krox20*, gène de développement impliqué dans la segmentation du tronc cérébral le long de l'axe antéro-postérieur. L'origine du déficit fonctionnel des animaux *Krox20*^{-/-} qui présentaient dès la naissance une fréquence respiratoire anormalement lente et des apnées fréquentes a donc pu être précisée (Jacquin *et al.*, 1996, Thoby-Brisson *et al.*, 2009). Il semblerait donc que la mutation *krox 20* perturbait la mise en place de l'e-pF chez ces animaux.

Le pFRG semble être couplé au préBötC (Onimaru & Homma, 2003, Mellen *et al.*, 2003, Janczewski & Feldman, 2006, Pagliardini *et al.*, 2011, Huckstepp *et al.*, 2016). Thoby-Brisson et collaborateurs ont démontré l'existence d'un couplage fonctionnel entre pFRG (ou e-pF) et PréBötC au stade prénatal *in vitro* (Thoby-Brisson *et al.*, 2009), le pFRG jouant un rôle essentiel dans l'entraînement du PréBötC. Ce couplage se retrouve *in vitro* en période postnatale entre pFRG et PréBötC avec une activation successive du pFRG en phase pré-inspiratoire, puis du préBötC en phase inspiratoire (Figure 10). Ce couplage se retrouve aussi dans des expériences sur des préparations de SNC isolés contenant le pFRG et le préBötC et des tranches isolées ne contenant que le préBötC, faisant appel aux propriétés inhibitrices sélectives qu'exercent les opioïdes sur la rythmogenèse du préBötC auxquelles le pFRG est insensible (Mellen *et al.*, 2003). Cette expérience montre que dans un état d'excitabilité diminué par les opiacés, les neurones du préBötC ne sont susceptibles de s'activer qu'au moment privilégié de la survenue de bouffées phasiques excitatrices en provenance des neurones pré-inspiratoires du pFRG. Ce phénomène est qualifié de « quantal slowing ». Toutefois, à l'âge adulte, il semblerait que l'intégration de ces générateurs dans un réseau neuronal plus complexe soit nécessaire (Viemari *et al.*, 2003).

Les neurones du pFRG n'expriment pas de récepteurs aux opioïdes de type μ mais sont en revanche caractérisés tout comme les neurones du préBötC par l'expression de NK1R à leur

surface (Nattie & Li, 2002, Mulkey *et al.*, 2004, Weston *et al.*, 2004, Dubreuil *et al.*, 2008, Onimaru *et al.*, 2008, Thoby-Brisson *et al.*, 2009, Guyenet *et al.*, 2010b). De plus, une sous-population de neurones respiratoires autorythmiques a été identifiée dans le préBötC (Johnson *et al.*, 1994, Koshiya & Smith, 1999, Rekling & Feldman, 1998, Thoby-Brisson & Ramirez, 2001) et dans le pFRG (Onimaru *et al.*, 1989, Onimaru *et al.*, 1995). Ces neurones possèdent des propriétés membranaires donnant lieu à des oscillations rythmiques de leur potentiel de membrane et sont capables de générer un rythme de manière autonome. Il est à noter que les neurones pré-inspiratoires du pFRG exprimant NK1R à leur surface sont immunoréactifs pour PHOX2B et qu'ils montrent une chémosensibilité intrinsèque aux CO_2/H^+ (Onimaru *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les neurones parafaciaux exprimant Phox2b jouent un rôle dans la génération du rythme respiratoire ainsi que dans la chémoréception centrale aux CO_2/H^+ .

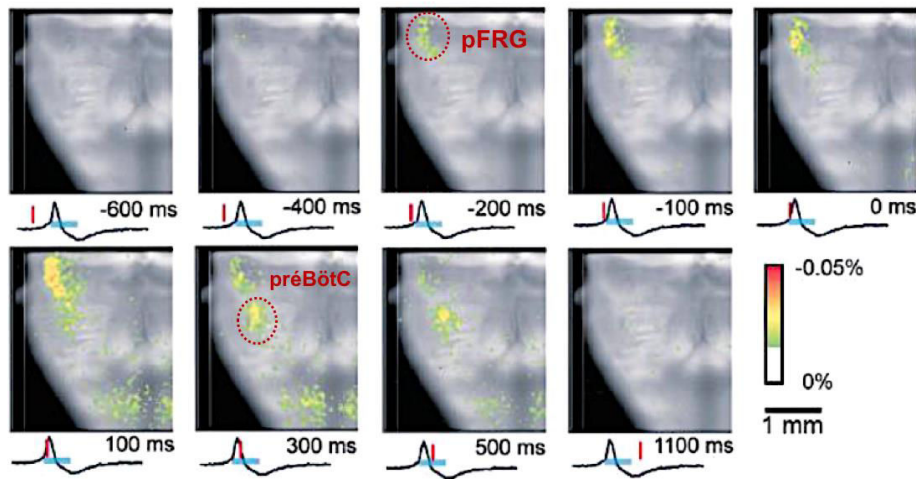


Figure 10 : Activation spatio-temporelle des neurones du pFRG et du préBötC en période post-natale

Les observations sont faites sur des préparations de tronc cérébral isolé de rat nouveau-né à l'aide d'un indicateur sensible aux ions Ca^{2+} , reflet du voltage membranaire. Les photographies représentent la superposition d'une vue ventrale du bulbe rachidien et du 1^{er} segment de la moelle épinière cervicale, située entre la sortie du nerf facial et la première racine cervicale. Chaque image est prise à un temps précis (ligne rouge) par rapport à l'activité enregistrée en C4 (tracé) ; la phase inspiratoire est indiquée par la ligne bleue. Les signaux optiques reflétant l'activité des neurones apparaissent en premier lieu au niveau de la partie ventro-latérale du tronc cérébral, à la limite entre le pont et le bulbe. Cette région correspond au groupe respiratoire parafacial (pFRG). Cette activité, qualifiée de pré-inspiratoire, survient environ 200 ms avant la décharge du préBötC observée plus caudalement et définissant la phase inspiratoire. Adaptée de (Onimaru & Homma, 2003).

- **Le noyau rétrotrapézoïde (RTN) associé au groupe respiratoire parafacial (pFRG)**

D'un point de vue anatomique, Le pFRG est difficilement distinguable chez l'adulte d'un autre groupe neuronal nommé le noyau rétrotrapézoïde (RTN) qui lui semble impliqué essentiellement dans la chémosensibilité centrale au CO_2/H^+ (Bodineau *et al.*, 2000b, Nattie,

2001b, Guyenet *et al.*, 2008). En effet, il est considéré comme le principal site de chémoréception centrale car ses neurones sont de véritables chémorécepteurs aux CO_2/H^+ (Guyenet *et al.*, 2005b, Guyenet, 2008). Ces neurones chémosensibles expriment le gène *Phox2B* (Stornetta *et al.*, 2006). Néanmoins, il a aussi été montré que cette structure pourrait accélérer la fréquence et contrôler la durée d'une bouffée inspiratoire (Onimaru *et al.*, 2003). L'appellation vaste de RTN/pFRG permet d'englober, comme nous l'avons vu, plusieurs populations cellulaires possédant des caractéristiques fonctionnelles de chémoréception et de rythmogenèse pré-inspiratoire. Ce groupe fera l'objet d'une description plus détaillée dans le chapitre qui traite de la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ .

c. Le complexe post-inspiratoire (PiCo) : générateur de la post-inspiration

Une étude récente (Anderson *et al.*, 2016, Anderson & Ramirez, 2017) a décrit un nouveau générateur (Figure 11), baptisé complexe post-inspiratoire (PiCo pour Postinspiratory Complex), jetant un nouveau jour sur la manière de concevoir la genèse d'un cycle respiratoire. Ce troisième générateur Pico est dorso-rostral au préBötC, dorso-caudal au noyau facial et dorso-médian au noyau ambigu. La post-inspiration avait déjà été attribuée à l'activité des neurones inhibiteurs du complexe de Bötzing (Smith *et al.*, 2009). Cependant la source d'excitation qui anime ces neurones inhibiteurs n'était jusque-là pas encore caractérisée (Ezure *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs ont identifié l'emplacement et le phénotype neurochimique d'une population neuronale excitatrice et rythmogène qui est spécifiquement active pendant la post-inspiration appelée PiCo. Les auteurs de cette étude ont travaillé sur une tranche horizontale *in vitro* contenant la partie ventrale du bulbe rachidien et de la moelle épinière jusqu'à la racine C4. Ces tranches ont été utilisées pour enregistrer en simultanément l'activité des neurones du préBötC et celle des neurones de PiCo. La décharge des neurones du PiCo est qualifiée de post-inspiratoire puisqu'elle intervient immédiatement après et jamais pendant la décharge des neurones du préBötC. Si la relation de PiCo avec le pFRG reste à caractériser, sa relation avec le préBötC n'est pas encore clairement définie mais elle semble être mutuellement inhibitrice. En effet le PiCo semble inhiber l'activité du préBötC et réciproquement être inhibé par ce dernier. Cette inhibition mutuelle assurerait que l'activité de PiCo ne soit pas concomitante à l'inspiration. Le PiCo contient des neurones qui sont à la fois glutamatergiques et cholinergiques, sensibles à la somatostatine (SST) et qui, comme les neurones du préBötC, possèdent des récepteurs aux opioïdes de type μ à leur surface et présentent une activité autorythmique, les classant dans la sous-catégorie de neurones respiratoires pacemakers. La durée d'activité de ces neurones est corrélée à la durée de la phase post-inspiratoire. *In vitro*, leur activité est inhibée par une application de DAMGO (agoniste des récepteurs aux opioïdes de type μ) ou de SST. La forte inhibition de leur activité par la SST observée *in vitro* est en accord avec l'effet inhibiteur de la SST sur l'activité post-inspiratoire constaté *in vivo* dans une étude antérieure (Burke *et al.*, 2010). Pour évaluer si PiCo est bien

responsable de la production *in vivo* de l'activité post-inspiratoire, les auteurs ont profité de sa sensibilité à SST et aux opioïdes. L'injection *in vivo* de SST ou de DAMGO bilatéralement au sein du PiCo a considérablement réduit la durée et l'amplitude d'une activité post-inspiratoire enregistrée au niveau du nerf vague. Ces résultats pris ensemble suggèrent, d'après les auteurs, que le PiCo est nécessaire et suffisant pour générer l'activité post-inspiratoire, il est alors qualifié de générateur de la post-inspiration.

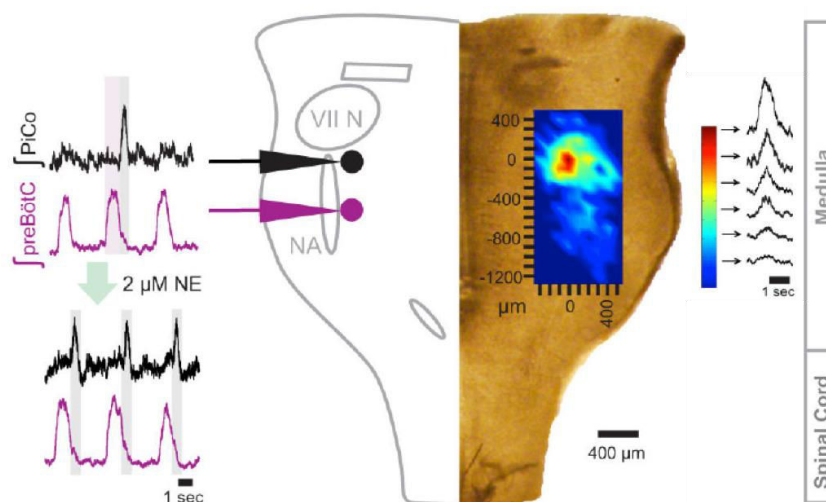


Figure 11 : Localisation de PiCo et caractérisation de son activité au sein d'une tranche horizontale de bulbe rachidien

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 préBötC (en violet), en absence ou en présence noradrénaline (NE). Les décharges des neurones de PiCo produites spontanément surviennent après celles des neurones du préBötC. La NE est ajoutée pour favoriser l'excitabilité neuronale qui pourrait être diminuée au sein de la tranche qui ne contient pas le pont. En présence de NE l'activité post-inspiratoire est facilitée. Au centre, représentation schématique de la tranche horizontale de bulbe rachidien. La partie de gauche montre la localisation de PiCo et du préBötC par rapport au noyau facial (VII N) et au noyau ambigu (NA) et la partie droite représente l'amplitude des décharges enregistrées sur les neurones du PiCo sous forme de carte thermique. Adaptée de (Anderson et al., 2016).

d. Le groupe respiratoire dorsal (DRG)

Chez le chat, le groupe respiratoire dorsal (DRG pour Dorsal Respiratory Group) est une structure bilatérale située dans la partie dorso-médiane du bulbe rachidien (Bianchi, 1971). Il correspond à la subdivision ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (vINTS) et contient des neurones bulbo-spinaux majoritairement inspiratoires dont les axones projettent vers les motoneurones phréniques (Bianchi, 1971, Berger, 1977, Grelot *et al.*, 1988). Des neurones proprio-bulbaires y ont également été décrits, ils envoient des afférences vers le bulbe ventro-latéral aux structures vraisemblablement impliquées dans la rythmogénèse respiratoire (Norgren, 1978, Ross *et al.*, 1985, Otake *et al.*, 1989).

Chez le rongeur, l'existence du DRG reste très controversée. D'une part, l'ablation *in vitro* sur des préparations de système nerveux central isolé de rat nouveau-né de la partie dorsale

du bulbe rachidien contenant le vINTS, n'a aucun effet sur la fréquence respiratoire et l'amplitude de l'activité inspiratoire (Hilaire *et al.*, 1990). D'autre part, la détection par l'intermédiaire de techniques d'imagerie à fluorescence voltage-sensible des neurones ayant une activité inspiratoire a été montrée chez le rat nouveau-né dans la région du DRG (Onimaru & Homma, 2005b), supportant l'hypothèse de l'existence d'un DRG chez le rat, du moins chez le rat nouveau-né. Chez la souris, sa lésion *in vitro* sur des préparations de système nerveux central isolé n'a aucun effet sur la fréquence respiratoire, ce qui est similaire à ce qui a été décrit chez le rat nouveau-né mais entraîne une diminution de l'amplitude de l'activité inspiratoire.

e. Le groupe respiratoire ventral (VRG)

Le groupe respiratoire ventral (VRG pour Ventral Respiratory Group) a été décrit pour la première fois par Bianchi chez le chat en 1971 (Bianchi, 1971). Il se présente sous la forme d'une colonne longitudinale bilatérale située sur la partie ventro-latérale du bulbe rachidien. Il s'étend de la jonction bulbo-spinale jusqu'à l'extrémité caudale du noyau facial. Il est subdivisé en trois régions distinctes : caudale (VRGc), intermédiaire (VRGi) et rostrale (VRGr). Cependant le découpage en trois régions ne fait pas consensus. D'autres subdivisent le VRG en seulement deux régions, organisation constatée chez les rongeurs (Alheid *et al.*, 2002, Feldman & Del Negro, 2006, McCrimmon *et al.*, 2004) où les complexes de Bötzinger et pré-Bötzinger sont dès lors exclus du VRG. Ces groupes respiratoires ventraux constituent les voies de sortie de la commande centrale respiratoire en comprenant des motoneurones et pré-motoneurones innervant les muscles respiratoires. Les neurones rostraux projettent sur les motoneurones spinaux phréniques, innervant le diaphragme et les motoneurones inspiratoires, innervant les muscles intercostaux (Bianchi *et al.*, 1995a). Les neurones respiratoires caudaux projettent vers les motoneurones spinaux thoraciques et lombaires (Ezure, 1990). Ainsi, les groupes respiratoires ventraux ont une grande importance dans la mise en place du signal approprié à la contraction des muscles respiratoires (Ellenberger & Feldman, 1990). Ils transforment le signal rythmique généré par les groupes neuronaux en amont en signal contractile relayé jusqu'aux muscles effecteurs.

Le VRGc s'étend de la jonction bulbo-spinale à l'obex (Bianchi *et al.*, 1995a). Il contient une forte densité de neurones expiratoires bulbo-spinaux (Arita *et al.*, 1987, Zheng *et al.*, 1991, Dobbins & Feldman, 1994) se projetant sur les motoneurones expiratoires des muscles abdominaux et intercostaux internes (Merrill, 1970, Bianchi, 1971, Miller *et al.*, 1985).

Le VRGi correspond aux noyaux ambigu et para-ambigu (Bianchi, 1971, Kalia, 1981). Le noyau ambigu contient les motoneurones laryngés et pharyngés (Bieger & Hopkins, 1987) qui sont à l'origine d'une commande s'exerçant sur les muscles des voies aériennes supérieures (Bianchi *et al.*, 1988, Grelot *et al.*, 1989, Barillot *et al.*, 1990). Le noyau para-ambigu contient des neurones pré-moteurs bulbo-spinaux respiratoires qui projettent sur les motoneurones spinaux innervant les muscles respiratoires thoraciques et des neurones propriobulbaires qui interviendraient dans la synchronisation des muscles des voies aériennes supérieures avec ceux

de la cage thoracique (Bellingham, 1998, Bianchi, 1971, Ellenberger *et al.*, 1990a, Dobbins & Feldman, 1994, Bianchi *et al.*, 1995a).

Le VRGr correspond à la portion rostrale du noyau ambigu et à la formation réticulée adjacente (VLM). Il contient les complexes de Bötzing et de Pré-Bötzing situés en position ventro-médiane par rapport au noyau ambigu. Le complexe de Bötzing contient des neurones expiratoires qui projettent vers le bulbe rachidien caudal et la moelle épinière (Bystrzycka, 1980). D'après Smith et collaborateurs (Smith *et al.*, 2007), ce complexe aurait un rôle important dans le contrôle de la transition de phase, notamment entre les activités inspiratoire et expiratoire du réseau respiratoire.

Nous adopterons l'organisation anatomique décrite chez le rongeur qui découpe le VRG en une partie rostrale (rVRG) et une partie caudale (cVRG). Le VRGi décrit précédemment devient le rVRG et les complexes de Bötzing et pré-Bötzing se retrouvent exclus du VRG et apparaissent plutôt en tant que compartiments à part entière.

f. Les structures cathécholaminergiques

- Noyau réticulaire bulbaire ventro-latéral (VLM)- A₁C₁

Ce groupement de cellules est situé dans la région ventro-latérale du bulbe rachidien au sein du VRGr (Ellenberger & Feldman, 1990). Sa partie rostrale est composée essentiellement des neurones adrénérgiques (C₁) alors que sa partie caudale comprend une majorité de neurones noradrénérgiques (A₁). Il a été montré que les neurones C₁ ont un rapport privilégié avec les neurones du préBötC (Ellenberger & Feldman, 1990, Ellenberger *et al.*, 1990b), suggérant une interaction fonctionnelle avec celui-ci. Le rôle fonctionnel de ce groupe dans la modulation de la CCR a été suggéré à partir d'études *in vitro* sur des préparations de bulbe rachidien-moelle épinière isolées. En effet, l'application d'un antagoniste des adrénorécepteurs α_2 induit une diminution de la fréquence des décharges inspiratoires. Alors que l'application de la tyrosine, précurseur entre autres des catécholamines, accélère la fréquence de ces décharges inspiratoires. Ainsi, les auteurs ont proposé que A₁C₁ module le générateur inspiratoire notamment au moyen d'une synthèse endogène de noradrénaline en activant des adrénorécepteurs α_2 localisés sur les neurones du complexe de pré-Bötzing (Viemari *et al.*, 2005, Zanella *et al.*, 2005).

- NTS commisural et médian - A₂C₂

Ce groupement cellulaire est situé dans le noyau du tractus solitaire (NTS) au niveau de la partie dorso-médiane du bulbe rachidien. Il est composé de neurones noradrénérgiques A₂ et adrénérgiques C₂ qui suivent une distribution rostro-caudale comme A₁C₁. Chez les rongeurs, cette région est surtout citée pour son implication dans la médiation du stimulus hypoxique. En effet, elle a été décrite pour son rôle en tant que centre d'intégration de nombreuses afférences notamment celles provenant des chémorécepteurs périphériques situés sur les corps carotidiens (Davies & Edwards, 1973, Lipski *et al.*, 1977).

De plus, il a été montré *in vitro* sur des tranches de bulbe rachidien qu'en cas de lésions électrolytiques bilatérales, le rythme respiratoire n'est pas affecté mais que la variabilité respiratoire est augmentée, suggérant que les neurones A₂C₂ jouent un rôle dans la stabilisation du rythme respiratoire (Zanella *et al.*, 2006).

g. Les structures sérotoninergiques

La majorité des neurones sérotoninergiques est localisée dans les noyaux des raphés Pallidus, Obscurus, Magnus, Médian et Dorsal (Steinbusch & Nieuwenhuys, 1981). Dans une moindre mesure, des neurones sérotoninergiques sont retrouvés dans, le groupe parapyramidal (Bradley *et al.*, 2002, Richerson, 2004), la partie caudale du Locus coeruleus et les raphés pontiques (Hornung, 2003, Hilaire *et al.*, 2010).

Les noyaux des raphés

En 1964, Dahlstrom et Fuxe ont proposé une classification des structures sérotoninergiques au sein du tronc cérébral (Dahlstrom & Fuxe, 1964) en fonction de leur organisation caudo-rostrale de sorte que les groupements cellulaires de B1 à B4 appartiennent au groupe sérotoninergique caudal et de B5 à B9 au groupe sérotoninergique rostral (Figure 12).

Les raphés caudaux se distinguent des raphés rostraux par rapport à l'orientation de leurs efférences. En effet, la majorité des neurones sérotoninergiques des raphés caudaux projettent vers les structures caudales, telles que les motoneurones phréniques, le noyau mPB et IPB, le Kölliker-Fuse, le noyau ambigu, le cNTS et mNTS, le RTN, le BötC et pré-BötC et le noyau hypoglosse (Thor & Helke, 1989, Holtman *et al.*, 1990, Ptak *et al.*, 2009). A l'opposé, les noyaux raphés rostraux projettent majoritairement vers le télencéphale et le diencephale.

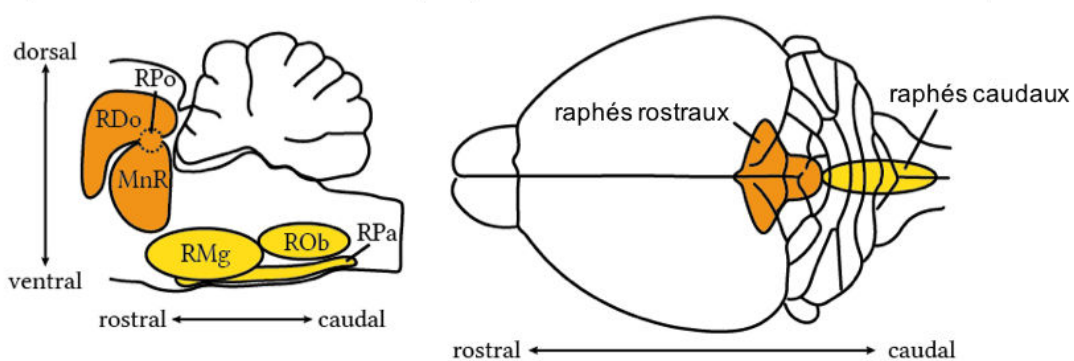


Figure 12 : Représentation schématique de la distribution des noyaux du raphé dans le tronc cérébral chez la souris

Vue sagittale du tronc cérébral (à gauche) et dorsal de l'encéphale (à droite) illustrant les noyaux des raphés caudaux (jaune) et rostraux (orange). RMg: noyau du Raphé Magnus; ROb: noyau du Raphé Obscurus; RPa: noyau du Raphé Pallidus; MnR: noyau du Raphé Médian; RDo: noyau du Raphé Dorsal; RPo: noyau du Raphé Pontique. ©David Marcel Baum, Thèse de Doctorat de Sorbonne Université, mars 2018.

- **Raphé Obscurus (ROb – B1)**

Le ROb est localisé au niveau de la région ventro-médiane du bulbe rachidien, dorsal au RPa et s'étend comme ce dernier tout le long du bulbe rachidien (Jacobs & Azmitia, 1992). Sa stimulation électrique entraîne une diminution de la fréquence de décharge des motoneurones phréniques de manière proportionnelle à l'intensité et à la fréquence du stimulus électrique administré (Lalley, 1986a) suggérant un effet inhibiteur sur la CCR. Cependant, plusieurs observations contredisent cette première hypothèse et démontrent un effet du ROb facilitateur sur la CCR (Cao *et al.*, 2006a, Ptak *et al.*, 2009). Ptak et ses collaborateurs démontrent qu'une grande partie des neurones sérotoninergiques du ROb est spontanément activée et que ces neurones se projettent directement sur le pré-Bötzing. Par opposition aux travaux de Lalley, ces derniers font l'hypothèse de connections excitatrices réciproques originaires du réseau respiratoire d'où une augmentation de l'activité des neurones sérotoninergiques pendant la phase inspiratoire (Ptak *et al.*, 2009). Dernièrement, la mise en œuvre de techniques d'optogénétique a permis de confirmer ce rôle excitateur des neurones sérotoninergiques sur la respiration *in vivo* (Depuy *et al.*, 2011). Ainsi, le rôle précis du ROb dans la commande respiratoire semble pour l'instant conflictuel, bien qu'il ne soit pas exclu qu'il s'agisse de populations sérotoninergiques distinctes qui exercent ces effets apparemment contradictoires.

- **Raphé Pallidus (RPa – B2)**

Le noyau du raphé pallidus (RPa) contient un groupe très dense de neurones sérotoninergiques. Il est localisé au niveau de la région ventro-médiane du bulbe rachidien, ventral au ROb et s'étend tout le long du bulbe rachidien (Jacobs & Azmitia, 1992). Des études de traçage neuronal révèlent des projections axonales directes entre le RPa et les motoneurones phréniques spinaux (Dobbins & Feldman, 1994, Hosogai *et al.*, 1998). L'activation du RPa avec des stimuli chimiques ou électriques aboutit à une facilitation respiratoire (Lalley, 1986a, Cao *et al.*, 2006a). Il a par ailleurs été suggéré que parmi les neurones du RPa certains sont des neurones proprio-bulbaires projetant notamment sur le pré-BötC (Yu *et al.*, 2011). Ces études confirment son rôle dans la modulation facilitatrice de la CCR.

- **Raphé Magnus (RMg – B3)**

Le RMg est localisé au niveau de la région ventro-médiane mais plus latéralement que le RPa et Rob (Jacobs & Azmitia, 1992). Les expériences de Lalley démontrent que la stimulation électrique du RMg déprime la fréquence des décharges phréniques proportionnellement à l'intensité et à la fréquence du stimulus appliqué (Lalley, 1986a). Des connections directes ont été mises en évidence entre le RMg et le réseau neuronal respiratoire (Gaytan & Pasaro, 1998). Cependant, une lésion spécifique des neurones sérotoninergiques du RMg ne modifie pas cette activité respiratoire (Dias *et al.*, 2007) suggérant que les neurones sérotoninergiques ne sont pas impliqués dans cet effet inhibiteur. L'administration

intraveineuse de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A, réduit significativement l'inhibition induite par une stimulation du RMg (Cao *et al.*, 2006b). L'intervention GABAergique peut être à l'origine de ces observations contradictoires (Gargaglioni *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent donc une implication de voies GABAergiques et non sérotoninergiques dans l'effet inhibiteur du RMg sur l'activité respiratoire.

Le groupe parapyramidal (PP)

Le PP est une structure bilatérale localisée à la surface ventrale du bulbe rachidien en bordure des pyramides (Connelly *et al.*, 1989, Stornetta *et al.*, 2005). Il est composé en partie de neurones proprio-bulbaires qui projettent vers le NTS et le VRG, des liens anatomiques qui pourraient justifier son rôle dans la modulation de la CCR (Stornetta & Guyenet, 1999, Ribas-Salgueiro *et al.*, 2006). Des études ont montré l'implication des neurones PP dans la réponse respiratoire à l'hypoxie (Erickson & Millhorn, 1994, Bodineau *et al.*, 2000a, Voituron *et al.*, 2005, Voituron *et al.*, 2011). Par ailleurs, ces neurones ont aussi été décrits comme sensibles à l'hypercapnie (Bradley *et al.*, 2002, Richerson, 2004). En effet, des études suggèrent que les neurones du PP sont intrinsèquement sensibles aux variations de concentration en ions H⁺ (Ribas-Salgueiro *et al.*, 2005), avec une augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones en réponse à une augmentation de la concentration en ions H⁺.

2. Au sein du pont

a. Le groupe respiratoire pontique (PRG)

Le groupe respiratoire pontique dénommé ainsi par Feldman en 1986 (Feldman, 1986) (PRG pour pontine respiratory group), localisé au niveau de la partie dorso-latérale du pont, comprend les noyaux Kölliker-Fuse (KF) et parabrachiaux médian et latéral (mPB et IPB) (Arata, 2009). Il est composé de neurones inspiratoires, expiratoires et transitionnels (Bertrand & Hugelin, 1971, COHEN, 1979, Dick *et al.*, 1994). Le PRG ne semble pas être nécessaire à la genèse du rythme respiratoire (Dick *et al.*, 1994). En effet, sur des tranches de bulbe rachidien isolées, un rythme respiratoire est conservé malgré l'absence du PRG (Smith *et al.*, 1991, Lieske *et al.*, 2000). Néanmoins, le PRG reçoit des afférences en provenance de différentes structures bulbaires, plus particulièrement du NTS (Loewy & Burton, 1978), de la surface ventrale du bulbe rachidien (Loewy *et al.*, 1981) et des noyaux des raphés (Gang *et al.*, 1991). Ces multiples afférences peuvent moduler le rythme respiratoire. Il entretient aussi des connexions avec une structure pontique noradrénergique A5 (Dawid-Milner *et al.*, 2003) et des structures mésencéphaliques et diencephaliques telles que les noyaux paraventriculaires et noyau dorso-médian de l'hypothalamus (Saper *et al.*, 1976a, Vibert *et al.*, 1979, Moga *et al.*, 1990, Bester *et al.*, 1997).

L'ensemble des expériences menées jusqu'à aujourd'hui suggère que le PRG peut influencer la terminaison de la phase inspiratoire et la durée des phases du cycle mais aussi

qu'il semblerait constituer un relais entre les structures supra-pontiques et les structures respiratoires bulbaires (Dick et al., 1994, Bianchi et al., 1995a, Bester et al., 1997).

b. Les structures cathécholaminergiques

- A₅

Ce groupe cellulaire contient des neurones noradrénergiques dispersés dans la zone ventro-latérale du pont caudal. 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 & Guyenet, 1987, Dawid-Milner et al., 2003). La stimulation des neurones noradrénergiques A₅ entraîne une diminution de la fréquence respiratoire et devient inefficace en présence d'antagonistes noradrénergiques (Hilaire *et al.*, 1989, Errchidi *et al.*, 1990). Réciproquement, l'élimination du pont entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire. Ces observations suggèrent que le groupe A₅ exerce un effet inhibiteur sur la CCR. Cet effet inhibiteur serait induit par une libération de noradrénaline conduisant à l'activation des récepteurs α_2 (Hilaire et al., 1989, Errchidi *et al.*, 1991, Hilaire *et al.*, 2004). En effet, l'exposition à un antagoniste de ces récepteurs entraîne 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 et al., 2004).

- Locus coeruleus (A₆)

Ce groupement cellulaire pontique bilatéral et adjacent au quatrième ventricule, s'étend tout le long du pont et présente une forte densité de neurones noradrénergiques. Il est considéré comme étant la source majeure de l'innervation noradrénergique de l'encéphale puisqu'il est responsable de 90% des projections noradrénergiques (Blier, 2000, Viemari, 2008). Oyamada et collaborateurs ont montré *in vitro* sur des préparations de SNC isolées que les neurones A₆ sont sensibles aux variations de CO₂/H⁺ et proposent que ces neurones modulent la CCR en recevant et envoyant des projections aux neurones respiratoires (Oyamada *et al.*, 1998, Oyamada *et al.*, 1999). Ces effets seraient médiés par les récepteurs noradrénergiques α_1 , dans la mesure où l'exposition de préparations de SNC *in vitro* contenant le groupe A₆ à un antagoniste de ces récepteurs entraîne 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 préBötC (Hakuno *et al.*, 2004, Viemari et al., 2004a). Ces expériences suggèrent que les neurones A₆ auraient un effet excitateur sur les structures responsables du rythme respiratoire via l'activation des récepteurs noradrénergiques α_1 . D'autres études *in vivo* ont décrit que les neurones A₆ sont stimulés par une hypoxie et que cela entraîne une augmentation de l'activité phrénique (Guyenet *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1997)

- **Partie dorsale du noyau subcoeruleus (A7)**

Ce groupe cellulaire pontique se situe dans la région dorso-latérale du pont. Des traceurs rétrogrades chez le rat ont mis en évidence que le noyau subcoeruleus (SubC) contient des neurones pré-moteurs qui projettent vers le noyau hypoglosse, suggérant une implication du SubC dans les mouvements des muscles pharyngés (Fay & Norgren, 1997). La combinaison de traceurs rétrogrades injectés dans le noyau hypoglosse avec l'immunodétection de la tyrosine hydroxylase a révélé que les afférences provenant de la partie dorsale du SubC (dSubC) vers le noyau hypoglosse proviennent du groupe noradrénergique A7 (Aldes *et al.*, 1992). L'administration localisée dans le SubC d'un agoniste des récepteurs α_2 , récepteurs dont l'action est inhibitrice, diminuait l'amplitude du nerf hypoglosse (Fenik *et al.*, 2008). Il semblerait que le dSubC ait un effet modérateur sur la ventilation en hypoxie. L'hypoxie provoque notamment une diminution réversible du niveau d'activité musculaire respiratoire chez les fœtus d'ovins, un effet qui n'est pas observé chez les agneaux nouveau-nés. Sur cette observation, une équipe (Breen *et al.*, 1997) a voulu identifier les neurones qui sont activés par l'hypoxie et qui peuvent induire cette inhibition motrice chez le fœtus. Des brebis gestantes sont soumises à une hypoxie à 9% O₂ pendant 2 heures. Comparativement aux fœtus témoins non exposés à l'hypoxie, chez les fœtus de ces brebis, l'hypoxie a provoqué une augmentation significative du nombre de neurones c-FOS-positifs dans plusieurs noyaux médullaires et pontiques, notamment le noyau subcoeruleus. De plus, ces neurones sont catécholaminergiques. L'hypoxie chez les agneaux nouveau-nés, âgés de 7 à 18 jours, a entraîné une augmentation de l'expression de *c-fos* dans les mêmes régions, à l'exception de la région subcoeruleus. Lorsque des agneaux nouveau-nés, dont les nerfs du sinus carotidien avaient été sectionnés bilatéralement (chémodénervation), étaient soumis à une hypoxie, le schéma d'expression de *c-fos* était similaire au schéma observé chez des agneaux témoins chémodénervés mais en plus, l'augmentation de l'expression de *c-fos* a été observée dans le subcoeruleus. Ces résultats suggèrent qu'un ensemble spécifique de neurones du subcoeruleus est activé par l'hypoxie chez le fœtus ovin mais pas chez l'agneau nouveau-né en présence d'une innervation intacte du sinus carotidien. Ils ont alors émis l'hypothèse que dans le fœtus ovin, l'hypoxie active des neurones O₂-sensibles catécholaminergiques modérateurs de la CCR dans la région dorsale du subcoeruleus, ce qui provoque l'arrêt des mouvements respiratoires et qu'après la naissance, la stimulation des chémorécepteurs carotidiens par l'hypoxie inhibe normalement l'activation de ces neurones. Une autre étude, à laquelle j'ai participé en tant que co-auteure, réalisée chez la souris nouveau-née âgée d'un jour montre que l'hypoxie induit, comme chez le mouton, une élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs dans la région du dSubC (Perrin-Terrin *et al.*, 2016b). Cependant, la participation de ce groupe cellulaire à la mise en place de la dépression respiratoire hypoxique n'a pas été constatée chez d'autres rongeurs nouveau-nés (Berquin *et al.*, 2000b). Il semblerait que chez la souris nouveau-née âgée de 1 jour, il n'y ait pas d'inhibition de ce mécanisme fœtal à la naissance, ce qui contribuerait à renforcer la dépression respiratoire hypoxique. Dans la mesure où une telle activation n'est pas rencontrée chez le rat

nouveau-né, nous avons émis l'hypothèse 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. Ces données sont à mettre en relation avec une récente publication qui rapporte 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.

V. Rôle spécifique de certaines structures supra-pontiques sur le réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique

D'autres groupements neuronaux sont des régulateurs de la commande issue des générateurs de la respiration, nous les évoquerons dans les paragraphes qui vont suivre.

1. La substance grise périaqueducale (PAG)

La substance grise périaqueducale (PAG pour Periaqueductal gray) est localisée tout autour de l'aqueduc de Sylvius au sein du mésencéphale. Elle est subdivisée fonctionnellement en trois régions : la PAG dorso-latérale (dIPAG), latérale (IPAG) et ventro-latérale (vIPAG) (Liu & Hamilton, 1980, Behbehani, 1995). Kabat est le premier à avoir montré en 1936 que la stimulation électrique de la PAG exerce un effet facilitateur sur la respiration (Kabat, 1936). Des enregistrements réalisés par Orem et Netick ont ensuite montré qu'une faible proportion des neurones (15%) de la PAG présentaient des patterns de décharges temporellement liés aux phases du cycle respiratoire (Orem & Netick, 1982). Chez le rat, la PAG reçoit de nombreuses afférences provenant de l'hypothalamus et envoie des efférences vers différentes structures bulbo-pontiques, comme le KF, le bulbe rachidien ventro-latéral et le NTS (Cameron *et al.*, 1995a, Cameron *et al.*, 1995b), suggérant son implication dans CCR. En effet, la stimulation électrique de la dIPAG chez le rat diminue le temps expiratoire et augmente la fréquence respiratoire (Hayward *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2005). Les parties latérales jouent un rôle facilitateur dans le rythme respiratoire et la phonation en stimulant l'accélération de la contraction du diaphragme (Hayward *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2005).

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_2/H^+ et le réseau respiratoire bulbo-pontique (Ryan & Waldrop, 1995, Horn & Waldrop, 1998).

2. L'hypothalamus

Dans le diencephale, l'hypothalamus régule de nombreuses fonctions contribuant à l'homéostasie du milieu intérieur, le contrôle de la respiration n'y échappe pas.

a. L'hypothalamus caudal

L'hypothalamus caudal est situé dans la partie ventrale du diencephale et est subdivisé en trois régions majeures : l'aire hypothalamique postérieure (PH), le noyau dorso-médian (DM) et l'aire hypothalamique latérale (LH) (Waldrop & Porter, 1995). Des injections de traceur antérograde ont permis à certains auteurs de montrer que l'hypothalamus caudal envoie des afférences au mésencéphale, au Kölliker-Fuse, aux neurones du bulbe rachidien ventro-latéral ainsi qu'au mNTS (Ricardo & Koh, 1978, Vertes & Crane, 1996, Vicente *et al.*, 2016). 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).

Kabat est le premier à montrer que la stimulation électrique de l'hypothalamus caudal entraîne un effet facilitateur sur la respiration (Kabat, 1936). Son rôle dans la CCR a ensuite 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 & Gellhorn, 1958, Keller, 1960, Waldrop *et al.*, 1986, Waldrop & 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 ont une influence excitatrice sur la CCR. Par la suite, des enregistrements unitaires réalisés sur ces neurones ont montré qu'ils présentent une activité proportionnelle à la fréquence respiratoire et augmentée en réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie chez le chat anesthésié (Dillon & Waldrop, 1993). En effet, il a été observé qu'en cas de stimuli hypoxiques ou hypercapniques 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 chémosensible intrinsèque de ces neurones (Dillon & Waldrop, 1993). À 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 diencephale et le réseau respiratoire bulbo-pontique. Des études ont révélé qu'en cas de section de l'encéphale rostrale au diencephale la ventilation augmentait tandis qu'une section au niveau des colliculi n'a aucun effet sur la ventilation, suggérant que les zones rostrales au diencephale exercent un effet inhibiteur sur la respiration qui est contrebalancé par une influence facilitatrice provenant du diencephale (Fink *et al.*, 1962, Tenney & Ou, 1977).

b. L'hypothalamus rostral

L'hypothalamus rostral est situé dans la partie rostrale du diencephale. Le noyau paraventriculaire (PVN) est une structure de l'hypothalamus rostral qui semble être importante dans la régulation de la CCR. Des analyses de traceurs antérogrades ont mis en évidence une forte densité d'afférences provenant du PVN dans le préBötC, le noyau hypoglosse et les motoneurones phréniques (Mack *et al.*, 2007, Kc *et al.*, 2010). Le PVN contient essentiellement des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques. L'ocytocine exerce des fonctions cardio-respiratoires en augmentant la fréquence respiratoire et cardiaque (Jameson *et al.*, 2016).

Le blocage des récepteurs à l'ocytocine dans le préBötC abolit ces effets (Mack et al., 2007). En tant que neurotransmetteur, la vasopressine exerce des fonctions similaires à l'ocytocine en augmentant pareillement les fréquences respiratoire et cardiaque, des effets qui sont atténués lors de l'administration d'un bloquant des récepteurs de la vasopressine dans le préBötC (Kc et al., 2010). Ainsi, les neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques de l'hypothalamus rostral semblent avoir des effets majeurs sur les adaptations cardio-respiratoires.

VI. Les mécanismes neuronaux de la genèse du rythme respiratoire

La genèse du rythme respiratoire s'effectue au sein du réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique présenté ci-dessus. Les neurones respiratoires sont nécessaires à l'émergence d'un rythme respiratoire. Certains neurones présentent des propriétés autorythmiques, d'autres une activité rythmique acquise grâce aux générateurs.

Cette genèse repose principalement sur les trois générateurs décrits ci-dessus, c'est la théorie du triple oscillateur. Ce sont ces générateurs distincts et couplés qui ordonnent le rythme respiratoire c'est-à-dire l'alternance entre les trois phases de la respiration, en stimulant des neurones pré-moteurs du tronc cérébral qui eux projettent et activent les motoneurones innervant les muscles respiratoires (Figure 13). Il semblerait que l'inspiration soit une phase indispensable du cycle respiratoire générée par le préBötC alors que les phases post-inspiratoire et expiratoire actives soient conditionnelles, entraînées par le couplage des trois générateurs distincts précités (Del Negro et al., 2018). Parmi ces 3 générateurs, le préBötC semblerait avoir une place de choix en coordonnant les 3 phases du cycle respiratoire (Anderson & Ramirez, 2017, Del Negro et al., 2018). D'un côté sa seule activité génère l'inspiration et de l'autre son couplage avec le pFRG et le PiCo initie respectivement l'expiration active et la post-inspiration (Del Negro et al., 2018). Si le couplage préBötC-pFRG et préBötC-PiCo est établi, d'autres études sont encore nécessaires pour sonder les interactions entre le pFRG et PiCo. Cependant, les bases se solidifient pour commencer à comprendre la combinaison dynamique entre les trois générateurs, indépendants et couplés, du rythme respiratoire. Un dysfonctionnement de ces derniers aurait pour résultat une perturbation du cycle ventilatoire (Mellen & Thoby-Brisson, 2012). Ces générateurs sont également étroitement influencés par d'autres structures composant elles aussi le réseau neuronal respiratoire.

Les mécanismes neuronaux à l'origine de cette rythmogenèse ne sont pas pleinement élucidés. Nous verrons comment les trois phases de la respiration pourraient être générées et interconnectées. Pour cela, trois modèles ont été proposés et coexistent *i.e.* le modèle d'inhibition réciproque, le modèle pacemaker et le modèle hybride.

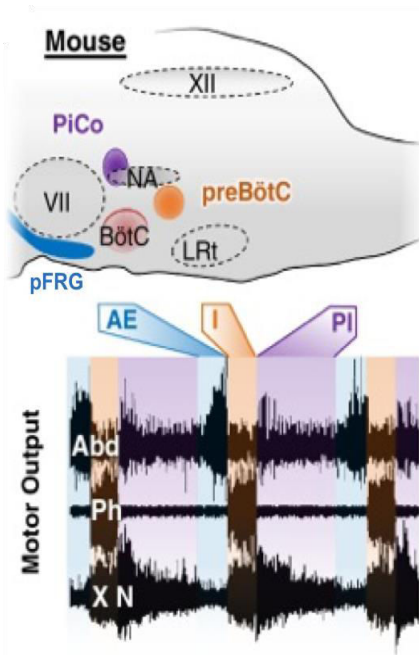


Figure 13 : Représentation sagittale du bulbe rachidien de souris montrant la localisation des 3 générateurs du rythme respiratoire et illustrant la théorie du « triple oscillateur »

Trois générateurs couplés et anatomiquement distincts génèrent les trois phases du rythme respiratoire chez les mammifères : préBötC, PiCo et pFRG, génèrent respectivement l'inspiration (I), la post-inspiration (PI) et l'expiration active (AE). Ces phases du cycle ventilatoire peuvent être observées au niveau des décharges motrices des nerfs abdominaux, phréniques et vagues. Elles sont précisément coordonnées pour produire un cycle respiratoire. Abd: nerf abdominal; Ph: nerf phrénique; XN: nerf vague ; BötC: complexe de Bötzing; NA: noyau ambigu; LRT: noyau réticulaire latéral; VII: noyau facial; XII: noyau hypoglosse ; pFRG: groupe respiratoire parafacial ; préBötC: complexe de pré-Bötzing ; PiCo: complexe post-inspiratoire. D'après (Ramirez *et al.*, 2016).

1. Le modèle d'inhibition réciproque ou modèle réseau

Selon ce modèle, l'établissement des phases du cycle respiratoire repose sur des interactions entre les neurones respiratoires composant le réseau neuronal respiratoire. Il propose que le rythme respiratoire résulte de connexions inhibitrices au sein des neurones respiratoires (Feldman & Smith, 1989, Richter, 1982, Shao & Feldman, 1997, Brockhaus & Ballanyi, 1998, Haji *et al.*, 2000, Richter & Spyer, 2001). Les neurones du réseau respiratoire s'agenceraient en une boucle d'inhibition. L'inhibition réciproque entre deux neurones du réseau réciproquement couplés par des connexions synaptiques inhibitrices, assure qu'un seul d'entre eux puisse décharger à la fois, lorsque l'un des neurones est actif, l'autre est inhibé et vice-versa. En effet, un neurone de ce réseau rendu inactif conduit à une levée d'inhibition des neurones auxquels il est connecté. Ces neurones ainsi activés vont inhiber en retour le neurone qui les a activés et ainsi de suite. S'agissant des neurones respiratoires, 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 et modulable.

En effet, le blocage des transmissions synaptiques inhibitrices dans une préparation *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolée provoque des apnées (Smith *et al.*, 2007), montrant l'importance des connexions inhibitrices dans la genèse du rythme respiratoire. Cependant, ce blocage n'abolit pas totalement le rythme inspiratoire (Janczewski *et al.*, 2013, Marchenko *et al.*, 2016). Ces derniers résultats remettent en question la nécessité des connexions inhibitrices dans la genèse du rythme respiratoire *in vivo* et ont mené à l'élaboration d'une autre hypothèse de la rythmogenèse respiratoire.

2. Le modèle pacemaker

Ce modèle pacemaker se base sur des études, réalisées sur les préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolées ou sur des tranches de tronc cérébral, qui ont montré que des neurones respiratoires sont capables de maintenir un profil de décharge rythmique indépendamment d'afférences excitatrices ou inhibitrices (Onimaru et al., 1989). Ce sont les neurones autorythmiques, qualifiés de neurones pacemakers. Ce modèle suggère que le rythme respiratoire serait généré par ces neurones pacemakers avant d'être ensuite transmis à l'ensemble des neurones du réseau respiratoire via des interconnexions excitatrices locales (Butera *et al.*, 1999). Ainsi, les neurones pacemakers imposeraient leur auto-rythme au reste des neurones respiratoires qui seraient alors qualifiés de « suiveurs » (Thoby-Brisson & Ramirez, 2001). Ces neurones autorythmiques ont été localisés au niveau du préBötC (Smith et al., 1991, Johnson et al., 1994, Thoby-Brisson & Ramirez, 2001) ainsi que dans le pFRG (Onimaru & Homma, 2003) et tout récemment au sein du PiCo (Anderson et al., 2016).

Même s'il reste à décortiquer, là où les connaissances sont encore à leur balbutiement, l'importance fonctionnelle jouée par certains générateurs sur le rythme respiratoire, les études récemment menées au cours des dernières décennies et en particulier pour le préBötC n'ont fait que souligner l'importance de ces derniers dans la rythmogenèse puisque sans eux le rythme respiratoire ne semble pas pouvoir être initié (Feldman et al., 2003, Del Negro et al., 2005, Feldman *et al.*, 2013, Del Negro et al., 2018).

3. Le modèle hybride

Ce modèle jette un pont entre les théories de réseau et de *pacemaker* en soutenant autorythmicité et phénomène d'inhibition, sans pour autant réussir à proposer un modèle de la rythmogenèse respiratoire incluant toutes les observations *in vitro* obtenues lors des différentes études s'intéressant aux mécanismes neuronaux du réseau neuronal respiratoire. La rythmogenèse respiratoire *in vivo* nécessite certainement autant les propriétés autorythmiques intrinsèques des neurones pacemakers que les connexions inhibitrices qui relient deux groupes de neurones de fonction antagoniste, et les deux sont sans aucun doute à prendre en compte dans l'étude de la commande centrale respiratoire.

Le modèle hybride tente d'appréhender la rythmogenèse selon l'organisation suivante : les pacemakers seraient responsables de la génération fondamentale du rythme, mais la fréquence et l'amplitude seraient dépendants des influx synaptiques et donc de l'activité du réseau respiratoire environnant (Koshiya & Smith, 1999, Del Negro et al., 2005, Del Negro & Hayes, 2008). En effet, la cohabitation de propriétés des neurones respiratoires non autorythmiques et des neurones respiratoires pacemakers est incontestable et rien n'empêcherait une action concomitante des deux ou en amont l'un de l'autre dans la génération du rythme respiratoire. Par conséquent, la rythmogenèse du rythme respiratoire ne reposerait pas uniquement sur l'activité des neurones dotés de propriétés pacemakers. Il faut alors

considérer que le rythme respiratoire qui résulte de l'activité du réseau neuronal respiratoire repose aussi sur des propriétés émergentes du réseau, par le biais des interactions récurrentes que les neurones constitutifs entretiennent. Grâce aux couplages excitateurs chimiques et électriques présents entre les neurones aux propriétés similaires, des décharges rythmiques sont générées à l'échelle du réseau. Cet ensemble neuronal se comporte alors comme un « groupe pacemaker » (Rekling & Feldman, 1998, Feldman & Del Negro, 2006, Del Negro & Hayes, 2008, Del Negro *et al.*, 2010, Feldman *et al.*, 2013). Ainsi l'activation de conductances intrinsèques dépolarisantes sous-tendent des couplages excitateurs récurrents entre les neurones possédant des propriétés similaires et conduisent à la genèse de décharges rythmiques qui s'auto-entretiendraient à l'échelle du réseau sans invoquer de propriétés pacemakers. Parallèlement à ces excitations récurrentes, les conductances I_{CAN} et I_{NaP} sont activées et permettent d'amplifier et de généraliser les dépolarisations dues aux informations synaptiques, jusqu'à aboutir à la formation d'une bouffée inspiratoire dans les neurones du réseau. La bouffée inspiratoire se termine par l'activation de conductances potassiques qui hyperpolarisent les neurones, jusqu'à ce qu'un nouveau cycle inspiratoire recommence (Rekling & Feldman, 1998, Haji *et al.*, 2000, Feldman & Del Negro, 2006, Rybak *et al.*, 2007, Del Negro *et al.*, 2010, Del Negro *et al.*, 2018). Deux modèles computationnels ont été construits et confirment remarquablement les propriétés émergentes du réseau neuronal respiratoire (Schwab *et al.*, 2010, Guerrier *et al.*, 2015). En effet, au sein du réseau, des fluctuations synaptiques peuvent initier l'activité de population neuronale par excitation récurrente.

Le rythme respiratoire provient donc d'un réseau neuronal complexe, dont chaque partie est indispensable à l'émergence d'un rythme respiratoire approprié. Le fait qu'il existe encore différentes théories sur la genèse du rythme respiratoire est inhérent à sa complexité fonctionnelle. Par ailleurs, la rythmogénèse respiratoire évolue au cours du développement jusqu'à se stabiliser à l'âge adulte (Achard *et al.*, 2005, Ren & Greer, 2006a, Wong-Riley *et al.*, 2013). Elle repose fortement sur les capacités autorythmiques des neurones durant le développement utérin, tandis que l'importance du réseau s'accroît lors du développement (Smith *et al.*, 2000, Feldman *et al.*, 2003).

Chapitre 2: Adaptation de la commande centrale respiratoire aux variations de CO₂/H⁺

L'automatisme ventilatoire est principalement assuré, nous l'avons vu dans le premier chapitre, par les centres respiratoires bulbo-pontiques, qui, grâce à de multiples afférences, ajustent la ventilation en fonction des contraintes métaboliques ou mécaniques permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme en stabilisant les pressions partielles artérielles et tissulaires en O₂ (PaO₂ /PtO₂) et CO₂ (PaCO₂/PtCO₂), ainsi que le pH à des valeurs physiologiques. La régulation de la CCR dépend donc de l'intégration de multiples signaux afférents comme ceux correspondant aux afférences contrôlant l'activité des centres respiratoires : les afférences métaboliques, déterminant la régulation chimique de la ventilation, et les afférences mécaniques, destinées à l'adaptation aux conditions mécaniques périphériques.

Nous nous intéresserons uniquement à la régulation chimique de la ventilation et particulièrement à la réponse induite lors d'une augmentation de PCO₂ artérielle et tissulaire et/ou d'une acidification du pH, hors du seuil physiologique. Nous décrirons d'abord la réponse ventilatoire à l'hypercapnie puis nous décortiquerons les mécanismes responsables de cette réponse.

I. Réponse ventilatoire aux variations de CO₂/H⁺

La réponse ventilatoire à l'augmentation de la PaCO₂ peut s'illustrer sous la forme d'une droite représentant la ventilation minute (\dot{V}_E en L·min⁻¹) en fonction de la PaCO₂ (en mmHg) (Figure 14). Pour chaque individu cette réponse peut être évaluée selon deux critères : la valeur seuil de PaCO₂ à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation et la pente de la droite qui traduit la sensibilité ventilatoire à la capnie. La valeur moyenne physiologique de la PaCO₂ chez les mammifères se situe autour de 40mmHg (Nattie, 1999). Lors d'une augmentation de la PaCO₂ au-delà de cette valeur seuil on observe une augmentation linéaire de la ventilation, à l'éveil ou pendant le sommeil. La ventilation double pour une augmentation de 2 mmHg de la PaCO₂ (Nattie, 2000, Guyenet *et al.*, 2010a).

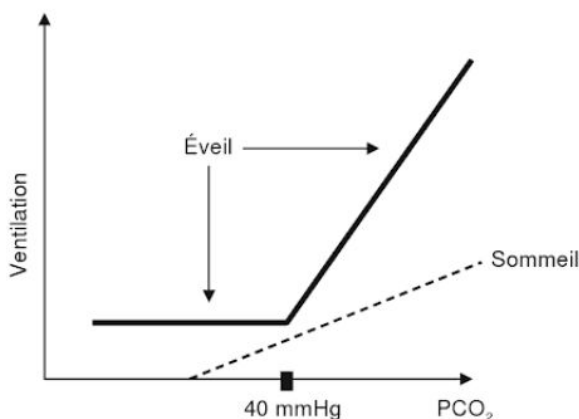


Figure 14 : Représentation schématique de la réponse ventilatoire au CO₂ chez l'Homme

La ventilation augmente linéairement avec l'augmentation croissante de la PCO₂ à partir d'un seuil de PCO₂ à l'éveil. Pendant le sommeil, la pente de la réponse est plus faible et la valeur seuil de PCO₂ à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation est abaissée. D'après (Straus & Fiamma, 2009).

Une augmentation de la fraction de CO₂ dans l'air inspiré (F_iCO₂), un frein à l'expiration ou une CCR insuffisante provoquent une augmentation de la PaCO₂ et une baisse du pH hors des valeurs physiologiques. L'organisme se trouve alors en hypercapnie, ce qui se traduit par une hyperventilation (Stunden *et al.*, 2001, Bissonnette & Knopp, 2004a, Putnam *et al.*, 2005). En cas d'acidose métabolique, le pH est diminué et la ventilation augmente afin d'abaisser la PaCO₂. La ventilation (\dot{V}_E) augmente via l'augmentation de la fréquence (f_R) et du volume courant (V_T), permettant de restaurer les pressions artérielles et tissulaires en O₂, CO₂ et le pH à des valeurs physiologiques. Cette homéostasie est maintenue par la régulation du V_T plutôt que par celle de la f_R chez les humains conscients au repos (Figure 15) (Duffin *et al.*, 2000, Ohashi *et al.*, 2013). Le profil de réponse ventilatoire au CO₂ est généralement constant chez les sujets, à savoir que les réponses du V_T à une augmentation de la PCO₂ diffèrent de celles de la f_R (Figure 15). La réponse typique de la plupart des sujets s'articule ainsi : lorsque le stimulus respiratoire a atteint un certain seuil de CO₂ noté T1, le V_T et la f_R augmentent linéairement avec la PCO₂ à une pente S1, le V_T contribuant plus que la f_R à l'augmentation de la ventilation ; au-dessus d'un deuxième seuil de CO₂ noté T2, le V_T et la f_R augmentent linéairement avec la PCO₂ à une pente S2, la f_R contribuant plus que le V_T à l'augmentation de \dot{V}_E (Figure 15). Ainsi, dans la phase initiale de réponse au CO₂, le V_T contribue plus que la f_R à la réponse ventilatoire au CO₂ alors que dans la phase secondaire de réponse au CO₂, la contribution de la f_R à la réponse ventilatoire dépasse celle de V_T . En d'autres termes, la réponse ventilatoire au CO₂ consiste en une augmentation initiale de V_T suivie d'une augmentation secondaire de f_R (Duffin *et al.*, 2000, Izumizaki *et al.*, 2011).

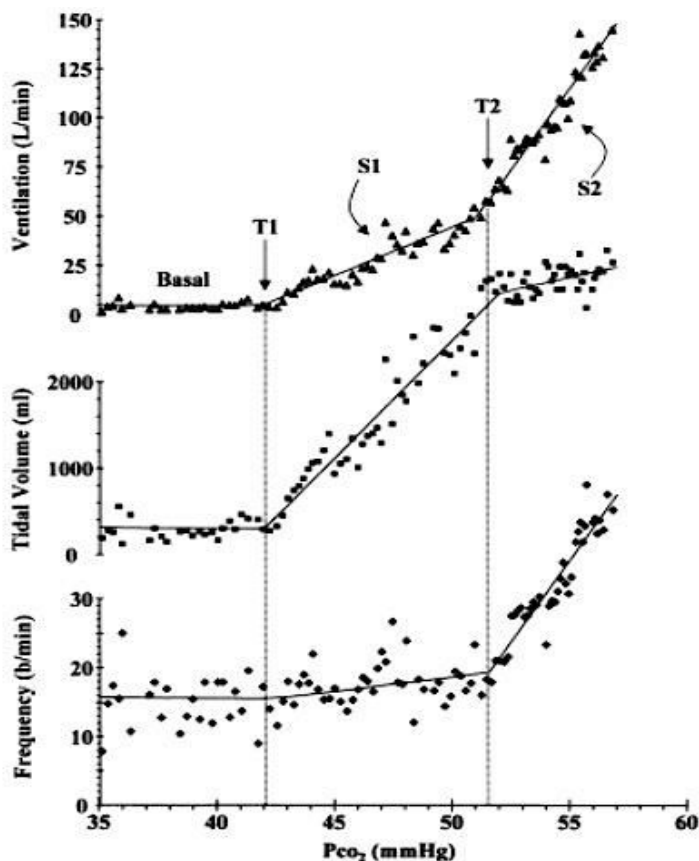


Figure 15 : Réponse ventilatoire au CO₂ illustrant les variations différentielles de la fréquence respiratoire et du volume courant chez l'Homme

La ventilation augmente linéairement à partir d'un seuil T1 de PCO₂ (≈ 42mmHg) avec une pente S1 via une augmentation plus importante du volume courant (V_T) que celle de la fréquence respiratoire (f_R). A partir d'un nouveau seuil T2 (≈ 51mmHg) de PCO₂ la pente S2 de la réponse augmente via une contribution de la f_R plus importante que celle du V_T . D'après (Duffin *et al.*, 2000).

1. Selon l'état de vigilance

Pendant le sommeil, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie subit des modifications importantes. La valeur seuil de PaCO₂, c'est-à-dire la valeur de PaCO₂ pour laquelle la ventilation commence à augmenter, se situe à des valeurs plus hautes qu'à l'éveil (Figure 14, page 37). De plus, la pente de la relation linéaire entre ventilation (\dot{V}_E) et niveau de PaCO₂ est diminuée, traduisant une diminution de la sensibilité au CO₂ (Figure 14, page 37). La sensibilité au CO₂ varie selon l'état d'éveil de l'individu (Mitchell, 2004a). Ces modifications sont de plus en plus marquées au fur et à mesure de l'approfondissement du sommeil (Douglas *et al.*, 1982, Malik *et al.*, 2012, Newton *et al.*, 2014). En effet, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est significativement réduite à tous les stades du sommeil par rapport à celle observée pendant l'éveil (Figure 16). Cette réponse tombe à moins de la moitié de celle de l'éveil pendant le sommeil non-REM, avec une baisse significative supplémentaire pendant le sommeil REM (Douglas *et al.*, 1982, Malik *et al.*, 2012, Newton *et al.*, 2014). Ce phénomène suggère que les mécanismes qui sous-tendent la réponse respiratoire à l'hypercapnie sont directement ou indirectement corrélés aux états de vigilance et qu'ils sont moins performants pendant le sommeil que pendant l'éveil (Mitchell, 2004a, Malik *et al.*, 2012).

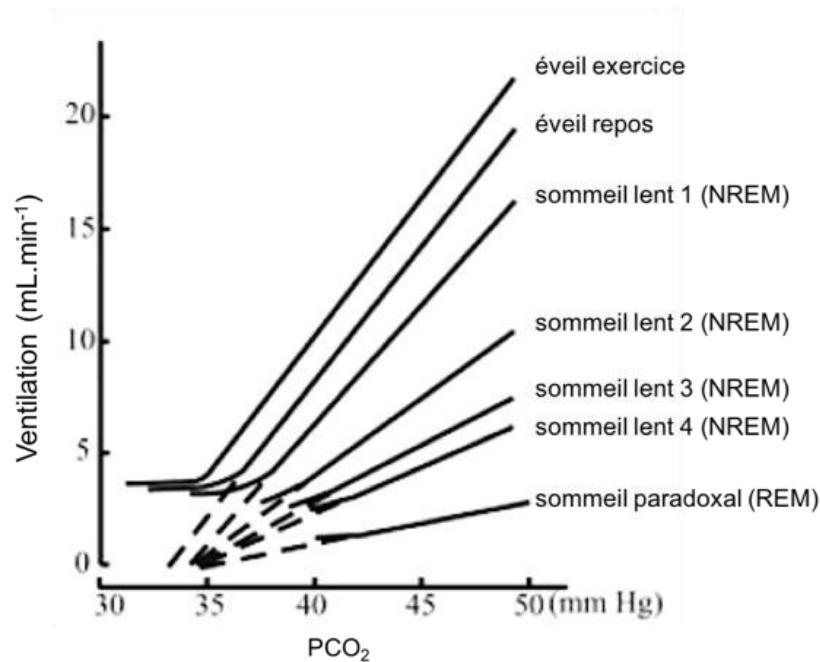


Figure 16 : Réponse ventilatoire au CO₂ en fonction des stades de vigilance chez l'Homme
La réponse ventilatoire au CO₂ diminue lors du sommeil par rapport à l'éveil et cela au fur et à mesure de son approfondissement. Adaptée de (Teran *et al.*, 2014).

2. Selon le développement

Chez le nouveau-né humain, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est réduite par rapport à l'adulte et augmente avec le développement post-natal jusqu'à se stabiliser aux alentours de 8 semaines de vie (Rigatto *et al.*, 1975, Frantz *et al.*, 1976, Sovik & Lossius, 2004). Chez le chien, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est inférieure chez le nouveau-né à celle de l'adulte (Nattie & Edwards, 1981). Chez le rat, elle connaît une maturation post-natale non linéaire dite en 3 phases (Figure 17). Elle est robuste entre P1 et P5, décline entre P5 et P12, et remonte ensuite pour atteindre les niveaux retrouvés chez l'adulte à P21 (Stunden *et al.*, 2001, Putnam *et al.*, 2005). Ainsi il semblerait que la réponse respiratoire au CO₂ pendant la période néonatale précoce soit réduite par rapport à l'âge adulte. Il semblerait que cette réponse réduite chez le nouveau-né soit la résultante d'une augmentation moindre de la fréquence respiratoire par rapport à celle du volume courant en réponse à une élévation de la PCO₂ comparativement à l'adulte (Stunden *et al.*, 2001, Putnam *et al.*, 2005).

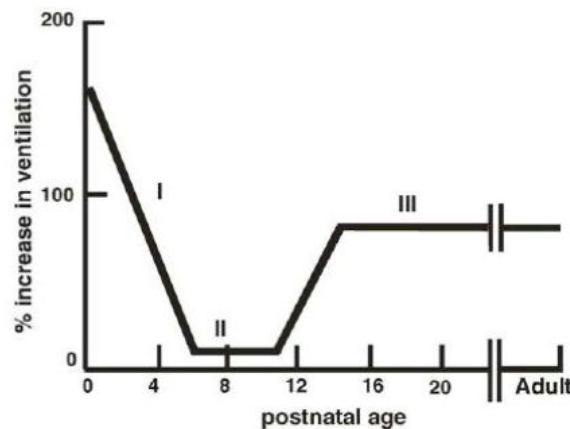


Figure 17 : Réponse ventilatoire au CO₂ chez le rat au cours du développement post-natal
La réponse post-natale observée chez le rat en réponse à 5% de CO₂ est triphasique. Entre P0 et P5 la réponse diminue progressivement (I). Elle est minimale entre P5 et P11 (II) et augmente ensuite progressivement entre P11 et P14 pour se stabiliser autour des valeurs retrouvées chez l'adulte à P15 (III). D'après (Stunden *et al.*, 2001) et (Putnam *et al.*, 2005).

Pour que cette réponse ait lieu, il faut que le stimulus CO₂/H⁺ soit détecté par des cellules présentant des propriétés chémoréceptrices capables de détecter des variations de CO₂/H⁺ et qui vont transmettre *via* leurs afférences ces chémo-informations recueillies aux centres respiratoires qui vont alors moduler l'activité des muscles respiratoires, produisant ainsi une ventilation adaptée aux contraintes métaboliques.

II. Le chémoréflexe responsable de la réponse ventilatoire aux variations de CO₂/H⁺

1. Définition

Les ajustements chémoréflexes cardiovasculaires et ventilatoires sont liés et doivent être envisagés communément dans un cadre pathologique mais la complexité de ces coopérations ne sera pas présentée dans ce travail doctoral où nous envisagerons le chémoréflexe à travers le prisme exclusif de la ventilation. Dans ce cadre, le chémoréflexe définit le processus par lequel un stimulus chimique, ici le CO₂/H⁺, module l'activité des centres contrôlant la respiration de manière à restaurer des valeurs normales de pH et de PCO₂.

2. Les acteurs du chémoréflexe : les chémorécepteurs

Ce chémoréflexe est initié par des senseurs du CO₂/H⁺ localisés en périphérie, au niveau de l'arche aortique et du glomus carotidien et en central, au sein du SNC (Smith *et al.*, 2010). Ils sont dénommés respectivement chémorécepteurs périphériques et chémorécepteurs centraux. Ces senseurs du CO₂/H⁺ assurent la détection des modifications des pressions partielles artérielles et tissulaires au CO₂ et du pH et en réponse modulent l'activité des centres ventilatoires et cardiovasculaires. Les arcs chémoréflexes l'un central et l'autre périphérique jouent un rôle clef dans le contrôle de la ventilation alvéolaire ce qui permet d'assurer un taux d'échange gazeux adapté aux besoins métaboliques en O₂ et d'élimination en CO₂.

En physiologie respiratoire, lors d'une élévation du CO₂/H⁺, l'activation des arcs chémoréflexes, l'un périphérique et l'autre central, induit une augmentation de la commande motrice respiratoire qui va se traduire par une augmentation de l'activité des muscles respiratoires et *in fine* par une augmentation de la ventilation minute via une augmentation de la f_R et du V_T . Il semblerait que ce soit le V_T qui augmente en premier lieu et que la f_R augmente en second lieu lorsque l'hypercapnie atteint un niveau significatif (Duffin *et al.*, 2000, Izumizaki *et al.*, 2011). Il faut garder à l'esprit que le chémoréflexe exerce également une influence importante sur les fonctions cardiaques et vasculaires en modulant l'activité cardiaque et le tonus vasculaire. En effet, lors d'une élévation de CO₂/H⁺, l'activation des chémorécepteurs va entraîner non seulement une hyperventilation réflexe avec augmentation de la f_R et du V_T mais aussi la stimulation de l'appareil cardio-circulatoire, provoquant une tachycardie et une augmentation du débit sanguin.

3. Chémiosensibilité des chémorécepteurs aux *stimuli* CO₂/H⁺

Deux hypothèses coexistent concernant la chémiosensibilité des chémorécepteurs. Soit ces chémorécepteurs ont une sensibilité directe au CO₂ dissous, soit ils sont sensibles aux variations de H⁺ sous-tendant les variations de pH. La sensibilité des chémorécepteurs à ces deux *stimuli* ne fait pas consensus dans la communauté scientifique, ils sont donc dénommés par convention, chémorécepteurs au CO₂/H⁺.

a. Une sensibilité directe au CO₂ dissous

Le CO₂ est extrêmement soluble dans le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les tissus, ce qui lui confère de hautes capacités de diffusion (Nattie, 1999).

b. Une sensibilité au H⁺ - variations de pH

Le CO₂ est hydraté par addition d'une molécule d'eau (H₂O), grâce à l'anhydrase carbonique, en acide carbonique (H₂CO₃) qui se dissocie immédiatement en ions bicarbonates (HCO₃⁻) et en ions hydrogènes (H⁺) selon l'équation de Henderson-Hasselbalch suivante :



Les protons H⁺ produits lors du métabolisme cellulaire sont captés par les ions bicarbonates HCO₃⁻ afin d'être éliminés de l'organisme sous forme de CO₂. Inversement, toute augmentation de la concentration de CO₂ dans l'environnement provoque une augmentation de la concentration en H⁺ qui conduit à une acidification du pH sanguin (Nattie, 1999). Au vu des données de la littérature, cette dernière hypothèse semble être majoritairement privilégiée (Nattie, 1999, Lahiri & Forster, 2003, Chernov *et al.*, 2010, Guyenet *et al.*, 2010a, Guyenet *et al.*, 2010b, Guyenet *et al.*, 2013, Guyenet, 2014, Guyenet & Bayliss, 2015b), bien qu'à tout instant le pH soit dépendant de la PaCO₂.

Nous nous proposons de décrire l'anatomie, la localisation et les mécanismes de la chémoréception des chémorécepteurs centraux et périphériques impliqués dans la réponse ventilatoire aux variations de CO₂/H⁺.

III. Les chémorécepteurs périphériques

1. Mise en évidence

En 1930, Heymans montre que les corps carotidiens chez le chien sont impliqués dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Cette découverte lui vaudra le prix Nobel en 1938 (Konig & Seller, 1991). L'importance des chémorécepteurs périphériques dans l'homéostasie ventilatoire a par la suite été mise en évidence par différentes études dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Par exemple, Lahiri et Delaney ont montré que lors d'une

élévation de la PaCO₂ chez le chat, l'activité des nerfs carotidiens (Lahiri & DeLaney, 1975b) ainsi que la fréquence respiratoire (Lahiri & DeLaney, 1975a) sont augmentées.

Dans une moindre mesure, les corps aortiques peuvent être considérés, du moins chez certaines espèces, comme des chémorécepteurs périphériques auxiliaires car certaines études *in vitro* suggèrent qu'ils pourraient partager le même rôle que les corps carotidiens (Piskuric *et al.*, 2011, Piskuric & Nurse, 2012). Ils pourraient être mis en jeu lors d'un déficit chronique des corps carotidiens (Hodges & Forster, 2012, Gourine & Funk, 2017).

2. Description anatomique et localisation

Les chémorécepteurs périphériques sont essentiellement représentés par les corps carotidiens et aortiques (Bianchi *et al.*, 1995a, Bokinsky *et al.*, 1973). Ils sont situés respectivement à la bifurcation des artères carotides communes et au niveau de la crosse de l'artère aorte (Figure 18).

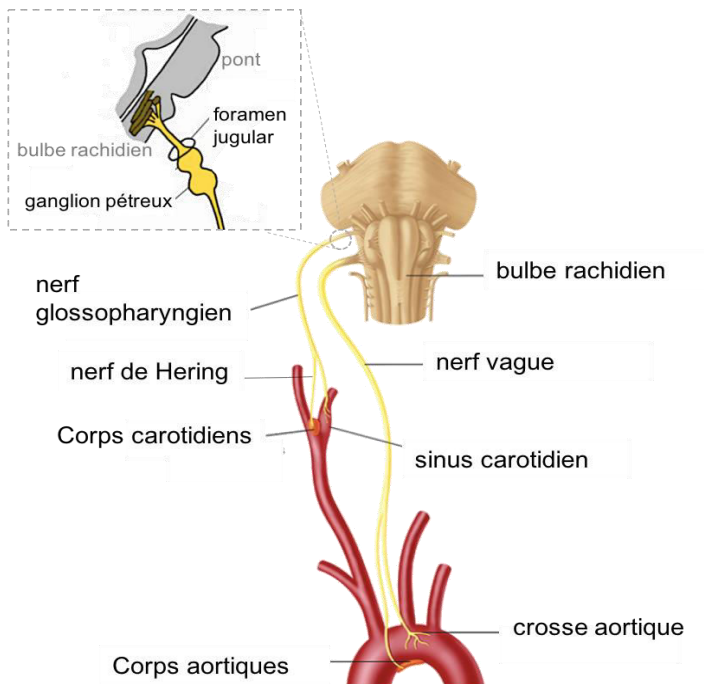


Figure 18 : Localisation et innervation des chémorécepteurs périphériques

Vue frontale de la crosse aortique où se situent les corps aortiques et de la bifurcation des artères carotides communes où se situent les corps carotidiens. Le corps carotidien est innervé par le nerf de Hering qui rejoint ensuite le nerf glossopharyngien dont les corps cellulaires des neurones en T qu'il contient sont regroupés dans un ganglion sensitif au niveau du jugular foramen, le ganglion pétreux. Adaptée à partir d'éléments sans source. © Tous droits réservés.

Le corps carotidien est un organe se trouvant par paire, constitué de deux types cellulaires différents, à savoir les cellules glomiques de type I qui sont les cellules chémoréceptrices et les cellules sus-tentaculaires de type II qui serviraient d'interface entre les cellules de type I et le sang (Figure 19) (Gonzalez *et al.*, 1994). Les cellules chémoréceptrices de type I se trouvent circonscrites par un réseau vaste et dense de capillaires sanguins (Figure 19). La proximité de ces capillaires permet la diffusion des gaz et métabolites sanguins jusqu'à ces cellules. Cette architecture vasculaire particulière autour des corps carotidiens leur permet de détecter les modifications des paramètres sanguins. Les cellules chémoréceptrices de type I ont dans leur cytoplasme de nombreuses vésicules contenant divers neurotransmetteurs (Gonzalez *et al.*, 1994) (Figure 19). La densité de ces vésicules de stockage croît en fonction de

la proximité des cellules glomiques qui les contiennent avec une terminaison nerveuse (Gonzalez et al., 1994). En effet, les corps carotidiens reçoivent des fibres nerveuses issues du nerf du sinus carotidien ou nerf de Hering (McDonald & Mitchell, 1981). Ces fibres nerveuses dites fibres sensorielles chémoréceptrices établissent des contacts synaptiques directs au niveau des cellules glomiques des corps carotidiens (Figure 19) (McDonald & Mitchell, 1981, Gonzalez et al., 1994). Le nerf de Hering rejoint le nerf glossopharyngien (IX) dont les corps cellulaires des neurones en T qu'il contient sont regroupés dans un ganglion sensitif au niveau du *jugular foramen*, le ganglion pétreux (Figure 18). Ce ganglion contient les corps cellulaires des fibres chémosensibles qui innervent bi-directionnellement à la fois les cellules glomiques des corps carotidiens et les neurones du NTS commissural. Ces afférences issues des corps carotidiens véhiculent les informations provenant des cellules glomiques majoritairement au NTS commissural. Les neurones localisés dans le NTS commissural sont donc excités par la stimulation des chémorécepteurs périphériques (Chitravanshi & Sapru, 1995). Le NTS apparaît alors comme un relai et un centre intégrateur de l'information sensorielle. Le marquage du tronc cérébral de rat par la protéine c-FOS lors d'une stimulation hypoxique des corps carotidiens a permis de localiser les zones d'intégration des fibres chémosensibles dans le NTS commissural, mais aussi dans la partie caudale du noyau réticulaire bulbaire ventro-latéral (cVLM) et dans le noyau ambigu (Erickson & Millhorn, 1991). Ces observations ont été confirmées, par un marquage rétrograde à partir du corps carotidien (Finley & Katz, 1992).

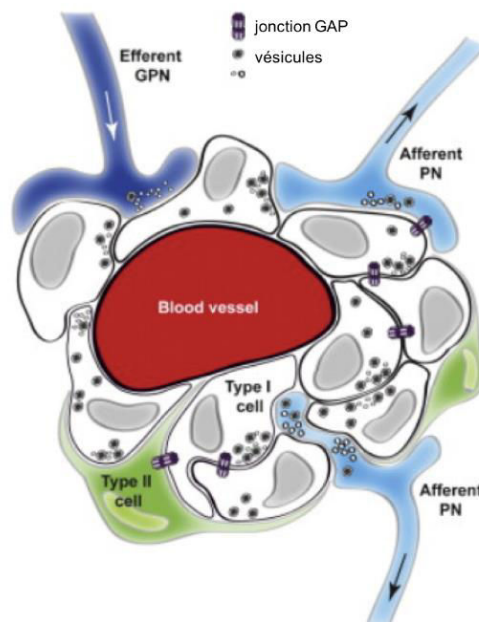


Figure 19 : Organisation cellulaire et innervation des corps carotidiens

Représentation schématique montrant les cellules chémosensibles (Type I cell) contenant des vésicules de sécrétion ainsi que les cellules sus-tentaculaires (Type II cell) des corps carotidiens. Les cellules chémosensibles reçoivent une innervation par des fibres afférentes (PN) et efférentes (GPN) provenant du nerf glossopharyngien. Ces groupements cellulaires sont à proximité des vaisseaux sanguins. Il existe des jonctions GAP entre les différentes cellules voisines. Adaptée de (Nurse & Piskuric, 2013).

3. Description fonctionnelle

Les chémorécepteurs carotidiens seraient responsables d'une grande partie de la réponse ventilatoire à l'O₂ et d'une petite partie de la réponse ventilatoire au CO₂/H⁺, qui reste un *stimulus* principalement détecté par les chémorécepteurs centraux (Heeringa *et al.*, 1979, Lahiri & Forster, 2003, Forster & Smith, 2010). Le modèle fonctionnel de la chémoréception périphérique postule que les cellules glomiques de type I sont les récepteurs aux *stimuli* chimiques CO₂/H⁺ et sont reliées par des synapses aux terminaisons nerveuses des neurones du ganglion pétreux. En réponse à ces *stimuli*, les cellules réceptrices libèrent des neurotransmetteurs qui se lient aux récepteurs spécifiques situés sur la membrane des terminaisons sensorielles des neurones du ganglion pétreux, augmentant la décharge sensorielle vers certaines structures encéphaliques respiratoires du système nerveux central.

4. Mécanisme de la chémoréception périphérique au CO₂/H⁺

L'élévation du stimulus CO₂/H⁺ est liée à une augmentation de la concentration intracellulaire des cellules glomiques en H⁺, soit par un apport direct en ions H⁺, soit par la conversion du CO₂ en ions H⁺. Deux mécanismes de transduction du signal CO₂/H⁺ distincts coexistent au niveau des cellules glomiques de type 1 des corps carotidiens (Figure 20) (Gonzalez *et al.*, 1994, Roy *et al.*, 1997, Lahiri & Forster, 2003). L'augmentation des ions H⁺ intracellulaire peut induire l'extrusion des ions H⁺ contre l'entrée d'ions Na⁺ par une pompe Na⁺/H⁺. L'augmentation des ions Na⁺ intracellulaires favorise l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule grâce à une pompe Na⁺/Ca²⁺, ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (Figure 20)(Gonzalez *et al.*, 1994). L'élévation intracellulaire en H⁺ peut également provoquer l'inhibition de canaux K⁺ et stopper le courant sortant potassique provoquant une dépolarisation de la membrane et l'ouverture de canaux Ca²⁺ responsables d'entrée massive de Ca²⁺ dans la cellule glomique de type 1 (Roy *et al.*, 1997, Lahiri & Forster, 2003) (Figure 20). Quel que soit le mécanisme de chémotransduction, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium provoque l'exocytose des vésicules de stockage contenues dans les cellules glomiques, riches en neuromédiateurs et neuropeptides, dans la fente synaptique (Figure 20) (Gonzalez *et al.*, 1994). Cette libération de neuromédiateurs et de neuropeptides concourt à transmettre dans les structures respiratoires du tronc cérébral, le signal chémosensible détecté par les cellules glomiques de type 1 (Overholt *et al.*, 2001, Lahiri & Forster, 2003, Gonzalez *et al.*, 2003).

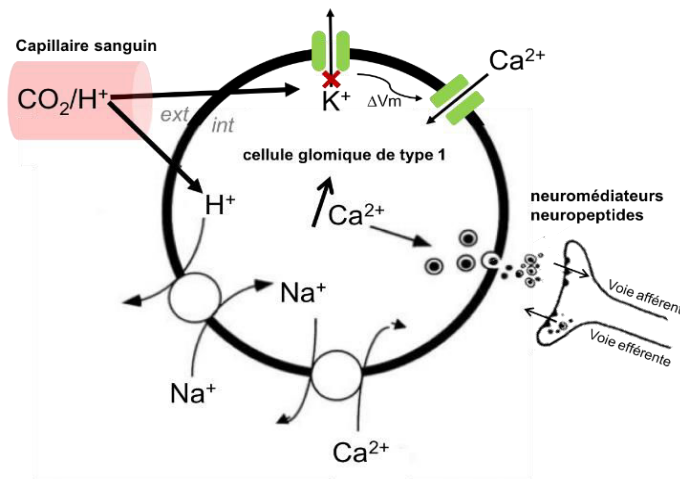


Figure 20 : Modèle de la transduction du stimulus CO₂/H⁺ dans la cellule chémoréceptrice de type 1 du corps carotidien chez l'adulte

Il existe deux mécanismes de transduction du signal CO₂/H⁺ distincts. A la suite d'une élévation de CO₂/H⁺ sanguin, le pH intracellulaire de la cellule glomique de type 1 diminue, entraînant soit l'inhibition d'un courant K⁺ sortant, conduisant à la dépolarisation membranaire et à l'entrée d'ions Ca²⁺ dans la cellule, soit l'activation d'un mécanisme d'extrusion des ions H⁺ dépendant des ions Na⁺ via un échangeur Na⁺/H⁺, augmentant la concentration intracellulaire de Na⁺ et favorisant l'inversion des échanges Na⁺/Ca²⁺ et provoquant une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. L'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire provoque l'exocytose des vésicules de stockage, riches en neuromédiateurs et neuropeptides, dans la fente synaptique permettant de transmettre le signal chémosensible CO₂/H⁺ détecté par les cellules glomiques de type 1 aux structures respiratoires encéphaliques. ΔVm : augmentation du potentiel de membrane (dépolarisation) ; ext : milieu extracellulaire ; int : milieu intracellulaire. Adaptée de (Gonzalez et al., 1994)

IV. Les chémorécepteurs centraux

1. Mise en évidence

C'est dans les années 60, que Hans Loeschcke et Robert Mitchell ont cherché le site de la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺. L'application focale de solutions acides sur la région ventrale du tronc cérébral chez le chat anesthésié et décortiqué leur a permis d'identifier la surface ventrale du bulbe rachidien comme structure chémosensible (Mitchell *et al.*, 1963b, Mitchell *et al.*, 1963a, Severinghaus, 1998). C'est avec l'essor et la sophistication des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* que différentes régions du tronc cérébral vont être explorées plus finement. Les multiples recherches ont permis de préciser des structures chémosensibles au CO₂/H⁺ distribuées dans le tronc cérébral et l'hypothalamus (Branco *et al.*, 2009, Nattie & Li, 2008, Nattie & Li, 2009, Guyenet et al., 2010b, Li *et al.*, 2013b).

Nota bene : Le terme chémosensible sera utilisé pour définir les cellules capables de réagir aux variations de CO₂/H⁺ sans pour autant répondre à l'appellation de chémorécepteur (Huckstepp & Dale, 2011).

2. Description anatomique et localisation

Au niveau du système nerveux central (SNC), il existe de nombreuses populations neuronales possédant des propriétés de chémosensibilité intrinsèques aux variations de CO₂/H⁺ du tissu nerveux et du liquide extracellulaire cérébral (LEC) (Figure 21) (Guyenet et al., 2010a, Nattie & Li, 2012). Une partie de ces populations a pu être identifiée par des approches d'électrophysiologie *in vitro* et par cartographie de l'expression du gène *c-fos* (Teppema et al., 1997). Parmi les structures neuronales chémosensibles, on trouve la partie caudale du noyau du tractus solitaire (Chitravanshi & Sapru, 1995, Coates et al., 1993, Berquin et al., 2000a, Nichols et al., 2008, Conrad et al., 2009), le complexe de pré-Bötzinger (Solomon et al., 2000, Krause et al., 2009), les neurones sérotoninergiques des noyaux des raphés pallidus et obscurus (Larnicol et al., 1994, Haxhiu et al., 1996, Wang & Richerson, 1999, Wang et al., 2001b, Haxhiu et al., 2001), les neurones sérotoninergiques du groupe parapyramidal (Bradley et al., 2002, Richerson, 2004), le locus coeruleus (Pineda & Aghajanian, 1997, Filosa et al., 2002, Nichols et al., 2008), le RTN (Li & Nattie, 2002, Guyenet & Mulkey, 2010), les neurones pré-inspiratoires du pFRG (Onimaru et al., 2008), la substance grise périaqueducale (Kramer et al., 1999) et l'hypothalamus caudal (Fink et al., 1962, Waldrop, 1991, Nattie & Li, 2009, Li et al., 2013b). Il est intéressant de noter qu'une grande partie des neurones chémosensibles au CO₂/H⁺ a été localisée à proximité des artères dans le LC, le RTN, les noyaux des raphés pallidus et obscurus ainsi que le noyau du raphé dorsal, suggérant une localisation idéale de ces cellules pour intégrer rapidement les variations chimiques des gaz du sang et du pH (Okada et al., 2002, Bradley et al., 2002, Severson et al., 2003, Nattie & Li, 2012).

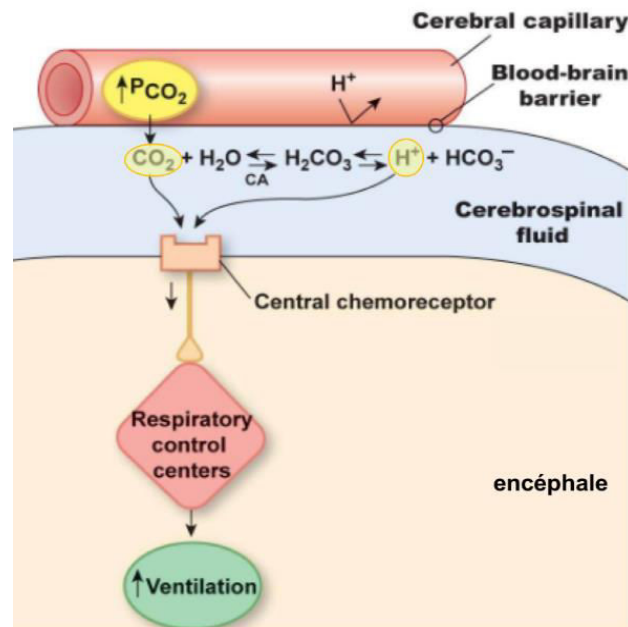


Figure 21 : Vue d'ensemble de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺

L'élévation de CO₂/H⁺ dans le liquide céphalo-rachidien est captée par les chémorécepteurs centraux et induit une augmentation de la commande centrale respiratoire qui va se traduire *in fine* par une augmentation de la ventilation. Adaptée de (Silverthorn, 2007).

Parmi ces structures, l'identification des chémorécepteurs centraux stricto sensu est difficile à réaliser en pratique car l'acidification *in vivo*, *in vitro* ou en culture, active ou inhibe de nombreux neurones mais tous ne permettent pas d'exercer une influence sur l'activité du réseau respiratoire. Aujourd'hui il n'y a de certitude ni sur le ligand (CO₂, H⁺) reconnu par les structures neuronales chémosensibles ni sur les mécanismes senseurs propres à chaque structure. Différentes écoles s'affrontent sur les structures candidates contenant des chémorécepteurs centraux. Ces différentes conceptions visant à assigner un rôle ou non de chémorécepteur central aux diverses structures neuronales chémosensibles au CO₂/H⁺ vérifient un certain nombre de critères requis, qui font consensus au sein de la communauté scientifique, pour jouer le rôle de chémorécepteur central. Les neurones des structures qualifiées de chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺ doivent présenter les caractéristiques suivantes : 1) posséder des propriétés intrinsèques leur conférant une sensibilité directe aux variations de CO₂/H⁺ se traduisant par une augmentation ou une diminution de leur fréquence de décharge, 2) entretenir des connexions synaptiques directes ou indirectes avec les générateurs, 3) aboutir à une modification mesurable de la respiration (Richerson *et al.*, 2005). Actuellement, la chémoréception centrale semble être opérée par trois principales structures répondant à l'appellation de chémorécepteurs centraux : les neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG (Mulkey *et al.*, 2004, Stornetta *et al.*, 2006, Guyenet & Bayliss, 2015b), les neurones sérotoninergiques des noyaux des raphés (Wang *et al.*, 2001b, Hodges *et al.*, 2004, Hodges & Richerson, 2010a) et les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Pineda & Aghajanian, 1997, Oyamada *et al.*, 1998, Biancardi *et al.*, 2008, de Carvalho *et al.*, 2014, Vicente *et al.*, 2016, de Carvalho *et al.*, 2017). En marge de ces structures, les autres structures citées ci-dessus, décrites comme étant chémosensibles au CO₂/H⁺, peuvent ainsi contribuer largement à la chémoréception centrale en régulant l'activité des structures « dédiées » à cette fonction.

L'état des recherches concernant les validations pour chacune des populations candidates au rôle de chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺ ou simplement au rôle de structures chémosensibles au CO₂/H⁺ ne sera pas détaillé dans ce manuscrit. En revanche, toutes ces structures participant au réseau neuronal respiratoire ou modulant ce dernier ont été décrites dans le premier chapitre de ce manuscrit. Ce sont leurs implications et leurs imbrications dans ce réseau neuronal respiratoire couplées à leur fonction chémosensible et/ou chémoceptrice qui permettent de comprendre l'ensemble de la chémo-réponse aux *stimuli* CO₂/H⁺.

3. Description fonctionnelle

Les chémorécepteurs centraux contribuent en grande majorité à la réponse ventilatoire au CO₂/H⁺ (Morrell *et al.*, 2001) et dans une moindre proportion à la réponse ventilatoire à l'O₂ (Voituron *et al.*, 2011, Gourine & Funk, 2017). Des découvertes neuroanatomiques et neurophysiologiques ont révélé que les afférences des corps carotidiens convergent vers des neurones chémosensibles au niveau du RTN, du NTS et du noyau parabrachial latéral (Stornetta

et al., 2006, Takakura *et al.*, 2006a, Guyenet et al., 2008, Fortuna *et al.*, 2009, Blain *et al.*, 2010). Ce circuit neuronal semblerait servir de socle à une modulation des chémorécepteurs centraux par les chémorécepteurs périphériques (Dahan *et al.*, 2007, Blain *et al.*, 2009, Blain et al., 2010, Fiamma *et al.*, 2013). En effet, des études faites chez le chien ont montré que les chémorécepteurs périphériques semblaient avoir des influences synergiques et additives marquées sur la sensibilité des chémorécepteurs centraux au CO₂ (Blain et al., 2010, Smith *et al.*, 2015). Ainsi, l'ampleur des réponses ventilatoires aux *stimuli* CO₂/H⁺ dépend probablement de la force des interactions des chémorécepteurs périphériques-centraux ainsi que de leurs chémosensibilités individuelles (Smith et al., 2015), mais aussi de l'état de vigilance, de repos ou d'exercice de l'individu, de la durée d'exposition aux *stimuli* CO₂/H⁺ et des niveaux systémiques et centraux de PCO₂ et PO₂ (Guyenet, 2014, Smith et al., 2015).

4. Mécanisme de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺

Au milieu des années 2000, il a été suggéré que les réponses électrophysiologiques des neurones chémosensibles en réponse à des variations de CO₂/H⁺ pouvaient être médiées par la fermeture de canaux potassiques (Jiang *et al.*, 2005, Putnam *et al.*, 2004). Ces canaux responsables d'un courant potassique sortant sont fortement exprimés dans de nombreuses sous-classes de neurones respiratoires et sont fortement sensibles aux variations de pH physiologique (Sirois *et al.*, 2000, Lesage, 2003, Talley *et al.*, 2003, Washburn *et al.*, 2003). L'inhibition des canaux par l'élévation de CO₂/H⁺ extracellulaire stoppe ce courant sortant potassique et peut ainsi dépolariser et augmenter l'excitabilité dans les cellules qui les expriment (Bayliss *et al.*, 2001, Washburn *et al.*, 2002). Parmi les canaux potassiques candidats, la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ impliquerait au moins l'expression de canaux potassium sensibles à l'acidité du pH de la famille TASK (pour TWIK-related Acid Sensing K⁺ channel) par les chémorécepteurs centraux cités plus haut dans ce chapitre. De nombreux autres types de canaux potassiques comme les canaux Kir (pour Inwardly Rectifying K⁺ current) et les canaux TRP (pour Transient Receptor Potential) présentent une sensibilité au pH caractérisée par des changements conformationnels provoquant la fermeture des pores suite à une acidification du milieu et pourraient s'avérer être de bons candidats pour la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ (Putnam, 2010, Bayliss *et al.*, 2015). Il est aussi tout à fait possible d'envisager des mécanismes complémentaires venant s'ajouter à l'implication de canaux potassiques sensibles au pH comme par exemple des mécanismes astrocytaires ATP-dépendants (Gourine, 2005, Putnam, 2010, Guyenet & Bayliss, 2015a).

Nous développerons les mécanismes moléculaires au sein des trois principales structures respiratoires, caractérisées comme chémorécepteurs centraux, sur lesquelles repose une grande partie de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺.

a. Au niveau des neurones sérotoninergiques des raphés

Différentes études ont montré qu'une proportion des neurones des RPa, ROb et RMg présente une augmentation de l'expression de *c-fos* en réponse à une hypercapnie *in vivo* (Larnicol et al., 1994, Haxhiu et al., 1996, Okada et al., 2002, Johnson *et al.*, 2005). Des études électrophysiologiques *in vitro* effectuées sur des tranches de bulbe rachidien ont permis de mettre en évidence que ces neurones peuvent répondre à une augmentation du CO₂/H⁺ par un accroissement de leur taux de décharge neuronale (Figure 22) (Richerson, 1995, Richerson, 2004, Richerson et al., 2005). D'autres expérimentations *in vitro* sur tranches ou culture primaire ont 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 sont plus réceptifs aux variations de l'équilibre acido-basique qu'aux variations de CO₂ (Wang *et al.*, 1998b, Wang et al., 2001b, Hodges & Richerson, 2010a, Hodges & Richerson, 2010b). Les expériences *in vivo* viennent confirmer le rôle des neurones sérotoninergiques des raphés. En effet, des enregistrements réalisés sur les neurones du RPa et ROb chez le chat ont permis de constater que ces derniers augmentent leur fréquence de décharge en réponse à l'inhalation de CO₂ (Veasey *et al.*, 1995, Veasey *et al.*, 1997). De plus, l'acidification du milieu extracellulaire par acidification tissulaire locale grâce au CO₂ et par inhibition de l'anhydrase carbonique au niveau des noyaux des raphés bulbaires chez le rat entraîne une augmentation de l'activité du nerf phrénique (Bernard *et al.*, 1996, Nattie & Li, 2001). Par ailleurs, des expériences 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). Enfin, l'utilisation des outils génétiques a permis de démontrer encore plus solidement le caractère chémosensible de ces populations neuronales. L'étude des souris mutantes conditionnelles permettant l'invalidation du facteur de transcription *Lmx1b* nécessaire pour la différenciation des neurones sérotoninergiques met en évidence une ablation quasi-totale des populations sérotoninergiques dans le SNC. Chez ces mutants, les réponses respiratoires observées lors d'un challenge hypercapnique sont diminuées de moitié par rapport aux réponses enregistrées chez les contrôles (Zhao *et al.*, 2006). Ces résultats ont pu être confirmés dans une étude (Ray *et al.*, 2011) où les neurones sérotoninergiques du tronc cérébral de souris sont spécifiquement inactivés par la technique DREADD (pour Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) (Armbruster *et al.*, 2007). Cette étude conclut que la réduction de l'activité des neurones sérotoninergiques du tronc cérébral aboutit à diminution transitoire de la chémosensibilité au CO₂ et au H⁺ (Ray et al., 2011). 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), à savoir qu'elle se retrouve diminuée pendant la phase REM du sommeil (Kubin *et al.*, 1996). Cette diminution de la signalisation sérotoninergique pourrait en partie expliquer la diminution de la réponse au CO₂/H⁺ constatée pendant le sommeil REM (Richerson, 2004, Mitchell, 2004b). La contribution des neurones sérotoninergiques à la

réponse ventilatoire à l'hypercapnie pourrait aussi dépendre du stade de développement. De fait, en enregistrant l'activité des neurones des raphés bulbaire, 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 & Richerson, 1999).

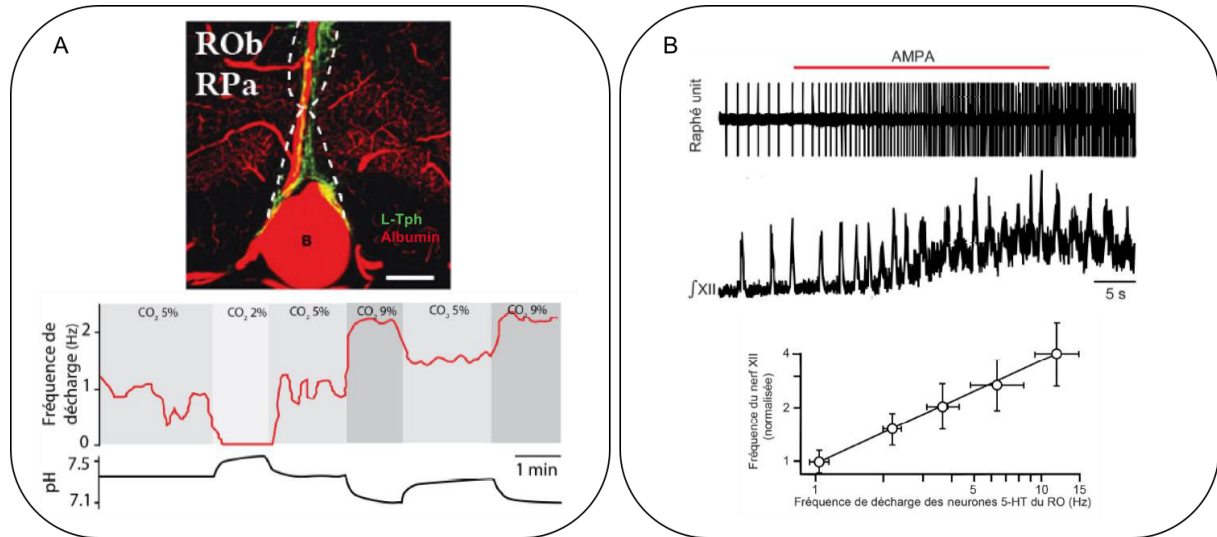


Figure 22 : Les neurones sérotoninergiques du noyau du Raphé Obscurus sont intrinsèquement sensibles au CO₂/H⁺ et stimulent des motoneurones respiratoires

A. La microphotographie représente la localisation des neurones sérotoninergiques du raphé Obscurus (ROb) (L-Tryptophane hydroxylase, vert) et des vaisseaux sanguins (Albumine, rouge). ROb: noyau du Raphé Obscurus; RPa: noyau du Raphé Pallidus. La barre horizontale indique 200 μ m. D'après (Richerson, 2004). Le tracé montre la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques du ROb par rapport aux variations de CO₂/H⁺. Les neurones sérotoninergiques du ROb sont sensibles aux variations de CO₂/H⁺ *in vitro*. Ils répondent à une augmentation du CO₂/H⁺ par un accroissement de leur taux de décharge. D'après (Richerson *et al.*, 2001). **B.** Tracés intégrés de l'activité du nerf hypoglosse (12n) en fonction de l'activité d'un neurone sérotoninergique du ROb et tracé de la relation entre la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques du ROb et celle du nerf hypoglosse. L'administration spécifique de l'agoniste du récepteur au glutamate AMPA dans le ROb induit une augmentation de leur taux de décharge provoquant un accroissement proportionnel de la fréquence des bouffées d'activité enregistrées au niveau du nerf XII qui reflète l'activité du préBötC. D'après (Ptak *et al.*, 2009).

Les mécanismes moléculaires sous-tendant les propriétés de chémoréception des neurones sérotoninergiques ont été identifiés grâce à l'utilisation de souris génétiquement invalidées pour les gènes codant les canaux potassiques de type TASK. L'invalidation des sous-unités constitutives des canaux TASK-1 et TASK-3 bloque la genèse de ce courant pH-sensible au sein des neurones sérotoninergiques du raphé obscurus, empêchant ainsi l'adaptation de leur profil de décharge aux variations du pH (Mulkey *et al.*, 2007b). Les travaux de Mulkey et collaborateurs ont permis de démontrer *in vitro* l'implication des canaux potassiques TASK-1/3 dans la chémosensibilité au CO₂/H⁺ des neurones du raphé obscurus. Cependant, la partie *in vivo* de l'étude sur des animaux mutants invalidés pour les gènes codant TASK-1/3 ne démontre aucune altération du chémoréflexe central au CO₂/H⁺ (Mulkey *et al.*, 2007b), laissant

supposer que ces neurones, bien que chémosensibles au CO₂/H⁺, ne sont pas nécessaires au chémoréflexe central au CO₂/H⁺. Un des modèles actuellement proposé décrit le RO_b comme un acteur secondaire de la réponse hypercapnique (Teran et al., 2014). En effet, les neurones du RO_b seraient capables de détecter des variations de PaCO₂ et pourraient, via des projections vers d'autres groupes de neurones respiratoires, indirectement augmenter la fréquence ventilatoire.

b. Au niveau des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG

Au début des années 1990, la cartographie des structures activées par une exposition hypercapnique chez le rat *in vivo*, grâce la détection de la protéine c-FOS, a identifié des neurones activés situés dans le RTN (Sato *et al.*, 1992, Fortuna et al., 2009, Teppema et al., 1997). En 2004, l'enregistrement des neurones du RTN lors de modifications de la PCO₂ et du pH a montré qu'ils étaient sensibles au CO₂/H⁺ (Figure 23A/B) (Mulkey et al., 2004). Plus récemment, une étude électrophysiologique de patch-clamp a pu être réalisée sur des neurones du RTN en utilisant une lignée transgénique exprimant la protéine GFP (pour Green Fluorescent Protein) au sein des neurones *Phox2b* du RTN. Il a été observé que la quasi-totalité des neurones GFP-positifs possédaient des propriétés chémosensibles caractérisées par une augmentation de leur taux de décharge neuronale suite à une acidification du milieu extracellulaire (Figure 23C/D) (Wang *et al.*, 2013c). Par ailleurs, ces expériences ont permis d'identifier deux types de neurones au sein du RTN. Dans des conditions mimant un état de normocapnie (pH 7,5 et 26 mM [HCO₃⁻]), les neurones de type I présentent un taux de décharge tonique plus faible que les neurones de type II (Figure 23C/D). Suite à l'acidification du milieu de perfusion, bien que ces deux types cellulaires augmentent leur fréquence de décharge, il a pu être mis en évidence que les neurones de type I présentaient une réponse plus importante des neurones de type II. Un autre argument en faveur du fait que les neurones RTN soient des bons candidats pour l'appellation de chémorécepteurs centraux aux CO₂/H⁺ est qu'ils sont connectés anatomiquement avec les structures bulbaires et pontiques responsables de la rythmogénèse et donc capables d'influencer la CCR (Pearce *et al.*, 1989, Smith *et al.*, 1989, Ellenberger & Feldman, 1990, Weston et al., 2004). En effet, la lésion de ce dernier par administration de l'acide kaïnique diminue de façon majeure la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Figure 24) (Nattie & Li, 2012).

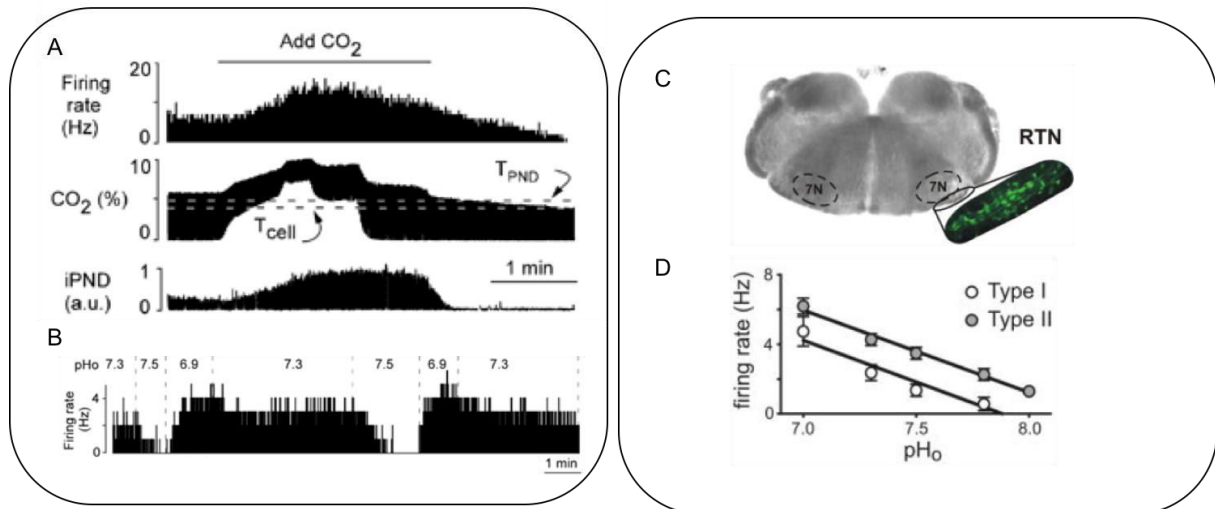


Figure 23 : Les neurones Phox2b-postifs du RTN sont intrinsèquement sensibles au CO₂/H⁺ et stimulent des motoneurones respiratoires

A/B. Les neurones du RTN sont sensibles au CO₂/H⁺. D'après (Mulkey et al., 2004). **A.** Enregistrements *in vivo* des neurones du RTN et du nerf phrénique lors d'une augmentation de PCO₂. L'hypercapnie graduelle a augmenté la fréquence de décharge des neurones du RTN ainsi que celle du nerf phrénique. T_{PND} et T_{cell} représentent respectivement le seuil de CO₂ à partir duquel on peut observer une augmentation de la décharge du nerf phrénique et des neurones du RTN (4,1% vs 5,2% CO₂). **B.** Enregistrement de neurone du RTN sur tranche de bulbe rachidien en patch-clamp, configuration cellule-attachée. Les neurones du RTN répondent aux changements du pH extracellulaire : ils sont activés au repos (pH 7,3), deviennent silencieux ou presque à pH 7,5 et sont fortement activés à pH 6,9. **C/D.** **Caractérisation de neurones chémosensibles du RTN : deux populations de neurones Phox2b-postifs sont sensibles au pH dans le RTN.** D'après (Wang et al., 2013c). **C.** Microphotographie d'une tranche de tronc cérébral de souris transgénique Jx99 Phox2b-GFP avec une image de microscopie agrandie des cellules fluorescentes Phox2b-positives exprimant GFP dans la région RTN montrant la localisation des neurones Phox2b-postifs du RTN. 7N: noyau facial. **D.** Représentation graphique de la fréquence de décharge des deux populations de neurones Phox2b-postifs du RTN en fonction du pH. La sensibilité au pH (pente) était similaire pour les deux types de cellules mais les neurones de type II présentaient des fréquences de décharges plus élevées à tous les niveaux de pH par rapport aux neurones de type I.

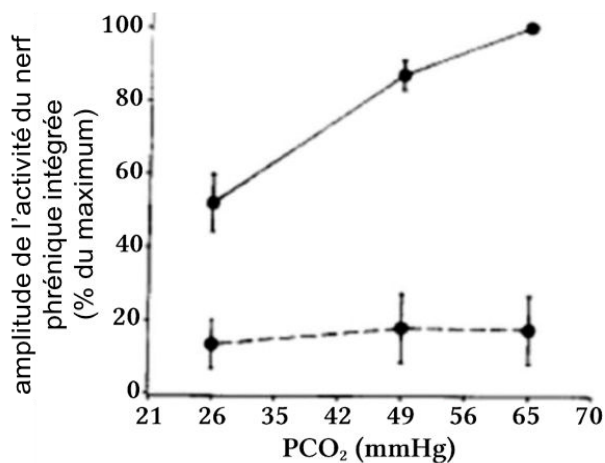


Figure 24 : Réponse de l'activité du nerf phrénique à une augmentation de PCO₂ lors d'une lésion du RTN

Représentation graphique de l'amplitude de l'activité du nerf phrénique intégrée chez le rat anesthésié avant (ligne continue) et après (ligne en pointillés) administration d'acide kaïnique dans le RTN. L'amplitude de l'activité inspiratoire du nerf phrénique s'accroît à mesure que le PCO₂ augmente. En cas de lésion chimique du RTN la réponse du nerf phrénique est quasi-absente. D'après (Nattie & Li, 2012).

Les mécanismes moléculaires sous-tendant les propriétés de chémoréception des neurones du RTN ont aussi été identifiés comme ceux des neurones sérotoninergiques des raphés, du moins partiellement. L'analyse des modèles de mutants invalidés pour les gènes codant TASK-1/3 a permis de mettre en évidence que ces canaux ne sont pas impliqués dans les processus de chémosensibilité des neurones du RTN (Mulkey *et al.*, 2007b, Mulkey *et al.*, 2007a) alors qu'ils sont un des acteurs majeurs de la réponse au sein des neurones 5-HT (Washburn *et al.*, 2002, Teran *et al.*, 2014). Par la suite, les canaux TASK-2 ont été détectés dans les neurones RTN /pFRG, laissant supposer que ces canaux pouvaient être à l'origine de leur sensibilité au pH (Gestreau *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2013b). L'étude de Gestreau et collaborateurs sur des souris invalidées pour le gène codant TASK-2 montre une réponse hypercapnique pour de faibles concentrations de CO₂ (<2%) et qui évolue peu suite à l'accroissement de la concentration en CO₂ (>5%). Par ailleurs, cette réponse reste, pour ces concentrations, très inférieure aux réponses des animaux témoins. Pour Gestreau et collaborateurs les canaux TASK-2 ne semblent pas directement impliqués dans la détection des variations de pH au sein du RTN mais plutôt impliqués dans le maintien d'un état hyperpolarisé pour des faibles taux de CO₂ (Gestreau *et al.*, 2010). L'étude plus récente de Wang et collaborateurs (Wang *et al.*, 2013b) a permis de nuancer ces résultats, par enregistrement électrophysiologique d'une large population de neurones du RTN chez les mutants invalidés pour le gène codant TASK-2. Les auteurs ont pu mettre en évidence une forte hétérogénéité des réponses alcalines observées chez ces mutants. En effet, seule la moitié des neurones enregistrés chez les mutants présentait des réponses similaires - mais amoindries - à celles des animaux-contrôle, leur permettant, suite à l'augmentation du pH extracellulaire, de réduire progressivement le taux de décharge jusqu'à devenir silencieux à pH 7,8. La seconde moitié des neurones du RTN enregistrés chez les mutants ne présentait aucune réponse suite au changement de pH extracellulaire, ils étaient donc pH insensibles. L'étude des transcrits codant pour le canal TASK-2 par des approches de RT-PCR met en évidence une expression quasi-ubiquitaire de ce canal au sein du RTN. Cependant, cette étude démontre une forte hétérogénéité d'expression du canal TASK-2 au sein des neurones du RTN. En effet, il a été observé que seule une fraction de ces neurones exprimait fortement la protéine canal TASK-2. De manière intéressante, une corrélation directe a pu être établie entre le taux d'expression protéique et l'implication du canal dans les mécanismes de sensibilité au pH (Figure 25, page 56) (Wang *et al.*, 2013b, Bayliss *et al.*, 2015). Ce canal est, dans les cellules pour lesquelles il est fortement exprimé, directement responsable de la chémosensibilité intrinsèque.

Cependant ce processus moléculaire n'est pas exclusif et d'autres mécanismes, non encore élucidés, participent à la mise en place de la chémoréception au sein du RTN. Notons que certaines études démontrent qu'une partie des neurones du RTN répondent à des variations de pH en ne modifiant pas leur conductance ionique (Kawai *et al.*, 2006). En effet, le rôle prépondérant dans la chémosensibilité des neurones du RTN d'un récepteur de la famille des récepteurs couplés au protéine G, le récepteur GPR4 (pour guanine nucleotide-binding protein)

a été mis en avant dans une récente étude faisant repenser le mécanisme de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ des neurones du RTN (Figure 25) (Kumar *et al.*, 2015, Guyenet & Bayliss, 2015a). Dans cette étude, les auteurs ont établi que l'inactivation du gène codant GPR4 perturbait l'activation des neurones RTN en réponse à une acidification et diminuait la réponse ventilatoire au CO₂/H⁺. La réintroduction de l'expression de GPR4 permet de restaurer le phénotype ventilatoire. Les auteurs ont également montré qu'en invalidant en plus de GPR4 l'expression de TASK-2, la réponse ventilatoire au CO₂/H⁺ était cette fois-ci abolie. Ils ont avancé alors l'idée selon laquelle le récepteur GPR4 et le canal potassique TASK-2 permettaient à eux deux la chémosensibilité au CO₂/H⁺ des neurones du RTN. Notons bien que, dans un modèle génétique murin de CCHS (*Phox2b*^{27Ala/+}) caractérisé par une chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ réduite, l'ablation sélective des neurones RTN exprimant *Phox2b* s'est accompagnée d'une perte correspondante de l'expression de TASK-2 (Gestreau *et al.*, 2010). Ainsi, ces données fournissent des preuves solides que le canal TASK-2 sensible au pH est exprimé dans le groupe de neurones chémosensibles au CO₂/H⁺ du RTN (Dubreuil *et al.*, 2009, Bayliss *et al.*, 2015). Ces résultats ouvrent de nouvelles portes dans la compréhension des mécanismes moléculaires de chémoréception et donc des pistes thérapeutiques intéressantes.

D'autres théories mettant en jeu un mécanisme paracrine de sensibilité au pH ont émergé. Ces théories sont basées sur le fait qu'une partie des cellules gliales présentes à la surface ventrale du bulbe peuvent être dépolarisées par une acidification (Fukuda & Honda, 1975, Ritucci *et al.*, 1997) et seraient, par la suite, capables d'activer les chémorécepteurs centraux, dont le RTN, via une libération d'ATP (Spyer *et al.*, 2004, Gourine *et al.*, 2005, Gourine, 2005, Huckstepp *et al.*, 2010). Il a été démontré que l'ATP, impliqué dans la neurotransmission et dans la propagation des vagues calciques astrocytaires (Guthrie *et al.*, 1999), peut être libéré *in vivo* à la surface ventrale du tronc cérébral suite à une stimulation hypercapnique (Spyer *et al.*, 2004, Gourine *et al.*, 2005). Cette augmentation d'ATP précédant l'augmentation de la fréquence respiratoire. L'application iontophorétique d'ATP sur une zone médullaire définissant le RTN peut induire artificiellement une augmentation de la fréquence respiratoire (Gourine *et al.*, 2010). En 2010, cette même équipe publia une étude mettant en évidence l'implication du réseau astrocytaire localisé à la surface du RTN dans la réponse hypercapnique (Gourine *et al.*, 2010). Les auteurs démontrent que les astrocytes en contact avec les vaisseaux sanguins pouvaient détecter des variations de pH et que cette chémosensibilité intrinsèque des astrocytes induit une libération d'ATP provoquant une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones du RTN. Cependant les résultats des expériences *in vitro* sont plus nuancés. En effet, les neurones du RTN semblent être peu activés suite à l'application d'agoniste des récepteurs purinergiques P2Y (récepteurs spécifiques des nucléotides extracellulaires) (Mulkey *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que si ce phénomène d'activation par l'ATP existe, il est possible qu'il ne puisse être observé qu'*in vivo* et que d'autres processus biologiques générés au sein des cellules gliales puissent également participer à la genèse de ces réponses chémosensibles (Erlichman *et al.*, 2008, Erlichman *et al.*, 2010).

Longtemps considérés comme assurant une diversité de fonctions importantes, centrées sur le support nutritif et métabolique ainsi que la protection des neurones, on prête maintenant aux astrocytes des fonctions nouvelles impliquées dans les mécanismes de chémosensibilité au CO₂/H⁺ (Gourine et al., 2010, Wenker *et al.*, 2010, Mulkey & Wenker, 2011, Guyenet & Bayliss, 2015b, Eugenin Leon *et al.*, 2016).

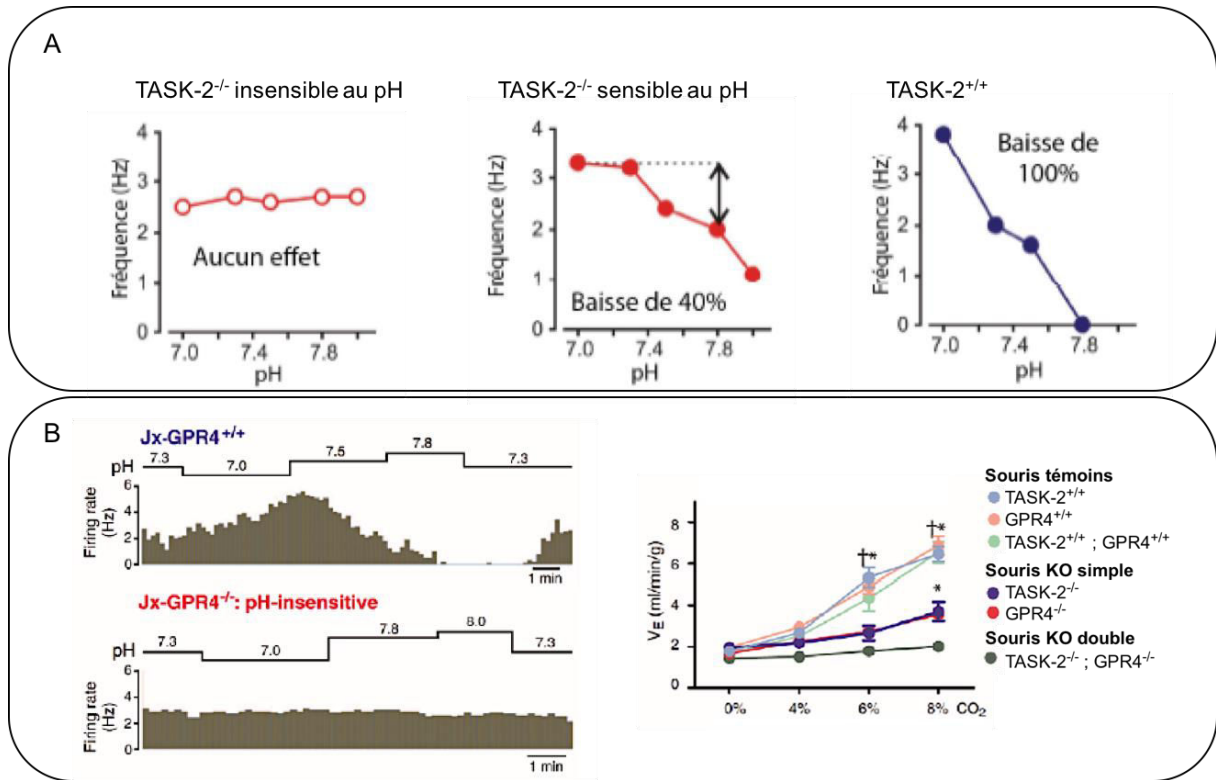


Figure 25 : Implication des canaux TASK-2 et de GPR4 dans le mécanisme de chémosensibilité intrinsèque aux H⁺ des neurones du RTN.

A. Graphiques présentant l'évolution de la fréquence de décharge des neurones du RTN lors de changements de pH extracellulaire. L'activité spontanée des neurones est enregistrée par la technique de patch clamp en configuration « cellule attachée ». Chez les animaux témoins (TASK-2^{+/+}) le passage d'un pH 7,0 à un pH 7,8 aboutit à la mise sous silence de l'activité spontanée du neurone (points bleus). Chez les mutants TASK-2^{-/-} l'étude des fréquences de décharge des neurones du RTN révèle la présence de deux populations au sein du RTN. Une première population composée de neurones pH sensibles mais pour laquelle la variation de la fréquence de décharge est atténuée par rapport au témoin (baisse de 40% de la fréquence suite au passage de pH 7,0 à 7,8 ; points rouges pleins). Une seconde population pH insensible pour laquelle la fréquence de décharge n'est pas modulée par le pH (points rouges vides). D'après (Wang et al., 2013b). **B.** A gauche, tracés obtenus à partir des enregistrements en patch clamp montrant la fréquence de décharge en fonction du pH de neurones du RTN de souris GPR4^{-/-} et de souris témoins GPR4^{+/+}. A droite, graphique illustrant la ventilation minute enregistrée en pléthysmographie en réponse à des stimuli hypercapniques des souris KO simple GPR4^{-/-} et TASK-2^{-/-} et leurs témoins respectifs GPR4^{+/+} et TASK-2^{+/+} ainsi que des souris KO double GPR4^{-/-}; TASK-2^{-/-} et les témoins GPR4^{+/+}; TASK-2^{+/+}. † 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. D'après (Kumar et al., 2015).

c. Au niveau des neurones noradrénergiques du LC

Si la majorité des structures chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺ est dans le bulbe rachidien, il a été mis en évidence une troisième structure localisée au niveau dorso-latéral du pont, le locus coeruleus. Cette structure contient une forte population de neurones noradrénergiques (Rasmussen *et al.*, 1986) qui ont été proposés comme étant des chémorécepteurs centraux aux CO₂/H⁺ (Figure 26, page 59) (Elam *et al.*, 1981, Haxhiu *et al.*, 1996, Oyamada *et al.*, 1998, Oyamada *et al.*, 1999, Stunden *et al.*, 2001, de Carvalho *et al.*, 2010, Gargaglioni *et al.*, 2010). En effet, des enregistrements de l'activité unitaire des neurones du LC chez le rat avant et après chémodénervation ont révélé que leur fréquence de décharge était d'autant plus augmentée que le stimulus hypercapnique était important et ceci indépendamment de l'influence des afférences périphériques (Elam *et al.*, 1981). D'autres auteurs d'une étude électrophysiologique sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé chez le rat nouveau-né ont réalisé des enregistrements conjoints de l'activité des neurones du LC et de la racine cervicale ventrale C4. Ils concluent que les neurones du LC sont chémosensibles aux variations de CO₂/H⁺ et qu'ils sont en mesure de moduler l'activité de la CCR (Oyamada *et al.*, 1998). 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). Par la suite, des propriétés intrinsèques de chémosensibilité au CO₂/H⁺ ont été démontrées sur des tranches de bulbe rachidien (Stunden *et al.*, 2001, Nichols *et al.*, 2008, Erlichman *et al.*, 2009, Guyenet *et al.*, 2010a). De plus, il a été mis en évidence que l'hypercapnie entraînait l'augmentation de la fréquence de décharge de 80% des neurones du LC (Pineda & Aghajanian, 1997, Oyamada *et al.*, 1998, Filosa *et al.*, 2002). 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 CO₂/H⁺ (Johnson *et al.*, 2008). *In vivo* toujours, la lésion des neurones catécholaminergiques et plus particulièrement noradrénergiques du LC diminue significativement la réponse ventilatoire au CO₂ (Li & Nattie, 2006, Biancardi *et al.*, 2008). L'ensemble de ces études démontre que les neurones noradrénergiques du LC répondent bien à l'appellation stricte de chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺. De la même manière que le RTN, le LC pourrait être impliqué dans le CCHS qui se caractérise par une absence ou une réduction importante de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ (Nobuta *et al.*, 2015). En effet, une récente étude a montré sur des encéphales issus de patients que ces derniers présentaient une anomalie structurelle au niveau du LC (Nobuta *et al.*, 2015). D'autre part, des modèles murins mutants pour le gène *Phox2b* apportent des arguments en faveur d'une implication de ces neurones dans la physiopathologie du CCHS (Nobuta *et al.*, 2015). Ces résultats ouvrent de nouvelles portes dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ et donc de pistes thérapeutiques intéressantes.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant les propriétés de chémoréception des neurones noradrénergiques du LC ont aussi été identifiés partiellement. Comme les neurones

du RTN et des raphés lors d'une hypercapnie, l'activité des neurones du LC est régulée en partie par un courant membranaire potassique sensible au CO₂/H⁺ (Pineda & Aghajanian, 1997). Diverses études suggèrent que de nombreux canaux différents sont impliqués dans l'augmentation du taux de décharge des neurones du LC aux stimuli CO₂/H⁺ (Filosa & Putnam, 2003, Li & Putnam, 2013, Putnam, 2010). Les résultats suggèrent que la réponse chémosensible dans les neurones du LC implique des canaux Ca²⁺ de type L et des canaux K⁺ sensibles à l'ion tétraéthylammonium (TEA) et au 4-aminopyridine (4-AP) responsables d'un courant K⁺ sortant. L'acidose hypercapnique a inhibé les deux courants K⁺ alors que les canaux Ca²⁺ de type L sont activés par une augmentation de CO₂/H⁺ dans les neurones LC (Filosa & Putnam, 2003). En effet, lorsque les neurones du LC ont été exposés à une acidification du pH, le courant sensible à la 4-AP a été inhibé (Li & Putnam, 2013). Le changement du courant sensible à la 4-AP par différents niveaux de CO₂ a été corrélé avec la variation du taux de décharge induite par le CO₂, impliquant le courant 4-AP sensible dans la signalisation chémosensible des neurones du LC (Li & Putnam, 2013). Il a aussi été montré que les neurones du LC possèdent des canaux Kir (pour Inwardly Rectifying K⁺ current) responsables d'un courant potassique rectifiant entrant (Pineda & Aghajanian, 1997). Ces canaux sont inhibés par une diminution de pH. De plus, les canaux TASK sensibles au pH sont fortement exprimés dans les neurones du LC et peuvent également jouer un rôle dans la signalisation chémosensible (Bayliss et al., 2001). Enfin, l'étude de Cui et collaborateurs suggère l'ouverture de canaux cationiques Na⁺ ou non sélectifs au lieu de la fermeture des canaux K⁺ (Cui *et al.*, 2011). Les canaux TRP (pour Transient Receptor Potential) représentant une grande famille de canaux perméables aux cations semblaient être de bons candidats. En effet, des niveaux élevés d'expression de l'ARNm de TRPC5, TRPM2 et TRPM7 ont été trouvés dans le LC. Parmi eux, le transcrite TRPC5 était le plus abondant. L'analyse par PCR monocellulaire a indiqué que les ARNm de TRPC5 existaient dans les neurones du LC. Ce canal TRPC5 a été activé par une acidification extracellulaire lorsqu'il a été exprimé dans des cellules de rein embryonnaire humain. Les courants TRPC5 ont commencé à être activés à pH 7,4. L'effet stimulant de l'hypercapnie sur les neurones du LC a été éliminé par un inhibiteur sélectif (SKF-96365) du TRPC. Ces résultats suggèrent fortement que les canaux TRP sont susceptibles de jouer un rôle dans la chémosensibilité au CO₂/H⁺ des neurones du LC, en particulier TRPC5 (Cui et al., 2011). Ainsi, il semble probable que la réponse au CO₂/H⁺ dans les neurones du LC implique de multiples canaux ioniques, peut-être jusqu'à six types différents.

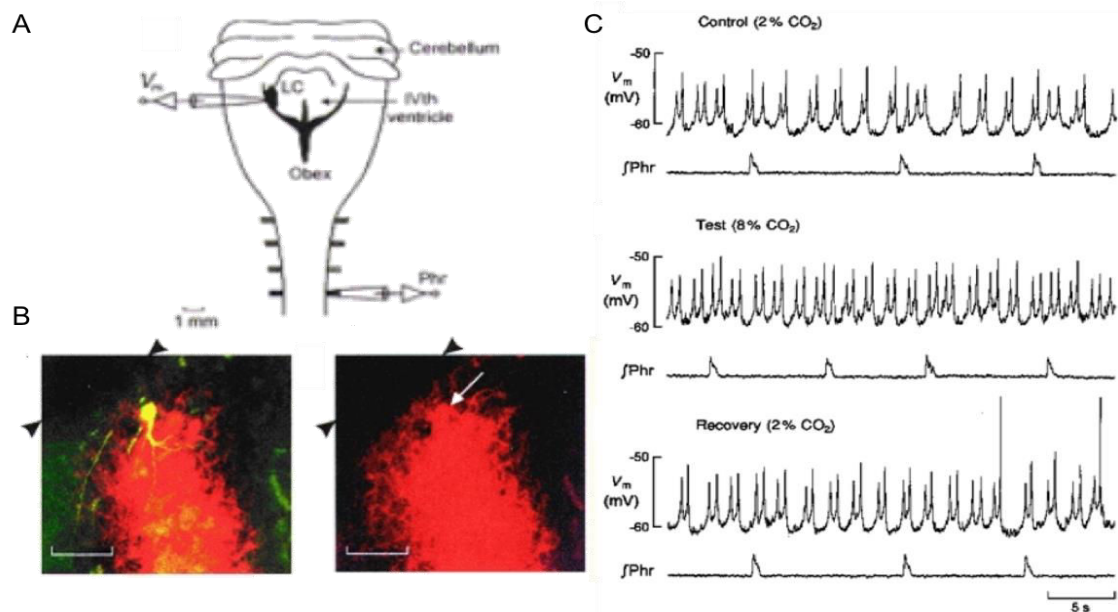


Figure 26 : Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus sont intrinsèquement sensibles au CO₂ et stimulent des motoneurones respiratoires

A. Représentation schématique d'une vue dorsale d'une préparation de bulbe rachidien-pont-cervelet-moelle épinière isolée de rat nouveau-né montrant la localisation des neurones du locus coeruleus (LC) et l'emplacement des microélectrodes d'enregistrement des neurones du LC et de la racine cervicale ventrale C4. **B.** Microphotographies d'une section de pont au niveau du LC de la préparation de bulbe rachidien-pont-cervelet-moelle épinière isolée pour montrer le caractère TH positif d'un neurone du LC enregistré. Un neurone du LC a été marqué par injection intracellulaire (flèche blanche) de colorant (Lucifer yellow, jaune) et d'un anticorps dirigé contre TH (Cy3, rouge) à l'aide d'une microélectrode d'enregistrement. A gauche, la microphotographie montre le neurone enregistré (jaune). A droite, la microphotographie montre le marquage TH-positif (rouge) au sein du neurone du LC enregistré (flèche blanche). Le plancher du quatrième ventricule est indiqué par des pointes de flèche noires. La barre horizontale indique 100 μ m. **C.** Tracés du potentiel de membrane d'un neurone du locus coeruleus TH-positif et du signal intégré de l'activité du nerf phrénique en réponse à une augmentation de CO₂. La fréquence de décharge du neurone du locus coeruleus TH-positif augmente ainsi que celle du nerf phrénique en réponse à l'augmentation de CO₂. D'après (Oyamada et al., 1998)

Malgré la forte corrélation entre l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones du LC et la diminution du pH, l'augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones semble saturer, atteignant un maximum lors d'une stimulation par des solutions équilibrées à 15% de CO₂ (Ritucci *et al.*, 2005a), et cela malgré le fait que le pH continue de devenir plus acide lorsque les solutions sont équilibrées avec plus de 15% de CO₂ (Dean *et al.*, 2001). Cette saturation de l'effet du CO₂ est également observée avec l'augmentation de l'activité du nerf phrénique en réponse à l'augmentation du CO₂ inspiré (Coates et al., 1993). Effectivement, nous pouvions nous attendre à ce que les chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺ saturent à de tels niveaux pathologiquement élevés de CO₂ et donc à des niveaux bas de pH reste peu abordée. Le même résultat a été rapporté pour les neurones RTN (Ritucci

et al., 2005b). Ce phénomène de saturation pourrait provenir soit d'une diminution de la capacité du pH acide à inhiber davantage les canaux K⁺, soit d'une activation de certains processus par une acidité croissante qui limiterait davantage les augmentations du taux de décharge des neurones. Un tel processus pourrait s'expliquer par l'activation des canaux Ca²⁺ de type L lors d'une augmentation de CO₂/H⁺ dans les neurones LC. Cela pourrait entraîner une accumulation suffisante de Ca²⁺ intracellulaire pour activer un canal potassique activé par le calcium (KCa), ce qui limiterait la dépolarisation membranaire et l'augmentation du taux de décharge des neurones du LC (Putnam, 2010). Le mécanisme de saturation à des stimuli CO₂/H⁺ croissants diminuant le taux de décharge neuronale ou la réponse ventilatoire est un processus important à élucider.

Un modèle computationnel reproduisant la plupart des propriétés connues de la membrane qui caractérisent les neurones sensibles au CO₂/H⁺ du LC a été généré pour explorer le schéma de décharge de ces neurones en réponse à la stimulation chimique (CO₂/H⁺) et électrique (synaptique) (Quintero *et al.*, 2017). Deux résultats intéressants du modèle se dégagent. Premièrement, l'augmentation de la réponse au stimulus exciteur semble se saturer à des niveaux croissants de CO₂/H⁺. Ceci est en accord avec les observations précédentes du LC où un effet de saturation semble gouverner le comportement chémosensible des neurones du LC (Putnam, 2010). Deuxièmement, une chémosensibilité plus élevée est obtenue avec ce modèle lorsque le stimulus chimique implique une diminution du pH intracellulaire et extracellulaire, mais pas une augmentation du taux de CO₂ seul. Ce modèle pourrait avoir un fort potentiel en tant qu'outil pour étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents à la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ altérée, présente dans une variété de troubles tels que le CHS.

Le mécanisme général d'activation des structures chémosensibles au CO₂/H⁺ est probablement majoritairement TASK-dépendant même si l'implication d'autres canaux potassiques semble envisageable (Putnam, 2010) et s'il existe d'autres mécanismes chémosensibles complémentaires comme par exemple GPR4 au sein du RTN. Ainsi, le blocage du courant potassique sortant par une élévation du CO₂/H⁺ conduit à une dépolarisation des cellules chémoréceptrices et entraîne la libération de divers neurotransmetteurs. Cela engendre une stimulation ou une inhibition des centres respiratoires responsables d'un ajustement de la ventilation via une régulation de la f_R et du V_T permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Il est important de noter que le mécanisme de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ semble être hétéroclite selon les populations neuronales impliquées. Cela pourrait s'expliquer par une mise en jeu d'acteurs différents et/ou des interactions distinctes entre les différents acteurs. Malgré les progrès, un certain nombre de questions-clés restent à étudier dans le domaine de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺. Une étude détaillée de la signalisation chémosensible au CO₂/H⁺ doit être faite rigoureusement dans les neurones de plus de régions cérébrales afin d'offrir de nouvelles cibles pour les thérapies visant à modifier la force de la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺.

Chapitre 3: Les syndromes d'hypoventilation centrale, défaillance de la commande centrale respiratoire

I. Généralités sur les syndromes d'hypoventilation centrale (CHS)

La commande centrale respiratoire est affectée dans de nombreuses pathologies comme les syndromes d'hypoventilation centrale qui sont marqués par une hypoventilation alvéolaire, non expliquée par des anomalies des muscles respiratoires, de la mécanique thoraco-pulmonaire et des échanges gazeux intra-pulmonaires (Gozal, 1998).

1. Définition

On regroupe sous le terme de syndromes d'hypoventilation centrale (CHS pour Central Hypoventilation Syndrome) des pathologies neuro-respiratoires, acquises ou congénitales, associées à une dérégulation du fonctionnement du système nerveux végétatif. 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, Cielo & Marcus, 2014). L'hypoventilation alvéolaire est présente au cours du sommeil, en raison de la suppression des stimuli de l'éveil sur les centres respiratoires, ou dans des cas plus sévères aussi pendant l'éveil (Cielo & Marcus, 2014, Muzumdar & Arens, 2008).

Les CHS regroupent différentes pathologies comme le **syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale** (CCHS pour Congenital Central Hypoventilation Syndrome ou syndrome d'Ondine), le **syndrome d'hypoventilation alvéolaire associé à l'obésité** (OHS pour Obesity Hypoventilation Syndrome), le syndrome d'hypoventilation tardive (LO-CCHS pour Late Onset Central Hypoventilation Syndrome), ou le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce (ou ROHHAD pour Rapid Onset with Hypothalamic dysfunction, Hypoventilation and Autonomic Dysregulation).

Après avoir évoqué la physiopathologie générale des CHS et les traitements qui sont aujourd'hui proposés, nous nous attarderons particulièrement sur deux CHS, l'OHS et le CCHS.

2. Physiopathologie

Le terme hypoventilation, du grec ancien « hypo » qui signifie « en dessous », désigne une diminution de la ventilation, ce qui entraîne une diminution de la PaO₂ et de la PaCO₂ par rapport aux pressions partielles physiologiques se traduisant respectivement par une hypoxémie et une hypercapnie.

Les patients souffrant de CHS ne réagissent pas ou alors de manière insuffisante aux modifications de la PaO₂ et de la PaCO₂ par défaillance des systèmes de régulation de la CCR. Les dysfonctionnements peuvent intervenir à différents niveaux de la boucle de régulation de la CCR i.e. détection, transmission ou réception de l'information. En effet, soit la détection des stimuli chimiques (hypercapnie et hypoxémie) est altérée ou absente à cause d'une défaillance intrinsèque des chémorécepteurs, par conséquent les messages sensoriels sont mal ou non transmis aux centres respiratoires ; soit les messages sont bien transmis par les chémorécepteurs qui détectent correctement les stimuli chimiques mais ils ne sont pas correctement reçus par les centres respiratoires. *In fine*, ces derniers ne peuvent transmettre les messages destinés à amorcer la contraction des muscles respiratoires et donc la ventilation (Gozal, 1998, Muzumdar & Arens, 2008, Carroll *et al.*, 2010, Cielo & Marcus, 2014). Par conséquent, la CCR n'est pas adaptée à l'augmentation de besoins métaboliques. Les sujets touchés par cette maladie n'ont pas conscience qu'ils ne respirent pas suffisamment car ils sont dépourvus des signaux d'alerte que les sensations respiratoires et la dyspnée fournissent habituellement (Gozal, 1998, Muzumdar & Arens, 2008, Cielo & Marcus, 2014). À l'éveil, les influences corticales et supra-bulbaires qui s'exercent sur la ventilation permettent en général le maintien d'une activité ventilatoire spontanée. Elle peut être suffisante à maintenir la normocapnie chez la plupart des patients, mais une hypoventilation diurne peut survenir dans de rares cas (Muzumdar & Arens, 2008, Cielo & Marcus, 2014).

3. Prise en charge thérapeutique

Les traitements mis en place sont symptomatiques, leur objectif est de rétablir une ventilation adéquate permettant une dioxygénation et un rejet du CO₂ efficaces. Celui qui donne le plus de « satisfaction » actuellement reste la ventilation mécanique dont les modalités précises vont être détaillées (Weese-Mayer *et al.*, 1992b, Weese-Mayer *et al.*, 2010, Cielo & Marcus, 2014). D'autres thérapeutiques, adjuvantes uniquement puisque la ventilation mécanique reste obligatoire, ont été proposées avec plus ou moins de succès comme des moyens médicamenteux et l'utilisation de la stimulation diaphragmatique (Weese-Mayer *et al.*, 1992b, Weese-Mayer *et al.*, 1992a, Weese-Mayer *et al.*, 2010).

a. Ventilation mécanique

La ventilation mécanique (VM) est un terme pour la ventilation artificielle, en opposition à la ventilation spontanée, qui consiste à suppléer ou assister la respiration spontanée à l'aide d'une machine appelée ventilateur. La VM est qualifiée d'invasive si elle se fait par une interface pénétrant dans les voies aériennes par la bouche ou le nez (sonde d'intubation endotrachéale) ou par la peau (tube de trachéotomie). Par opposition, la ventilation non invasive (VNI) implique quant à elle un masque étanche (facial ou nasal). Il existe deux modes ventilatoires : les ventilateurs peuvent être en pression positive ou en pression négative.

- La ventilation en pression positive

Lors de la ventilation spontanée, la pression intra-pulmonaire est successivement négative lors de l'inspiration, puis positive lors de l'expiration, alors qu'en ventilation en pression positive, cette pression reste indifféremment positive que l'on soit en phase inspiratoire ou expiratoire, l'air est « poussé » dans les voies aériennes, c'est le principe du « soufflet ». La ventilation non invasive est privilégiée (Ferrer & Torres, 2015) par rapport à la ventilation invasive dans ce mode ventilatoire en pression positive. Elle délivre un traitement efficace avec un risque d'infection moindre et permet ainsi d'améliorer la survie des patients (Robert & Argaud, 2007). Un traitement VNI efficace peut aider les patients à augmenter l'utilisation de la capacité pulmonaire. Cela permet de réduire l'effort respiratoire (Organized jointly by the American Thoracic Society *et al.*, 2001) et rend les activités courantes plus faciles.

- **La ventilation en pression négative**

Dans ce mode d'application de la pression, la ventilation qui existe est exclusivement sous forme non invasive. Une coquille en forme de dôme s'adapte à la cage thoracique et à l'abdomen du patient formant un compartiment scellé et étanche autour du thorax. Un ventilateur augmente et diminue de façon périodique la pression à l'intérieur de la chambre. Quand la pression appliquée autour de la cage thoracique descend en dessous de celle des poumons, l'air extérieur est « aspiré » par les VAS pour remplir les poumons ; quand elle remonte au-dessus de celle des poumons, l'inverse se produit et l'air est expulsé des poumons. Aujourd'hui la ventilation en pression négative n'est presque plus utilisée depuis que la ventilation à pression positive est disponible (Cielo & Marcus, 2014). Son utilisation a été limitée par le risque d'asynchronisme entre l'ouverture des VAS et les efforts inspiratoires thoraciques provoquant des apnées (Levy *et al.*, 1992). C'est aussi un soin contraignant car il ne peut pas être utilisé lorsque le patient présente des hypoventilations à l'éveil puisqu'il doit obligatoirement rester en position couchée pour son utilisation (Hartmann *et al.*, 1994).

b. Stimulation diaphragmatique

La stimulation phrénique vise à rétablir une contraction diaphragmatique qui initiera la ventilation. Ces stimulateurs diurnes sont utilisés chez les patients ventilo-dépendants 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.

Cette technique se base sur la stimulation électrique du nerf phrénique au moyen d'électrodes implantées chirurgicalement au niveau du nerf par thoracotomie. Ces électrodes sont connectées à des antennes réceptrices sous-cutanées qui reçoivent d'un boîtier de stimulation radio-électrique des signaux radioélectriques par l'intermédiaire d'antennes émettrices placées sur la peau en regard des antennes réceptrices. Les électrodes convertissent ensuite ces signaux en impulsions électriques qu'elles délivrent au nerf phrénique (Similowski *et al.*, 1989, Weese-Mayer *et al.*, 1992a). Cette technique permet au patient de se libérer d'un ventilateur mécanique durant la journée et donc d'améliorer la qualité de vie (Healy & Marcus,

2011, Cielo & Marcus, 2014). Les principaux inconvénients de cette technique comprennent le coût, l'inconfort associé à l'implantation chirurgicale et le risque potentiel de répétition d'actes chirurgicaux suite à un dysfonctionnement du stimulateur.

c. Traitements médicamenteux

Source de formidables espoirs il y a une vingtaine d'années, ils sont aujourd'hui presque complètement abandonnés du fait de l'absence d'efficacité ou bien d'effets secondaires trop indésirables. De nombreuses substances ont été essayées dans le but de stimuler la ventilation, le plus souvent sans aucun effet, rarement avec une efficacité médiocre ou irrégulière (Haddad *et al.*, 1978, Skatrud *et al.*, 1978b, Hunt *et al.*, 1979, Lugliani *et al.*, 1979, Wells *et al.*, 1980, Naeije *et al.*, 1982, Newth *et al.*, 1983, Shannon *et al.*, 1983, Milerad *et al.*, 1985, Weesner & Boyle, 1985, Oren *et al.*, 1986, Weese-Mayer *et al.*, 1992b, Weese-Mayer *et al.*, 2010).

Nous détaillerons dans les paragraphes qui vont suivre le CCHS et le OHS d'un point de vue des caractéristiques ventilatoires puisqu'ils sont à l'origine de l'attention que nous portons à deux de nos molécules d'intérêt, l'étonogestrel et la leptine, en tant qu'éventuelles pistes thérapeutiques.

II. Le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (OHS)

En 1837, Charles Dickens publie une série d'histoires se déroulant au Pickwick Club, dans un roman appelé *The Posthumous Papers of the Pickwick Club*. Un des personnages de ce livre, prénommé "Fat Joe", est domestique à l'Auberge de la Croix d'Or de Rochester. Dickens le décrit comme une curiosité de la nature, un jeune garçon étonnamment gras, rougeaud, goinfre, mais surtout atteint d'une somnolence invincible, incontrôlable : à tout moment, même en parlant, il s'assoupit et se met à ronfler doucement, le menton sur la poitrine.

"...a most violent and startling knocking was heard at the door; it was not an ordinary double-knock, but a constant and uninterrupted succession of the loudest single raps, as if the knocker were endowed with the perpetual motion, or the person outside had forgotten to leave off.

The object that presented itself to the eyes of the astonished clerk, was a boy – a wonderfully fat boy – habited as a serving lad, standing upright on the mat, with his eyes closed as if in sleep. He had never seen such a fat boy, in or out of a travelling caravan; and this, coupled with the calmness and repose of his appearance, so very different from what was reasonably to have been expected of the inflicter of such knocks, smote him with wonder.

"What's the matter?" inquired the clerk.

The extraordinary boy replied not a word; but he nodded once, and seemed, to the clerk's imagination, to snore feebly.

“Where do you come from?” inquired the clerk.

The boy made no sign. He breathed heavily, but in all other respects was motionless....”

Charles Dickens, *The Posthumous Papers of the Pickwick Club*, 1837

1. Définition

Une pathologie du contrôle ventilatoire peut également rendre compte de l'hypoventilation alvéolaire de certains sujets obèses, le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (OHS).

Le OHS a été décrit pour la première fois il y a plus de soixante ans sous une appellation différente, le syndrome de Pickwick, par Burwell et collaborateurs (Burwell *et al.*, 1994, BICKELMANN *et al.*, 1956). Ils ont décrit un syndrome associant une obésité importante, une insuffisance respiratoire chronique, une hypersomnolence, une érythrocytose secondaire et une hypertension pulmonaire. Ils ont proposé de l'appeler syndrome de Pickwick en référence au tableau, brossé par Charles Dickens, du « fat boy » dans sa première nouvelle *The Posthumous Papers of the Pickwick club*, étrangement similaire au tableau clinique de leurs patients. Aujourd'hui, le terme de syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité s'est progressivement substitué à celui du syndrome de Pickwick. On définit le OHS comme la présence d'une hypoventilation alvéolaire diurne caractérisée par une PaCO₂ diurne > 45 mmHg et une PaO₂ < 70mmHg chez un patient obèse dont l'IMC > 30kg/m², indépendamment ou non d'un syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), alors qu'il n'existe pas d'affection respiratoire susceptible d'expliquer les anomalies gazométriques (Mokhlesi, 2010). Les patients OHS présentent dans la plupart des cas des pathologies associées, favorisées par l'obésité i.e. l'hypertension artérielle, les cardiopathies, le diabète de type 2, les apnées obstructives du sommeil (Mokhlesi, 2010).

2. Sévérité

La sévérité de la maladie et son évolution dépendent des comorbidités, principalement de la sévérité de l'insuffisance respiratoire (Mokhlesi, 2010, Balachandran *et al.*, 2014).

3. Épidémiologie

A ma connaissance, il n'y a pas d'étude clinique épidémiologique portant sur la prévalence du OHS dans la population générale. La prévalence du OHS augmente avec la sévérité de l'obésité (30% avec IMC>35kg/m² versus 49% IMC>50 kg/m²) (Nowbar *et al.*, 2004). La prévalence de l'obésité sévère l'IMC> 40kg/m² est assez bien établie. Aux Etats-Unis, elle est passée en plus d'une vingtaine d'années au sein de la population adulte de 5/1000

à 25/1000 (Mokhlesi, 2010) et on admet que le OHS touche environ 10% des obèses sévères. L'augmentation des cas de OHS observée récemment est la conséquence de cet accroissement de la prévalence de l'obésité sévère (Mokhlesi *et al.*, 2007, Mokhlesi & Tulaimat, 2007, Balachandran *et al.*, 2014). En 2014, la même équipe estimait approximativement la prévalence globale du OHS à 0,6% dans la population générale adulte avec un ratio homme/femme de 2:1 (Balachandran *et al.*, 2014).

4. Étiologie

Les mécanismes d'apparition de l'hypoventilation alvéolaire chez certains obèses ne sont pas totalement compris et seraient probablement multifactoriels. Pour un même degré d'obésité, l'hypoventilation alvéolaire n'est pas constamment observée chez tous les sujets. La plupart des obèses n'ayant pas d'hypoxémie-hypercapnie (Mokhlesi, 2010), pourquoi certains d'entre eux développent-ils une hypoventilation alvéolaire ? Les mécanismes d'apparition de l'hypoventilation alvéolaire chez certains obèses ne sont pas totalement compris et seraient probablement multifactoriels. Trois mécanismes physiopathologiques non exclusifs expliquant l'hypercapnie dans le OHS ont été proposés i.e. les contraintes mécaniques de l'obésité sur le système respiratoire responsables d'un coût excessif du travail respiratoire, la répétition d'apnées obstructives au cours du sommeil et un dysfonctionnement des centres respiratoires pouvant notamment impliquer notamment le système leptinergique (Piper & Grunstein, 2010, Piper & Grunstein, 2011).

a. Obésité et coût excessif du travail des muscles respiratoires

L'obésité, en particulier quand elle est sévère, est associée à des changements de la mécanique pulmonaire et des performances des muscles respiratoires (Rochester & Enson, 1974). En effet, une diminution de la compliance thoraco-pulmonaire est constatée chez 60% des obèses OHS contre 20% chez des obèses non OHS à IMC égal (Naimark & Cherniack, 1960). Cette chute de la compliance du système respiratoire explique le travail anormalement élevé des muscles respiratoires chez les obèses OHS qui sont donc hypercapniques comparativement aux obèses non OHS qui sont eux, normocapniques (Kaufman *et al.*, 1959, Cherniack, 1958).

b. Apnées obstructives du sommeil

Un syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est observé chez 90% des patients OHS, occasionnant des épisodes d'hypercapnie et d'hypoxémie répétés et pouvant favoriser l'installation d'une hypoventilation diurne (Lopata & Onal, 1982). De plus, les épisodes répétés d'hypoxie-réoxygénation générés par les apnées nocturnes constituent un stress d'hypoxie intermittente chronique (HIC) et sont donc particulièrement délétères, du fait du stress oxydant, à l'origine d'une synthèse accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'inflammation de bas grade qu'ils génèrent. Or, le stress oxydatif et l'inflammation sont des

médiateurs reconnus des perturbations respiratoires suite à une hypoxie intermittente mimant les apnées du sommeil chez le rongeur en altérant la chémoréception périphérique (Iturriaga *et al.*, 2015, Snyder *et al.*, 2017). Ces éléments pris ensemble amènent à penser qu'indirectement, la présence des apnées obstructives est un élément déterminant pouvant expliquer l'installation d'une hypoventilation alvéolaire chez certains sujets obèses. En outre, plusieurs éléments convergents de la littérature évoquent un rôle de l'HIC dans l'initiation de la plasticité respiratoire entraînant des modifications du réseau neuronal respiratoire (Mateika & Narwani, 2009, Mateika & Komnenov, 2017). Cette plasticité semble avoir deux effets contradictoires, à la fois bénéfiques et néfastes. Cette contradiction pourrait être liée à la gravité et à la durée de l'exposition à HIC, c'est-à-dire que des formes légères d'HIC déclenchent des effets bénéfiques alors que des formes sévères d'HIC sont associées à des conséquences néfastes.

A l'inverse, plusieurs études montrent que les patients OHS présentant un SAOS ne diffèrent pas des patients obèses non OHS présentant un SAOS par un indice d'apnées-hypopnées plus élevé (Leech *et al.*, 1987, Bradley *et al.*, 1986), ce qui pourrait laisser penser que la présence des apnées obstructives n'est pas un élément déterminant pouvant expliquer l'installation d'une hypoventilation alvéolaire chez certains sujets obèses. De plus, dans le cas de l'hypothèse de phénomène de plasticité induite par HIC via des phénomènes de facilitation à long terme et d'augmentation progressive de la puissance motrice respiratoire, les apnées pourraient s'avérer efficaces contre l'hypoventilation (Mateika & Narwani, 2009, Mateika & Komnenov, 2017).

La présence chez les patients OHS d'un SAOS comme facteur déterminant ou non expliquant l'hypoventilation diurne observée est à ce jour encore controversée. Il est important de rappeler que certains patients OHS ne présentent pas de SAOS et que donc, dans ce cas, cette cause est exclue.

c. Défaillance de la commande centrale respiratoire et implication de la leptine

Le rôle d'une dysfonction de la CCR comme cause de l'hypoventilation alvéolaire de certains obèses OHS est une éventualité qui nous intéresse tout particulièrement bien que controversée. Une des conséquences du dysfonctionnement du réseau respiratoire pourrait en effet se traduire par une réduction de la réponse au CO₂. En effet, au cours du OHS, il existe une altération de la réponse ventilatoire au CO₂ (Jokic *et al.*, 2000). La question est de savoir si cette altération de la réponse au CO₂ est un phénomène constitutionnel chez ces patients avant l'installation de l'hypoventilation alvéolaire au long cours ou s'il s'agit d'une conséquence en particulier de l'hypoventilation alvéolaire nocturne. En effet, une fois l'hypercapnie chronique installée, un cercle vicieux s'installe avec une diminution chronique de la réponse des chémorécepteurs centraux qui aggrave encore l'hypoventilation alvéolaire nocturne et, par voie de conséquence, l'hypoventilation alvéolaire diurne (Pepin *et al.*, 2005). Le fait d'être en hypercapnie chronique entraîne une diminution de la sensibilité au CO₂ et donc une diminution

de la réponse au CO₂ (Gilbert *et al.*, 1961, Rochester & Enson, 1974, Zwillich *et al.*, 1975, Olson & Zwillich, 2005, Weitzenblum *et al.*, 2008).

Les patients OHS peuvent, en hyperventilant volontairement, devenir eucapniques (Leech *et al.*, 1991). Il s'agit probablement de la preuve la plus simple d'une commande respiratoire centrale défectueuse. De plus, certaines équipes ont cherché à identifier des défaillances dans les réponses à des mesures d'évaluation de l'adaptation du contrôle ventilatoire. Pour évaluer la CCR il faudrait idéalement enregistrer l'activité des nerfs destinés aux muscles respiratoires car une maladie neuro-musculaire pourrait rendre inefficace l'expression d'une commande normale. Mais cette méthode est inutilisable en pratique clinique chez l'Homme. Chez l'Homme, la mesure de la réponse ventilatoire au CO₂ de la pression d'occlusion (P_{0,1}) et celle de l'électro-myogramme (EMG) des muscles respiratoires sont des méthodes qui peuvent permettre d'appréhender la commande ventilatoire (Straus, 2005) et constituent des indicateurs de sa fonctionnalité. La mesure de la P_{0,1} repose sur la mesure de la pression négative produite par la contraction des muscles inspiratoires contre des voies aériennes occluses. Pour mesurer la pression d'occlusion, le sujet respire à travers une valve unidirectionnelle. La voie inspiratoire est occluse à l'insu du sujet pendant l'expiration. L'inspiration suivante s'effectue donc contre une résistance. Un sujet éveillé ne détecte l'occlusion de la voie inspiratoire qu'environ 200 millisecondes après le début de l'effort. La pression mesurée à 100 millisecondes reflète donc la commande respiratoire inconsciente (Derenne *et al.*, 1976, Murciano *et al.*, 1988, Whitelaw & Derenne, 1993, Perrigault *et al.*, 1999, Straus, 2005). Lors de l'évaluation de la réponse à l'hypercapnie, le sujet ventile dans un sac un mélange hypercapnique et hyperoxique. Au fur et à mesure de la ventilation dans ce sac, la concentration en CO₂ augmente. Deux paramètres sont étudiés, à savoir le niveau de PaCO₂ à partir duquel la ventilation-minute s'accroît et la pente d'accélération de la ventilation-minute en fonction de l'augmentation de la PaCO₂. Chez un sujet normal, l'augmentation de la ventilation suit linéairement celle de la pression partielle en CO₂. La pente de la réponse caractérise la sensibilité au CO₂ du générateur central de la ventilation (Similowski *et al.*, 1996, Straus, 2005). La réponse ventilatoire à l'hypercapnie exprimée ainsi évalue un système associant commande centrale et mécanique thoracique. L'EMG des muscles respiratoires peut permettre aussi d'évaluer la commande ventilatoire (Koenig, 2001, Straus, 2005). Cependant, comme il est impossible d'accéder simultanément à tous les muscles respiratoires, l'EMG ne permet pas une approche intégrative globale de la commande. Le signal intégré de l'EMG fournit un signal proportionnel à la tension développée par les muscles. Il s'agit alors d'un bon index de l'amplitude de la commande respiratoire (Straus, 2005). Néanmoins ces tests sont à prendre avec précaution quand ils sont réalisés sur des patients obèses en raison de la baisse de compliance thoracique et de la diminution d'efficacité des muscles respiratoires. Ces tests évaluant l'adaptation de la commande centrale ventilatoire sont altérés chez les sujets obèses OHS (Lopata & Onal, 1982, Lourenco, 1969, Redolfi *et al.*, 2007). En effet, les auteurs constatent une diminution de la pente de réponse au CO₂ et de la P_{0,1} chez les sujets OHS par

rapport à des obèses non OHS (Lopata & Onal, 1982, Sampson & Grassino, 1983, Han *et al.*, 2001, Redolfi *et al.*, 2007). Le rapport de la variation de la réponse de l'électromyogramme diaphragmatique à des concentrations croissantes de CO₂ inhalé est augmenté chez des patients souffrant d'obésité simple alors que les patients OHS ont une réponse similaire à celle des patients non obèses (Lourenco, 1969). Ces résultats impliquent que les patients obèses eucapniques ont une commande ventilatoire accrue qui permet de compenser les restrictions mécaniques de l'obésité, alors que les patients souffrant du OHS ne semblent pas bénéficier de cette aide compensatoire centrale (Lourenco, 1969, Emirgil & Sobol, 1973, Sampson & Grassino, 1983). Cependant, la diminution de la CCR observée peut être controversée car, à nouveau, l'hypercapnie que présentent les patients OHS peut entraîner une diminution de la réponse ventilatoire à un stimulus CO₂ (Rochester & Enson, 1974). Tous ces résultats tendent à supposer qu'il existerait une hypoventilation d'origine centrale chez les obèses OHS. De plus, une restauration partielle de la chémosensibilité au CO₂ est observée chez plusieurs patients OHS sans SAOS quelque temps après l'instauration d'une ventilation mécanique par rapport à des patients obèses eucapniques sans SAOS (Han *et al.*, 2001, Redolfi *et al.*, 2007). Les gaz du sang artériel diurne de ces patients se sont améliorés significativement après la VNI ainsi que la réponse au CO₂, bien qu'elle soit encore inférieure aux valeurs normales. Chez les patients SAOS mais sans OHS, la réponse ventilatoire au CO₂, plus importante que chez les patients OHS avec un SAOS, ne s'améliore pas avec la thérapie VNI (Lin, 1994). Cette restauration partielle de la réponse ventilatoire au CO₂ sous traitement VNI chez les patients OHS est en faveur d'une adaptation des centres respiratoires et implique que les déficiences de la mécanique du système respiratoire n'expliquent pas à elles seules l'hypoventilation présente chez certains obèses (Olson & Zwillich, 2005, Mokhlesi, 2010). Cela suggère aussi que le dysfonctionnement de la CCR observé est un effet secondaire du OHS et nécessaire à sa persistance, mais pas l'origine de celui-ci. Il y a quelques hypothèses quant à l'origine de ces défauts, nous avons déjà évoqué l'obésité, la présence d'un SAOS. De plus, des études réalisées chez la souris déficiente en leptine suggèrent que la modulation centrale de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie par la leptine pourrait être impliquée (O'Donnell *et al.*, 2000). Nous développerons l'éventuelle implication centrale de la leptine comme cause du OHS dans la suite de ce chapitre.

Même si les facteurs qui viennent d'être envisagés, contribuant au développement du OHS, sont encore discutés, ils ne s'excluent pas et c'est sans doute leur conjonction qui peut favoriser la survenue d'une hypoventilation associée à l'obésité.

III. Le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS)

1. Définition

Friedrich de la Motte Fouqué doit sa notoriété au conte Ondine, qu'il publie en 1811. C'est en étudiant les créatures sans âme, les génies à forme humaine comme les ondins, qu'il a puisé chez Paracelse, Christian August Vulpius et Achim von Arnim la trame de son récit en trouvant l'histoire de la nymphe Staufenberg. Ondine, fille du peuple des Ondins est un génie des eaux. Elle a le pouvoir de se transformer en créature humaine et d'acquérir une âme en épousant un mortel. Elle tombe folle amoureuse du sire Huldbrand de Gingstetten et l'épouse. Mais Ondine a du mal à évoluer parmi les humains et Huldbrand se trouve une autre favorite. Le chevalier, averti en rêve du châtiment qui lui est réservé en cas de tromperie, la perte de toutes ses fonctions automatiques, n'en tient pas compte et se remarie. Ondine plaide en sa faveur pour éviter qu'il subisse la loi du peuple des Ondins, en vain. Le roi des Ondins prive l'infidèle de ses fonctions automatiques et ce dernier meurt en étreignant Ondine ruisselante de larmes.

„Und ihren Schleier schlug Undine zurück, und himmlisch schön lächelte ihr holdes Antlitz daraus hervor. Beend vor Liebe und Todesnähe neigte sich der Ritter Huldebrand ihr entgegen, sie küßte ihn mit einem himmlischen Kusse, aber sie ließ ihn nicht mehr los, sie drückte ihn inniger an sich und weinte, als wolle sie ihre Seele fortweinen. Die Tränen drangen in des Ritter Augen und wogten im lieblichen Webe durch seine Brust, bis ihm endlich der Atem entging und er aus den schönen Armen Undines als ein Leichnam sanft auf die Kissen des Ruhebettes zurücksank.“

Friedrich de la Motte Fouqué, *Undine*, Kapitel 19, 1811.

La légende d'Ondine a inspiré les cliniciens pour designer l'hypoventilation alvéolaire d'origine centrale. C'est Severinghaus et collaborateurs (Severinghaus, 1962) qui introduisent en 1962 le terme d'Ondine dans la littérature médicale à l'occasion de l'observation de trois patients présentant des troubles du fonctionnement des centres respiratoires à la suite d'une intervention chirurgicale sur le tronc cérébral. Tous nécessiteront une ventilation mécanique pendant le sommeil pour des apnées centrales sévères alors qu'ils étaient capables de respirer sans assistance à l'éveil et présenteront une baisse de la chémosensibilité au CO_2/H^+ . Puis l'usage réservera ce terme aux formes congénitales de ce syndrome et c'est en 1970 que Mellins et collaborateurs (Mellins *et al.*, 1970) rapporteront le premier cas néonatal présentant une cyanose pendant le sommeil, une réponse ventilatoire atténuée lors de l'inhalation de CO_2 et pas de perception de modifications de la PaCO_2 malgré des valeurs élevées (120-130 mmHg).

Aujourd'hui, le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénital ou syndrome d'Ondine est défini comme une affection neuro-respiratoire rare caractérisée par la perte de la

chémosensibilité au CO_2/H^+ . C'est une pathologie à transmission autosomique dominante, causée par une mutation du gène *PHOX2B* (Amiel et al., 2003, Weese-Mayer *et al.*, 2005, Amiel *et al.*, 2009). Ce gène code un facteur de transcription essentiel au développement du système nerveux végétatif central et périphérique. Sur la base de travaux menés sur des modèles animaux, il est aujourd'hui proposé que ce soit l'absence ou l'altération fonctionnelle des neurones PHOX2B-positifs et CO_2/H^+ senseurs du RTN/pFRG, chémorécepteur central et acteur majeur de la commande centrale respiratoire automatique (Stornetta et al., 2006, Dubreuil et al., 2008, Guyenet *et al.*, 2009, Ramanantsoa *et al.*, 2011), qui soit à l'origine de la perte de la chémosensibilité au CO_2/H^+ . Depuis la découverte de la mutation du gène *PHOX2B* en 2003, la recherche de cette mutation constitue aujourd'hui un élément fondamental du diagnostic du CCHS (Amiel et al., 2009). Tous les neurones PHOX2B sont touchés par la mutation ; ces neurones sont impliqués dans un ensemble de régulations neurovégétatives. C'est la raison pour laquelle l'hypoventilation alvéolaire chez les patients CCHS est associée à de nombreux dysfonctionnements du système nerveux végétatif que nous ne détaillerons pas i.e. troubles du rythme cardiaque (Gronli *et al.*, 2008), thromboses veineuses du sinus central (Joseph *et al.*, 2011), altération de la thermorégulation (Vanderlaan *et al.*, 2004, Saiyed *et al.*, 2015), diminution de la réponse des pupilles à la lumière (Weese-Mayer et al., 2010), dysphagie (Weese-Mayer et al., 2010), maladie de Hirschsprung (Trang *et al.*, 2005), développement de tumeurs de la crête neurale (Trang et al., 2005), etc.

2. Sévérité

L'expression clinique varie selon la gravité de la maladie et se traduit par une hypoventilation profonde pendant le sommeil, associée dans les cas plus sévères à une hypoventilation pendant l'éveil, pouvant conduire à un arrêt respiratoire complet (Trang et al., 2005, Weese-Mayer et al., 2010). Cette variation en fonction de la sévérité du CCHS peut s'expliquer en partie par la mise en jeu de la composante volontaire diurne d'origine corticale de la commande centrale respiratoire. Ces mécanismes corticaux fonctionnels chez les patients CCHS favoriseraient pour une certaine proportion d'entre eux, les patients modérés, la normocapnie pendant l'éveil (Healy & Marcus, 2011) mais pas pendant le sommeil, où la commande ventilatoire ne repose alors que sur la composante automatique de la commande centrale respiratoire (Shea, 1997). D'autre part, 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., 2010). Une étude de Bachetti et collaborateurs a également montré que plus l'expansion d'alanine était importante moins PHOX2B était en mesure d'exercer sa fonction normale (Bachetti *et al.*, 2005). De plus, il a été mis en évidence que les protéines mutées porteuses d'une mutation d'expansion de répétition de polyalanine (PARM pour PolyAlanine Repeat expansion Mutation) ne sont pas en mesure de pénétrer dans

le noyau et peuvent former des agrégats intracytoplasmiques toxiques pour les cellules (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).

Une récente étude a évalué la chémosensibilité de patients CCHS (Carroll *et al.*, 2014). Ces patients ont été exposés à des challenges hypercapniques, hyperoxiques et hypoxiques et une réponse ventilatoire résiduelle à l'éveil aux différents challenges a été observée chez certains d'entre eux. Cette chémosensibilité résiduelle semble indépendante du type de mutation PHOX2B et suggère une préservation partielle d'une chémosensibilité dans des structures chémosensibles, par exemple les noyaux des raphés, le locus coeruleus, l'hypothalamus caudal, les corps carotidiens (Taylor *et al.*, 2005, Ramanantsoa *et al.*, 2011, Nattie & Li, 2012, Li *et al.*, 2013b, Carroll *et al.*, 2014). Cela pourrait fournir un point d'appui important pour des interventions pharmacologiques potentielles dans le cas des CHS.

3. Épidémiologie

Le CCHS est une maladie rare présente à travers le monde avec une prévalence en France de 1/200 000 naissances, affectant autant les femmes que les hommes (ratio 1 :1) (Vanderlaan *et al.*, 2004, Trang *et al.*, 2005).

4. Étiologie

a. Gène PHOX2B et défaillance de la commande centrale respiratoire

L'origine génétique de la maladie a été démontrée en 2003 (Amiel *et al.*, 2003). Le gène responsable est localisé sur le chromosome 4 et code une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription à homéodomaine, essentielle à la régulation de la migration des cellules de la crête neurale et au développement du système nerveux végétatif central et périphérique, le gène PHOX2B (Pattyn *et al.*, 1997, Pattyn *et al.*, 1999, Amiel *et al.*, 2003) Weese-Mayer, 2005 #6671}. La mutation est à transmission autosomique dominante et survient *de novo* dans la majorité des cas (Weese-Mayer *et al.*, 2003). Ses natures différentes expliquent une partie de la variabilité de la présentation clinique de la maladie i.e. âge de début des signes ventilatoires, sévérité et pathologies associées. Le diagnostic repose depuis cette découverte sur l'identification d'une mutation du gène PHOX2B. L'enquête génétique familiale est indispensable car si la mutation survient le plus souvent *de novo*, certaines mutations peuvent être héritées d'un parent asymptomatique qui n'exprime pas la maladie dans le cadre des formes tardives ou qui porte la mutation à l'état de mosaïque somatique (Weese-Mayer *et al.*, 2010).

b. Des génotypes....

Le facteur de transcription PHOX2B se compose de 314 acides aminés contenant deux séries de répétitions de 9 et 20 résidus de polyalanine. Environ 90% des cas de CCHS sont hétérozygotes pour une mutation PARM allant de 4 à 13 résidus supplémentaires au niveau de la seconde série de répétitions de polyalanines qui en contient 20, les expansions pouvant donc aller de 24 à 33 polyalanines successives (Weese-Mayer et al., 2003, Amiel et al., 2003). 10% des cas de CCHS sont hétérozygotes pour une mutation non liée à une expansion polyalanine (NPARM pour non-PolyAlanine Repeat expansion Mutation) et sont dus à des mutations du cadre de lecture (78% des cas), 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., 2010). 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., 2010). Ces multiples mutations du gène *PHOX2B* génèrent la formation de protéines aux structures quaternaires différentes. Ce changement de conformation pourrait entraîner soit la liaison défectueuse de PHOX2B sur les régions cibles des gènes dont il doit réguler l'expression soit une altération du recrutement des cofacteurs coopérant avec PHOX2B (Bachetti et al., 2005).

c.Aux phénotypes de certains acteurs de la CCR

Phox2b est principalement exprimé dans un ensemble de circuits neuronaux impliqués dans les régulations respiratoires, cardiovasculaires et digestives (Dauger *et al.*, 2003). La grande majorité des neurones exprimant *Phox2b* sont dans les branches motrices efférentes et sensorielles afférentes de ces circuits. L'altération de son expression entraîne donc de lourdes conséquences cliniques. Nous ne détaillerons que les perturbations touchant certains acteurs de la CCR et pouvant donc expliquer son dysfonctionnement.

Structures périphériques : La différenciation précoce du corps carotidien qui contient des cellules chémoréceptrices à l'O₂ et au CO₂ est dépendante de l'expression de *Phox2b*. En absence de son expression, 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 (Dauger et al., 2003, Trang *et al.*, 2014) En effet, l'information nerveuse des cellules chémoréceptrices du corps carotidien parvient au noyau du tractus solitaire commissural et médian par les fibres afférentes du nerf crânien IX (glosso-pharyngien) dont les corps cellulaires sont localisés dans le ganglion pétreux (Biscoe *et al.*, 1970, Biscoe, 1971, Berger, 1980, Eugenin *et al.*, 1990, Timmers *et al.*, 2003). La différenciation des afférences sensorielles glossopharyngées est sous le contrôle de *Phox2B* (Dauger et al., 2003). Enfin, l'expression de *Phox2B* est essentielle pour le développement du ganglion inférieur du nerf vague qui véhicule notamment l'activité des récepteurs broncho-

pulmonaires sensibles à l'étirement. Ces différentes anomalies des structures périphériques chémosensibles pourraient mettre à mal la réponse ventilatoire à l'hypercapnie puisqu'une partie de la chémoréception au CO_2/H^+ est périphérique (Lahiri & DeLaney, 1975a), même s'il est vrai que la majeure partie est d'origine centrale.

NTS : *Phox2B* est exprimé abondamment dans les neurones du NTS commissural et médian, structures relais où les informations issues des chémorécepteurs périphériques sensibles à l' O_2 et au CO_2 sont intégrées (Claps & Torrealba, 1988, Torrealba & Claps, 1988b, Finley & Katz, 1992) avant d'être transmises à d'autres structures du réseau respiratoire comme le RTN/pFRG (Takakura *et al.*, 2006b). Des anomalies de développement des neurones du NTS pourraient empêcher la transmission d'informations périphériques et ainsi contribuer à réduire la réponse ventilatoire à des variations de la PO_2 et de la PCO_2 (Dauger *et al.*, 2003, Stornetta *et al.*, 2006).

RTN/pFRG : Cette structure joue un rôle prépondérant dans la chémosensibilité au CO_2/H^+ (Onimaru & Homma, 2006, Onimaru *et al.*, 2008). Des travaux ont montré que les neurones du RTN/pFRG identifiés comme étant activés par une élévation du CO_2/H^+ (Mulkey *et al.*, 2004) exprimaient également *Phox2B* (Stornetta *et al.*, 2006, Onimaru *et al.*, 2008) et que ces neurones PHOX2B-positifs étaient uniformément activés par l'acidification et mis au silence par l'alcalinisation sur des tranches bulbaires de souris nouveau-née (Lazarenko *et al.*, 2009). Un modèle de souris conditionnelles pour lequel la mutation *Phox2b*^{27Ala} vise spécifiquement le RTN (Ramanantsoa *et al.*, 2011) a été développé et a permis de montrer que lorsque les neurones PHOX2B-positifs du RTN sont absents, ces souris présentent, jusqu'à l'âge de 3 semaines, une absence de réponse respiratoire à l'hypercapnie confirmant le rôle essentiel des neurones PHOX2B-positifs dans la détection de la chémosensibilité au CO_2 (Ramanantsoa *et al.*, 2011). En somme, des anomalies dans le développement de cette structure pourraient contribuer à réduire la chémosensibilité centrale et ainsi altérer la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

LC : Cette structure est un élément important de la réponse respiratoire à l'hypercapnie puisque ses neurones sont considérés comme des chémorécepteurs centraux au CO_2/H^+ (Biancardi *et al.*, 2008, de Carvalho *et al.*, 2014). Les neurones du LC sont aussi une source majeure d'innervation noradrénergique dans le SNC (Viemari, 2008). *Phox2B* est 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). Une mutation de *Phox2B* a pour conséquence d'entraîner un défaut de développement du LC via la dérégulation de la transcription de *Phox2A* (Tiveron *et al.*, 1996, Flora *et al.*, 2001, Viemari *et al.*, 2004a). Ainsi le dysfonctionnement de *Phox2B* via la dérégulation de la transcription de *Phox2A* a pour conséquence d'entraîner indirectement un défaut de développement du LC, une source majeure

de signalisation noradrénergique dans le SNC. De plus, une étude réalisée sur un modèle de souris mutantes inductibles, porteuses d'une mutation NPARM (Nobuta et al., 2015) montre que le déclenchement de la mutation au stade embryonnaire précoce (<E10,5) entraîne 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 ni 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 de cette structure participe au phénotype respiratoire des patients CCHS. *Phox2B* est également exprimé et nécessaire au développement d'un autre centre noradrénergique, la région A5 (Viemari et al., 2004a, Onimaru et al., 2008). De fait, des 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-hydroxylase, enzymes impliquées dans la biosynthèse des catécholamines (Lo *et al.*, 1999). Ces éléments soulignent le fait que *Phox2B* est important dans la mise en place et la régulation de la signalisation catécholaminergique.

Dans le contexte respiratoire, il semblerait que les mutations du gène *PHOX2B* soient responsables d'un défaut de développement de structures impliquées dans la régulation de la CCR, essentiellement chémosensibles, à l'origine des phénotypes respiratoires des patients CCHS.

d. ...Aux phénotypes respiratoires des patients CCHS

Comme dit précédemment, à l'âge adulte, chez les patients CCHS, la longueur de l'expansion de polyalanine est en corrélation avec la gravité de la maladie (Weese-Mayer et al., 2003, Matera et al., 2004, Antic et al., 2006) et va donc déterminer le degré de dépendance à la ventilation mécanique.

e. Génotype PARM

Les adultes présentant une mutation *PHOX2B*^{24Ala} et *PHOX2B*^{25Ala} ont besoin uniquement d'une ventilation artificielle nocturne. Les patients porteurs d'une mutation *PHOX2B*^{26Ala} peuvent avoir besoin en plus d'une assistance ventilatoire à l'éveil et les patients porteurs de mutations *PHOX2B*^{27Ala} à *PHOX2B*^{33Ala} ont besoin d'un soutien ventilatoire en continu (Weese-Mayer et al., 2005, Antic et al., 2006, Repetto *et al.*, 2009).

f. Génotype NPARM

La plupart des patients qui présentent un génotype NPARM ont besoin d'un soutien ventilatoire en continu (Berry-Kravis *et al.*, 2006).

Nota bene : Le dysfonctionnement du système nerveux végétatif dû aux mutations de *PHOX2B* est diffus et peut toucher les fonctions digestive, cardiovasculaire et oculaire. On peut citer la maladie de Hirschsprung (ou aganglionose colique) (Trang et al., 2005), le reflux gastro-

oesophagien (Faure et al., 2002), le dysfonctionnement du contrôle végétatif de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Woo et al., 1992, Trang et al., 2003) et plus exceptionnellement une tumeur des crêtes neurales (neuroblastome, ganglioneurome, ganglioneuroblastome) (Trang et al., 2005).

IV. Vers de nouveaux espoirs thérapeutiques....

Une meilleure compréhension de la physiopathologie des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale est l'une des principales préoccupations des équipes médicales prenant en charge les patients, dans l'objectif d'une amélioration des traitements. À l'heure actuelle, la ventilation mécanique demeure le support de vie, que ce soit pour les patients OHS ou CCHS et même pour d'autres CHS non développés dans les paragraphes qui ont précédé. Au-delà de l'optimisation de ces dispositifs mécaniques, le Graal des chercheurs aujourd'hui est de trouver un traitement pharmacologique symptomatique voire curatif de l'hypoventilation alvéolaire centrale permettant le sevrage de la ventilation mécanique afin d'améliorer la qualité de vie des patients souffrant de CHS. Même si ce but idéal n'était pas atteint, une restauration de la chémosensibilité au CO_2/H^+ conduisant à un ressenti par le patient serait déjà intéressante car elle pourrait accroître la sécurité des patients en déclenchant, en cas de dégradation respiratoire majeure, une alarme interne lui permettant de réguler lui-même sa ventilation. La correction pharmacologique de ces pathologies requiert donc une connaissance des circuits neuronaux sous-jacents et des mécanismes de modulation de la CCR à un stimulus hypercapnique. L'objectif de ce projet doctoral s'attache à déterminer les mécanismes d'action de molécules qui soit ont montré une efficacité sur le plan clinique ou sur le plan expérimental soit ont permis d'expliquer une partie de la physiopathologie des CHS ou encore ont éveillé un intérêt thérapeutique par leur implication dans la modulation de la CCR lors d'une hypercapnie. Nous présenterons brièvement l'origine de notre intérêt pour trois molécules (i.e. l'étonogestrel, le leptine, l'érythropoïétine) avant d'en faire un descriptif plus détaillé dans le prochain chapitre de ce manuscrit qui vise justement à en brosser un portrait.

Nota bene : Le socle des hypothèses suggérant l'implication de ces trois molécules dans la modulation de la CCR au cours d'une hypercapnie sera présenté en détail dans la suite du manuscrit.

1. L'étonogestrel

Une observation clinique fortuite chez deux patientes Ondine a mis en évidence une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ après 18 mois d'exposition à un contraceptif oral, le désogestrel (Straus et al., 2010). En prenant en considération les effets stimulants connus de la progestérone sur la CCR (Behan et al., 2003), l'hypothèse d'une implication centrale du

désogestrel dans cette récupération de la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ a été émise (Straus et al., 2010). L'étonogestrel, métabolite biologiquement actif du désogestrel, dérivé de la testostérone, semble ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement des patients Ondine et peut-être plus généralement des hypoventilations alvéolaires d'origine centrale.

2. L'érythropoïétine

L'érythropoïétine, bien connue pour son rôle d'hormone gouvernant le taux de production des érythrocytes (Reissmann, 1950), n'influence pas le système respiratoire seulement par son action sur la synthèse des globules rouges qui augmente le transport d' O_2 dans le sang. Il a été montré que l'érythropoïétine était impliquée dans les phénomènes de modulation de la CCR en réponse à l'hypoxie (Soliz et al., 2005, Voituron et al., 2014). Cette observation a mené à l'hypothèse de l'implication de cette hormone dans la modulation de la CCR en réponse à l'hypercapnie.

3. La leptine

Des données de la littérature démontrent que la leptine stimule la ventilation basale et augmente la réponse ventilatoire à l'hypercapnie en agissant sur la CCR (Bassi et al., 2016, O'Donnell *et al.*, 1999). Chez la souris, les micro-injections de leptine dans des zones cérébrales spécifiques (Bassi *et al.*, 2014, Bassi et al., 2016) sont associées à une ventilation pulmonaire augmentée et une activité accrue des muscles inspiratoires, suggérant que la leptine peut affecter la ventilation par une action directe sur les centres de contrôle respiratoire. Les résultats de ces travaux murins ont fait discuter du rôle de la leptine dans la dysrégulation de la commande respiratoire évoquée dans la physiopathologie du OHS chez l'Homme. Chez l'Homme, le déficit en leptine peut être associé à de l'hypoventilation (Montague *et al.*, 1997, Lucaccioni *et al.*, 2015). L'amélioration de la ventilation chez un patient atteint d'une déficience congénitale en leptine a été observée avant une perte de poids significative à la suite d'un traitement de leptine recombinante humaine (Lucaccioni et al., 2015). Cela suggère qu'une déficience en leptine peut avoir des effets centraux sur la régulation ventilatoire. Cependant, la déficience congénitale en leptine reste une maladie extrêmement rare et il s'avère que les taux de leptine sont le plus souvent augmentés dans l'obésité (Caro *et al.*, 1996b) et plus encore dans le OHS (Phipps *et al.*, 2002). En effet, le taux sérique de la leptine est anormalement augmenté chez les obèses OHS et proportionnel à l'adiposité de l'individu. La production excessive de CO_2 chez les sujets obèses est associée à une augmentation de la leptine sérique (Phipps et al., 2002, Campo *et al.*, 2007, Redolfi et al., 2007). Logiquement, cette augmentation pourrait expliquer l'absence d'hypercapnie chez la grande majorité des sujets sévèrement obèses non OHS, puisque la leptine, en jouant son rôle de stimulant respiratoire (O'Donnell et al., 2000), devrait compenser la forte production de CO_2 par une augmentation de la ventilation. Malgré

un taux de leptine supérieur chez les patients OHS par rapport aux sujets obèses non OHS, il n'y a pas de compensation ventilatoire observée en réponse à une forte production de CO₂ suggérant une résistance centrale à la leptine, pouvant être responsable de la diminution des réponses ventilatoires (Atwood, 2005). La constatation de taux sériques de leptine plus élevés chez les sujets obèses OHS hypercapniques en comparaison aux sujets obèses non OHS normocapniques pour un niveau d'obésité identique (Phipps et al., 2002, Campo et al., 2007, Malli *et al.*, 2010) peut être liée à une résistance à la leptine dont le mécanisme pourrait être un déficit de son transport à travers la barrière hémato-méningée (Caro *et al.*, 1996a, Yee *et al.*, 2006). Selon ces éléments, une hypothèse actuellement posée est que l'hypoventilation serait la conséquence d'une résistance leptinergique centrale chez les patients OHS. La seconde hypothèse qui en découle est que la leptine est impliquée dans la modulation de la CCR en hypercapnie.

Autant de molécules candidates relancent l'intérêt d'établir de nouveaux traitements pharmacologiques, perspective longtemps abandonnée et ainsi remise au goût du jour. Avant cela, il est nécessaire de comprendre comment ces molécules agissent en décortiquant leurs mécanismes d'action avant d'envisager de les utiliser en clinique et c'est l'objectif de ce doctorat.

Chapitre 4: Les systèmes de neurotransmission susceptibles de potentialiser la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

Nous décrivons dans ce chapitre trois systèmes de neurotransmission susceptibles de potentialiser la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Ces systèmes se composent d'au moins une molécule d'intérêt (i.e. progestagènes, érythropoïétine et leptine) et de ses récepteurs. Nous nous proposons d'aborder chacune d'entre elles, ses récepteurs et mécanismes d'action, de dépeindre quelques-uns de ses principaux effets biologiques et de détailler spécifiquement ses effets sur la ventilation.

Nous nous intéresserons essentiellement aux récepteurs exprimés au sein du SNC car, pouvant se situer sur les structures respiratoires centrales, ils pourraient être susceptibles d'intervenir dans les effets des différentes molécules étudiées sur la CCR et sa modulation afin d'influencer la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Au même titre, les récepteurs se trouvant en périphérie au niveau des chémorécepteurs peuvent être intéressants.

Nota bene : Les progestagènes incluent la progestérone et ses métabolites ainsi que les progestatifs de synthèse

I. Le système progestéronergique

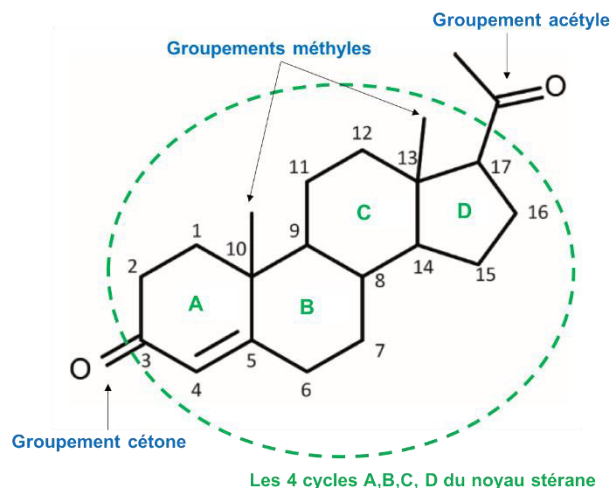
1. La progestérone

a. Description

En 1929, Willard Myron Allen a co-découvert la progestérone avec son professeur d'anatomie George Washington Corner à la faculté de médecine de l'Université de Rochester (Allen & Corner, 1929a) (Allen & Corner, 1929b). Ils ont d'abord démontré son rôle physiologique à partir d'expériences sur des lapines privées de leurs deux ovaires à 18 heures de grossesse, en leur injectant des extraits de corps jaune préalablement isolés. Ils constatent que leurs embryons peuvent survivre et croître normalement et qu'une implantation normale peut se produire au niveau de l'utérus alors qu'en l'absence d'extraits de corps jaune, les embryons ne survivent jamais au-delà du quatrième jour de gestation. Il semble donc que les extraits du corps jaune contiennent une hormone spéciale qui a pour l'une de ses fonctions la préparation de l'utérus à l'implantation des embryons, en induisant une prolifération de l'endomètre. Ce n'est qu'en 1937 que Makepeace montre que cette hormone du corps jaune est capable de bloquer l'ovulation chez la lapine (Makepeace *et al.*, 1937), propriété qui a d'ailleurs été mise à profit dans la contraception. En 1930, Allen nomme cette hormone « progestin », en

français progestatif (Allen, 1930). Elle tire son nom du latin *progestare*, « porter en avant », qui indique son implication dans le maintien et le développement de la gestation. Plus tard, le terme progestatif prendra le nom de « progestérone », sans doute pour éviter de la confondre avec d'autres progestatifs qui sous-entendent dès lors, progestatifs de synthèse. La progestérone est classée dans la famille des hormones stéroïdiennes sexuelles (Porcu *et al.*, 2016). Les hormones stéroïdiennes appartiennent à la classe des lipides et sont caractérisées par une structure de base commune, c'est-à-dire, un complexe polycyclique de 17 atomes de carbone formant un système à quatre cycles communément appelé noyau stérane (Figure 27). Ce noyau est composé de trois cyclohexanes (désignés A, B et C), et d'un cyclopentane (désigné D). D'après le nombre d'atomes de carbone, les hormones stéroïdiennes sexuelles sont divisées en trois groupes : les progestagènes (e.g. progestérone) caractérisés par leurs 21 atomes de carbone, les androgènes (e.g. testostérone) qui en comptent 19 et les œstrogènes (e.g. oestradiol) qui en possèdent 18. Néanmoins, certains progestatifs de synthèse sont des dérivés de la testostérone.

Figure 27 : Structure moléculaire de la progestérone (C₂₁H₃₀O₂)



La progestérone est une molécule à 21 atomes de carbones, composée d'un cyclohexène (A), de 2 cyclohexanes (B et C) et d'un cyclopentane (D) formant un noyau stérane à 17 carbones (Schumacher *et al.*, 2014). Elle porte un groupement cétone en C3, un groupement acétyle en C17, deux groupements méthyles en C10 et C13. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

b. Biosynthèse périphérique et centrale

Les hormones stéroïdiennes sexuelles sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, le cholestérol. (Stoffel-Wagner, 2001). Ces hormones sont principalement synthétisées en périphérie, au niveau des gonades, des glandes surrénales et du placenta (Stoffel-Wagner, 2001, Guennoun *et al.*, 2008) mais aussi au sein du SNC (Baulieu, 1991). 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 & Griffin, 2002, Taraborrelli, 2015). La synthèse de progestérone résulte de deux étapes enzymatiques : premièrement la conversion du cholestérol en prégnénolone dans la

mitochondrie par le cytochrome P450_{scc}, deuxièmement la conversion de la prégnénolone en progestérone par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase localisée soit dans la mitochondrie soit dans la membrane du réticulum endoplasmique en fonction du type cellulaire (Schumacher *et al.*, 2007, Schumacher *et al.*, 2014). Une fois synthétisée, elle est transportée dans le plasma de façon prédominante sous forme liée au cortisol-binding globulin ou sous forme libre (Taraborrelli, 2015). La fraction libre, qui ne représente qu'une faible part, est capable de passer la barrière hématoencéphalique (McEwen *et al.*, 1990, McEwen *et al.*, 1991). La progestérone a une demi-vie relativement courte dans le corps de seulement cinq minutes (Taraborrelli, 2015). La présence de la progestérone au sein du SNC est à la fois dépendante de la stéroïdogénèse périphérique (Stoffel-Wagner, 2001, Guennoun *et al.*, 2008) car une partie synthétisée sous forme libre dans le plasma franchit la barrière hématoencéphalique mais aussi indépendante de la stéroïdogénèse périphérique puisqu'elle est synthétisée directement au sein du SNC (Baulieu, 1991, Compagnone & Mellon, 2000). Les stéroïdes synthétisés *de novo* dans le SNC portent le nom de neurostéroïdes ou stéroïdes neuro-actifs afin de les différencier de ceux synthétisés au sein des glandes endocrines périphériques (Baulieu, 1991, Compagnone & Mellon, 2000). En effet, il a été constaté dans les années 1980 que des stéroïdes tels que la prégnénolone et la déhydroépiandrostérone étaient présents à des concentrations plus élevées dans les tissus du SNC que dans le plasma. De plus, ces stéroïdes demeuraient dans le SNC deux semaines après une gonadectomie ou une surrénalectomie, malgré le déficit constaté dans les tissus périphériques (Corpechot *et al.*, 1981, Corpechot *et al.*, 1983), suggérant soit qu'ils pouvaient soit être synthétisés *de novo*, soit pouvaient traverser la barrière hémato-encéphalique et s'accumuler au sein du SNC (Compagnone & Mellon, 2000). La présence des enzymes responsables de la stéroïdogénèse au sein du SNC et plus particulièrement au niveau des neurones et des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) a permis de confirmer l'hypothèse de la synthèse *de novo* (Mellon & Griffin, 2002). En effet, 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 & Mellon, 2000). Plus particulièrement, le cytochrome P450_{scc} est retrouvé au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du cervelet, de la moelle épinière et plus fortement exprimé au niveau du bulbe rachidien et du pont (Compagnone & Mellon, 2000).

c. Principaux effets biologiques

- Périphériques

La progestérone joue un rôle central dans la reproduction en étant impliquée dans l'ovulation, la nidation et la gestation. A cela s'ajoute la régulation de la fonction utérine pendant le cycle menstruel (Graham & Clarke, 1997, Maha Al-Asmakh, 2007, Taraborrelli, 2015). Chez la femme, le cycle ovarien dure environ 28 jours. On distingue deux phases, la phase folliculaire

et la phase lutéale. La phase lutéale est caractérisée par la présence du corps jaune qui sécrète de la progestérone (Mihm *et al.*, 2011). Le corps jaune se développe puis dégénère en absence de fécondation. Si la fécondation a lieu, la progestérone est synthétisée en continu pendant la grossesse par le placenta (Mihm *et al.*, 2011). Un préalable capital à l'action périphérique de la progestérone est l'existence d'une imprégnation œstrogénique, l'inverse n'étant pas vrai. Dans ces conditions, la progestérone va pouvoir exercer ses effets liés à son action propre. De plus, les œstrogènes sont capables d'induire la synthèse et l'expression des récepteurs de la progestérone.

- **Centraux**

Plusieurs rôles de la progestérone en tant que neurostéroïde au sein du SNC ont été décrits (Mellon & Griffin, 2002). La progestérone intervient alors au sein du SNC dans de multiples processus comme la régulation de la myélinisation, la neuroprotection, la neuroplasticité (Peterson *et al.*, 2012, Baudry *et al.*, 2013), l'humeur (Watson *et al.*, 2012), la neuroinflammation (Giatti *et al.*, 2012) et la croissance des axones et des dendrites (Compagnone & Mellon, 2000, Mellon & Griffin, 2002, Bali *et al.*, 2012). Elle a aussi un effet hyperthermisant en élevant la température basale par une action sur l'hypothalamus. Ses actions peuvent être également médiées indirectement par ses métabolites. On retiendra que la progestérone aurait un effet neuroprotecteur notamment en favorisant la production de myéline (Thomas *et al.*, 1999, Mellon & Griffin, 2002). Elle semble également affecter le comportement. En effet, l'augmentation post-natale des niveaux de cette hormone pourrait expliquer la réduction des comportements agressifs chez des souris allaitantes (Pinna *et al.*, 2008). Les neurostéroïdes modulent de manière bidirectionnelle l'excitabilité neuronale en agissant de manière allostérique sur des récepteurs GABA_A et ainsi ils potentialisent ou modèrent l'effet du GABA sur les récepteurs GABA_A (Majewska, 1992). La synthèse aberrante de neurostéroïdes peut contribuer à des défauts dans la neurotransmission, entraînant une variété de troubles neurologiques et affectifs (Majewska, 1992). Ainsi, le métabolite neuro-actif de la progestérone, l'alloprégnanolone, a la capacité de provoquer une augmentation de l'inhibition médiée par le GABA_A des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (Kaura *et al.*, 2007) et des neurones cultivés de l'hippocampe (Majewska *et al.*, 1986) en potentialisant les actions inhibitrices du GABA sur le récepteur GABA_A. Ces effets observés de l'alloprégnanolone pourraient expliquer certains troubles de l'humeur généralement associés aux pics de progestérone, tels que le trouble dysphorique prémenstruel et la dépression post-natale (Kaura *et al.*, 2007) mais aussi les actions sédatives, anesthésiques et hypnotiques de la progestérone (Majewska *et al.*, 1986). Cela pourrait avoir un intérêt dans le traitement de l'épilepsie, de l'insomnie et de l'anxiété (Melcangi *et al.*, 2014).

2. Les progestatifs de synthèse

A la suite de la découverte de la progestérone, son obtention à l'état cristallisé devient l'objectif des chimistes dans les années 1930 (Hirvonen, 1996) afin notamment de développer un contraceptif oral. En 1933, Allen isola l'hormone pure. Il raconta plus tard en 1974, témoignage de sa participation majeure à l'endocrinologie, la découverte et l'isolement de la progestérone dans un livre intitulé *Recollections of my Life with Progesterone* (Allen, 1974). En 1934, Butenandt réussit à synthétiser la progestérone en traitant six cents kilos d'ovaires de truies, soit 50 000 animaux, dont il a extrait 12 mg de progestérone cristallisée. En 1944, Bickenbach et Paulikovics parviennent à bloquer l'ovulation en injectant quotidiennement à une femme une dose de 20 mg de progestérone (Pletzer & Kerschbaum, 2014). L'administration de la progestérone par voie orale n'est alors pas possible du fait de la faible activité de la progestérone lorsqu'elle est administrée ainsi.

Afin de pallier aux faibles efficacités et biodisponibilités de la progestérone, l'équipe de Carl Djerassi réussit au début des années 1950 (Pletzer & Kerschbaum, 2014) la synthèse de noréthistérone, la première molécule progestative active par voie orale. Depuis, un très grand nombre de progestatifs a été développé afin d'augmenter l'efficacité et de minimiser les effets secondaires associés à la prise de ces molécules.

a. Description

Les progestatifs désignent les progestatifs de synthèse qui en étant capables de se lier aux mêmes récepteurs que la progestérone, unique progestatif endogène, reproduisent ses effets biologiques (Schindler *et al.*, 2003, Sitruk-Ware, 2004b). Dans le plasma, ces progestatifs se retrouvent principalement sous forme liée à la protéine de liaison des hormones sexuelles ou au sérum albumine avec plus ou moins d'affinité suivant le progestatif. Cependant, une faible proportion se retrouve sous forme libre.

Les progestatifs de synthèse sont dérivés soit de la progestérone soit de la testostérone (Figure 28). Ils se différencient de ces deux hormones par plusieurs modifications chimiques (Schindler *et al.*, 2003, Sitruk-Ware, 2004b, Benagiano *et al.*, 2004). Ils sont classés par génération, c'est à dire en fonction de leur date d'apparition sur le marché. A ce jour nous pouvons dénombrer quatre générations (Sitruk-Ware, 2004a, Louw-du Toit *et al.*, 2016). Dans le cas des dérivés de la progestérone, il s'agit soit de dérivés de la 17-hydroxyprogestérone soit de dérivés de la 19-norprogestérone, ce sont respectivement les groupes pregnanes et norpregnanes (Figure 28). Ils forment les progestatifs de quatrième génération. Parmi ces progestatifs de quatrième génération, on trouve également la drospirénone et le diénogest. La drospirénone est un dérivé de la spironolactone et le diénogest est un progestatif « hybride » possédant les propriétés des progestatifs dérivés de la testostérone et ceux de la progestérone. Dans le cas des dérivés de la testostérone, il s'agit de dérivés de la 19-nortestostérone, ce sont des groupes estranes et des gonanes (Figure 28). Les progestatifs les plus couramment utilisés en clinique sont les dérivés de la testostérone. Parmi les dérivés de la 19-nortestostérone, on

trouve les progestatifs dits de première génération, tel que le noréthistérone qui est également le premier progestatif synthétisé. Les progestatifs dits de deuxième génération sont composés de deux catégories de progestatifs, les estranes ainsi que les gonanes. Les progestatifs dits de troisième génération sont dérivés des progestatifs dits de deuxième génération et sont composés entre autres, du désogestrel.

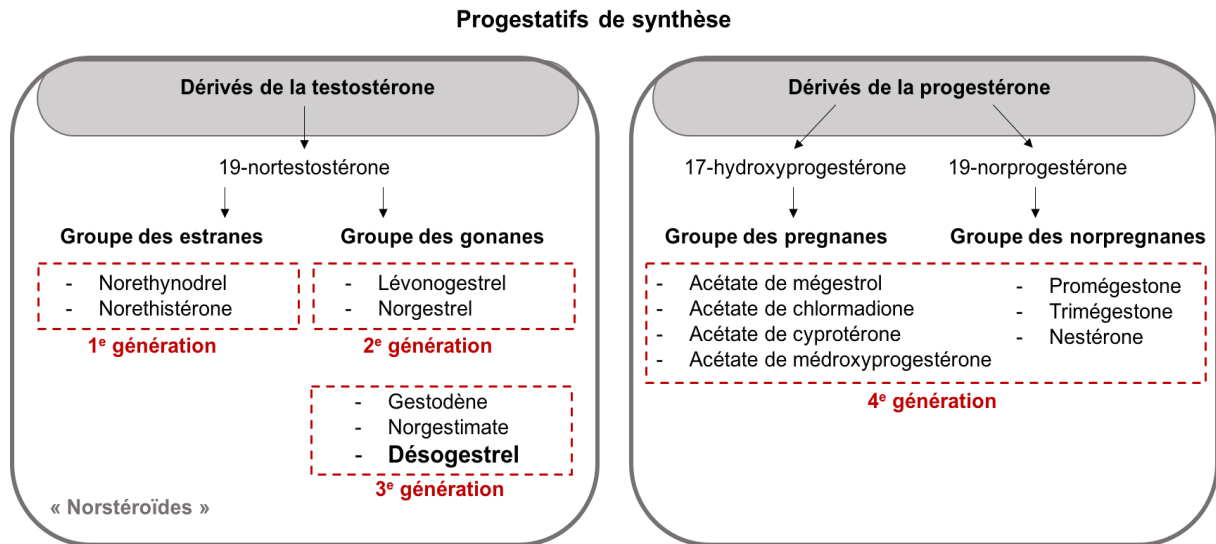


Figure 28 : Classes et générations de progestatifs

Les progestatifs sont classés en 2 familles : les dérivés de la progestérone (Pregnane et Norpregnane) et les dérivés de la testostérone (Estrane et Gonane). Les dérivés de la testostérone dits « norstéroïdes » et les dérivés de la progestérone sont décrits par génération (Schindler et al., 2003). Parmi ces progestatifs, le désogestrel est la molécule qui nous intéresse particulièrement. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

b. Un progestatif particulier, le désogestrel

Le métabolite biologiquement actif formé *in vivo* du désogestrel est le 3-kéto-désogestrel ou étonogestrel (Figure 29). Sa biodisponibilité orale est de 76% (Schindler et al., 2003, Sitruk-Ware, 2004b). Le pic de concentration plasmatique est atteint en 2 heures. On le retrouve majoritairement sous forme liée (76% à la sérum albumine, 32% à la protéine de liaison des hormones sexuelles) et les 2% restants sont libres dans le plasma. 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 et donc une plus grande spécificité d'action (Benagiano et al., 2004). Il possède donc une forte activité progestéronergique, une activité androgénique moindre et pas d'activité œstrogénique (Verhoeven *et al.*, 1998, Timmer *et al.*, 1999, Grandi *et al.*, 2014). Le désogestrel est utilisé comme contraceptif administré oralement sous forme de pilule. C'est la molécule d'intérêt d'une partie de ce travail doctoral.

Nota bene : Lors de nos expérimentations, nous avons utilisé le désogestrel sous sa forme biologiquement active, l'étonogestrel. En effet, une partie de nos expérimentations s'est effectuée sur des préparations de SNC isolé, donc en absence de foie, où normalement le désogestrel est converti en étonogestrel. Les expérimentations sur des animaux in vivo qui par essence contiennent un foie ont elles aussi été réalisées avec de l'étonogestrel afin de limiter un biais expérimental et d'homogénéiser les résultats.

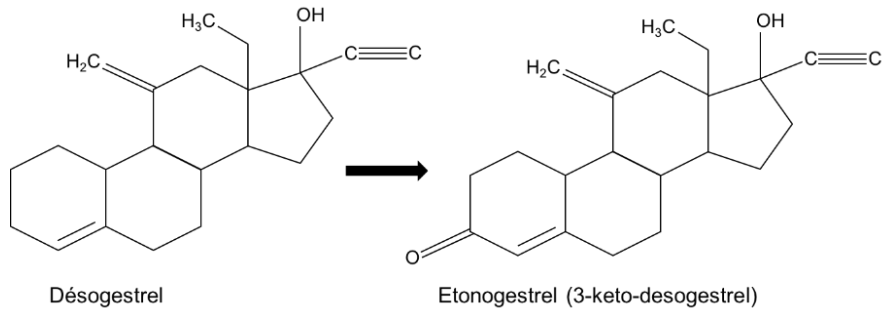


Figure 29 : Structure moléculaire du désogestrel et de l'étonogestrel

Le désogestrel est une pro-drogue métabolisée en 3-keto-desogestrel ou étonogestrel, son principal métabolite biologiquement actif formé *in vivo* (Verhoeven et al., 1998, Timmer et al., 1999). ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

c. Les effets biologiques des progestatifs

Les actions biologiques des progestatifs sont semblables à ceux de la progestérone et sont principalement déterminées comme cette dernière par leurs interactions avec différents récepteurs cibles, leur pharmacocinétique, leur biodisponibilité et par la régulation de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes endogènes (Benagiano et al., 2004, Wiegatz & Kuhl, 2004, Louw-du Toit et al., 2016). C'est aussi ce qui leur confère des effets indésirables variables. Ainsi, ils possèdent de manière fluctuante une activité progestative, anti-gonadotrope, anti-œstrogénique, androgénique ou anti-androgénique au niveau périphérique mais aussi des activités au niveau du SNC. Il s'avère que la progestérone et les progestatifs sont aussi impliqués dans le contrôle de la ventilation. Nous le détaillerons dans un paragraphe dédié à la description de ce rôle.

3. Les récepteurs cibles des progestagènes

La progestérone et les différents progestatifs agissent par le biais de récepteurs constituant leurs tissus cibles. De fait, leurs effets biologiques précités résultent de leurs interactions avec des récepteurs nucléaires stéroïdiens à actions génomiques et des récepteurs membranaires, spécifiques ou non, à actions non génomiques (Figure 30).

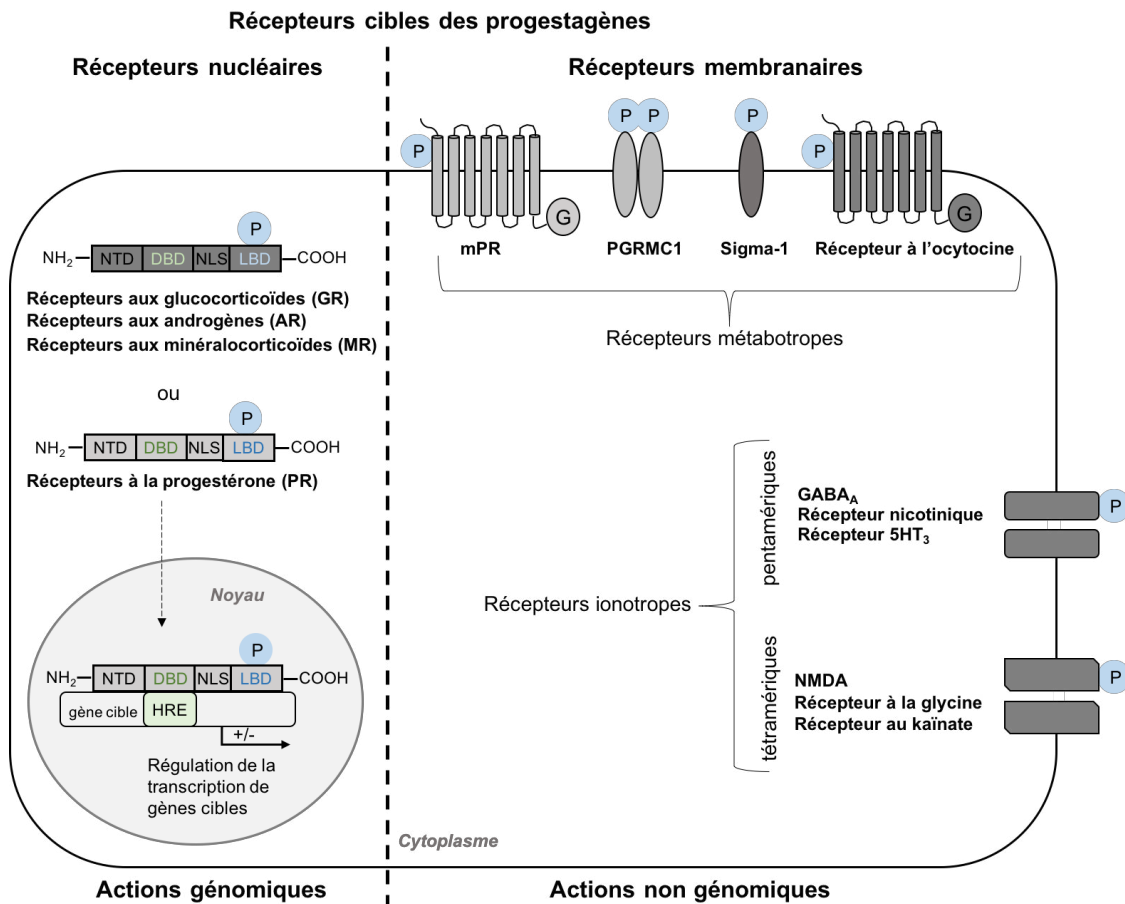


Figure 30 : Modes d'action génomique et non génomique des progestagènes

Représentation des récepteurs ciblés par les progestagènes au niveau d'une cellule du SNC. Le côté gauche montre les récepteurs nucléaires stéroïdiens spécifiques ou non de la progestérone qui interviennent dans les effets génomiques des progestagènes. La protéine est représentée avec ses différents domaines : domaine N-terminal (NTD), domaine de fixation à l'ADN (DBD), séquence de localisation nucléaire (NLS), domaine de fixation du ligand (LBD). La partie droite montre les récepteurs membranaires spécifiques de la progestérone ou appartenant à d'autres systèmes de neurotransmissions qui sont les cibles de progestagènes. Pour les récepteurs membranaires, on peut distinguer les récepteurs métabotropes et les récepteurs ionotropes soit pentamériques soit tétramériques. Le ligand progestagène (P) est représenté par un cercle bleu. Les récepteurs spécifiques de la progestérone sont colorés en gris clair et les récepteurs non spécifiques en gris plus foncé. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

a. Les récepteurs nucléaires stéroïdiens des progestagènes

- Description

Les récepteurs nucléaires spécifiques à la progestérone (nPRs) appartiennent à la famille des récepteurs aux stéroïdes et fonctionnent comme des facteurs de transcription inducibles par un ligand, ici la progestérone et les progestatifs (Brinton *et al.*, 2008). En effet, ils sont capables de moduler l'expression de gènes cibles en ayant une séquence PRE (Progesterone Responsive Element) au niveau de leur promoteur (Figure 30) (Brinton *et al.*, 2008). Plusieurs isoformes du récepteur nucléaire à la progestérone ont été décrites chez le rat, dont les plus courantes sont

l'isoforme A (noté PR-A ; 80kDa) et l'isoforme B (noté PR-B ; 120kDa). Elles sont toutes deux issues de l'expression d'un seul gène de 8 exons localisé sur le chromosome 11. Le nPR est composé d'une région N-terminale variable (codée par l'exon 1), un domaine conservé de liaison à l'ADN (codé par les exons 2 et 3), une région charnière variable (codée par une partie de l'exon 4) et un domaine de liaison au ligand conservé (codé par les exons 4 à 8) (Conneely *et al.*, 1987, Brinton *et al.*, 2008). Le PR-A possède une extrémité N-terminale tronquée de 164 acides aminés par rapport au PR-B (Conneely *et al.*, 1987, Wen *et al.*, 1994). Il existe d'autres isoformes de ces récepteurs dues à des variantes d'épissage avec par exemple des sauts d'exons qui peuvent être générés par omission de l'exon 1 (PR-C ; 60kDa) ou des exons 1 à 3 (PR-S et PR-T) (Hirata *et al.*, 2002, Hirata *et al.*, 2003). La proportion tissulaire relative des différentes isoformes de nRP varie en fonction du tissu cible et de la situation physiologique (Bethea & Widmann, 1998). En effet, l'expression des nRPs dans l'encéphale varie notamment en fonction des fluctuations hormonales au cours du cycle ovarien, de l'âge, du sexe et de la localisation encéphalique (Bethea & Widmann, 1998, Guerra-Araiza *et al.*, 2000, Camacho-Arroyo *et al.*, 2007, Thornton *et al.*, 1989, Lauber *et al.*, 1991).

*Nota bene : Les nPRs ne sont pas les seuls récepteurs nucléaires pouvant interagir avec la progestérone, ses dérivés ou avec les progestatifs de synthèse. Les récepteurs nucléaires appartenant à d'autres stéroïdes actifs ou neurostéroïdes sont également concernés, comme les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes (Schindler *et al.*, 2003).*

- **Mécanisme d'action**

En l'absence de progestagènes, les nPRs sont complexés à la membrane des cellules à des protéines chaperonnes HSP90, HSP70 et HSP40 (Pratt, 1998, Pratt & Toft, 2003). La liaison d'un progestagène au nPR entraîne des changements conformationnels qui induisent la dissociation de ces protéines chaperonnes. Dans le cytoplasme de la cellule, 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).

- **Localisation**

Au sein du SNC, les nPRs sont retrouvés au niveau de structures du tronc cérébral incluses dans le réseau respiratoire comme la VLM (Kastrup *et al.*, 1999) et le noyau parabrachial (Kastrup *et al.*, 1999). Ils sont aussi également exprimés dans d'autres structures centrales du réseau neuronal respiratoire. Au niveau du tronc cérébral, ils sont retrouvés dans le NTS (Haywood *et al.*, 1999), le 12N (Kastrup *et al.*, 1999, Behan & Thomas, 2005) et le LC (Helena *et al.*, 2009). Au niveau du diencéphale dans la zone pré-optique, l'aire ventro-latérale (Lauber *et al.*, 1991, Furuta *et al.*, 2010), le noyau arqué, l'hypothalamus notamment le noyau dorso-médian, paraventriculaire, arqué ainsi que l'aire ventro-médiane (Lauber *et al.*, 1991,

Kato *et al.*, 1994, Guerra-Araiza *et al.*, 2001), au niveau du télencéphale dans l'hippocampe, le cortex frontal et enfin dans le cervelet (Kato *et al.*, 1994, Guerra-Araiza *et al.*, 2001).

De même, ils sont exprimés au niveau de structures périphériques connues pour adapter la CCR à une situation physiologique (e.g. hypercapnie, hypoxie) ou environnementale (e.g. altitude), les chémorécepteurs périphériques. A ce jour, peu d'études se sont focalisées sur l'impact des hormones sexuelles stéroïdiennes sur les chémorécepteurs périphériques. Hannhart et ses collaborateurs ont rapporté que l'activité du nerf carotidien augmentait après une élévation chronique de progestérone et d'œstrogène chez le chat, suggérant que le corps carotidien était sensible aux hormones sexuelles circulantes et que son activité pouvait être modulée par ces deux stéroïdes (Hannhart *et al.*, 1989, Hannhart *et al.*, 1990). Chez le rat adulte et nouveau-né, la présence de récepteurs nPR localisés au niveau des cellules chémosensibles du corps carotidien a été mise en évidence par immunohistochimie et western blot (Joseph *et al.*, 2006). Dans cette même étude il a également été mis en évidence la présence de P450scc, la première enzyme impliquée dans la première 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).

b. Les récepteurs membranaires spécifiques des progestagènes

Les progestagènes exercent également des effets à court terme qui sont souvent non génomiques. De fait, des études ont montré que la progestérone est capable d'initier l'activation de voies de signalisation intracellulaire entraînant des modifications des flux d'ions et des concentrations en Ca^{2+} intracellulaire en quelques secondes (Blackmore *et al.*, 1991) ainsi que le recrutement d'autres seconds messagers en quelques minutes (Liu & Patino, 1993, Filardo *et al.*, 2000). Or les effets médiés par des mécanismes génomiques, impliquant la transcription d'ARNm et la traduction de protéines, surviennent assez lentement, allant de l'heure à quelques jours. 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 & Goetz, 1987, Thomas *et al.*, 2002). Cependant, il ne faut pas exclure que les récepteurs membranaires de la progestérone peuvent, une fois activés par un ligand progestagène, enclencher des voies de signalisation comme celle des MAPkinases (Pace & Thomas, 2005), qui *in fine* entraînent des modifications de la transcription de gènes (Karteris *et al.*, 2006).

Ces effets principalement non génomiques s'exercent à travers l'activation de récepteurs de la famille des récepteurs adipoQ (PAQR pour Progestin and AdipoQ Receptors), également nommés récepteurs membranaires à la progestérone (mPRs) (Thomas, 2008, Kelder *et al.*, 2010, Thomas & Pang, 2012) ou via le PGRMC1 (Progesterone receptor membrane component 1), premier récepteur membranaire à la progestérone découvert en 1996 (Figure 30, page 86) (Falkenstein *et al.*, 1996, Meyer *et al.*, 1996).

mPR

- Description

Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires comptant 11 membres et pouvant être divisés en trois classes en fonction de leur structure et leur caractéristique de liaison au ligand (Tang *et al.*, 2005). Seuls les mPRs de classe 2 sont sensibles à la progestérone (Smith *et al.*, 2008). Cette classe comporte cinq membres uniquement présents chez les vertébrés, comprenant les PAQR7 (ou mPR α) (Zhu *et al.*, 2003b), PAQR8 (ou mPR β), PAQR5 (ou mPR γ) (Zhu *et al.*, 2003a), PAQR6 (ou mPR δ) et les PAQR9 (ou mPR ϵ) (Smith *et al.*, 2008, Pang *et al.*, 2013). Ces récepteurs présents chez l'Homme sont hautement conservés chez le rongeur (Zhu *et al.*, 2003a, Liu & Arbogast, 2009). Ils sont considérés comme des récepteurs couplés aux protéines G (Figure 30, page 86) (Thomas & Pang, 2012). Parmi ces récepteurs, mPR α , mPR β et mPR γ sont couplés à une protéine G inhibitrice (G_i) (Zhu *et al.*, 2003a, Karteris *et al.*, 2006), alors que mPR δ et mPR ϵ sont couplés à une protéine G stimulatrice (G_s) (Pang *et al.*, 2013). Les récepteurs mPR δ et mPR ϵ semblent présenter une affinité plus grande à la progestérone que les récepteurs mPR α , mPR β et mPR γ (Pang *et al.*, 2013, Petersen *et al.*, 2013).

- Mécanisme d'action

La liaison d'un progestagène à un mPR provoque l'activation des protéines G spécifiques qui à leur tour activent (G_s) ou inhibent (G_i) l'adénylate cyclase, enzyme qui catalyse la réaction de formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), second messenger intracellulaire produit à partir d'ATP (Karteris *et al.*, 2006, Thomas & Pang, 2012). Ainsi, l'activation des récepteurs couplés à une protéine G_s augmente l'accumulation cellulaire de l'AMPC alors que ceux couplés à une protéine G_i la diminuent (Pang *et al.*, 2013). Cet AMPC est l'activateur de la protéine kinase A qui est capable de phosphoryler, et ainsi de moduler l'activité de nombreux substrats protéiques.

- Localisation

Différentes études ont observé 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). Les récepteurs mPR α , mPR β et mPR γ sont exprimés préférentiellement dans les neurones et non dans les oligodendrocytes ou les astrocytes (Meffre *et al.*, 2013). Ils sont présents dans différentes régions de l'encéphale comme 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). L'analyse d'extraits de tissus humains et de poissons par northern blot et RT-PCR a mis en évidence une co-localisation de mPR α et mPR β au sein du SNC, contrairement au mPR γ qui semble plus fortement exprimé au niveau du poumon, du foie, des reins et des trompes de Fallope (Zhu *et al.*, 2003a, Nutu *et al.*, 2007).

Certaines des structures où ces récepteurs sont exprimés sont impliquées dans le contrôle de la respiration. On a notamment montré la présence des récepteurs mPR β dans la région dorsale du tronc cérébral, en particulier au niveau du NTS et du 12N (Boukari *et al.*, 2015, Boukari *et al.*, 2016). Les récepteurs mPR δ et mPR ϵ semblent être les isoformes les plus présentes dans l'encéphale (Pang *et al.*, 2013). mPR δ semble être le seul membre des mPR spécifique à l'encéphale où il est l'isoforme la plus représentée. On le retrouve dans le cervelet, 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). Le récepteur mPR ϵ est lui abondant dans la glande hypophyse et l'hypothalamus (Pang *et al.*, 2013).

PGRMC1

- Description

En 1996, le PGRMC1 (Progesterone receptor membrane component 1) est le premier récepteur membranaire à la progestérone (Figure 30, page 86), distinct des isoformes mPRs, qui a été isolé et cloné à partir de foie de porc (Falkenstein *et al.*, 1996, Meyer *et al.*, 1996). Par la suite, des protéines homologues ont été clonées dans d'autres espèces de vertébrés par plusieurs équipes de recherche qui lui ont donné différents noms. Le terme le plus couramment utilisé est PGRMC1 (Losel *et al.*, 2004, Peluso *et al.*, 2006) notamment lorsqu'il est décrit dans l'encéphale et la moelle épinière. PGRMC1 est une protéine de 25 kDa conservée chez les vertébrés qui contient un court domaine N-terminal extracellulaire, un seul domaine transmembranaire, et un domaine C-terminal cytoplasmique caractérisé par la présence d'un motif cytochrome b5 (Meyer *et al.*, 1996, Min *et al.*, 2004, Cahill, 2007, Petersen *et al.*, 2013). Ce récepteur a 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).

- Mécanisme d'action

La liaison de la progestérone à PGRMC1 est sélective, réversible et rapide (Falkenstein *et al.*, 1996, Meyer *et al.*, 1996). Certaines données suggèrent que PGRMC1 pourrait également agir comme une protéine adaptatrice, en liant et en permettant le transport de mPR α jusqu'à la surface cellulaire, où PGRMC1 et mPR α constitueraient alors les composants d'un complexe de protéines agissant comme récepteur à la progestérone (Thomas *et al.*, 2014).

- Localisation

Des techniques d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence la présence de PGRMC1 au niveau du tronc cérébral, de l'hypothalamus, du cortex cérébral ou encore du cervelet (Meffre *et al.*, 2005, Guennoun *et al.*, 2008, Intlekofer & Petersen, 2011, Petersen *et al.*, 2013, Guennoun *et al.*, 2015). Notamment, PGRMC1 est exprimé au sein d'une structure

connue pour être impliquée dans la genèse du rythme respiratoire, le préBötC (Tan *et al.*, 2012) ainsi que des structures centrales connues pour moduler ce rythme comme le NTS, la PAG dans le mésencéphale, et l'hypothalamus caudal (Intlekofer & Petersen, 2011, Tan *et al.*, 2012).

c. Les récepteurs membranaires non spécifiques des progestagènes

Il existe d'autres récepteurs membranaires susceptibles d'avoir pour ligand les neurostéroïdes au sein du SNC, notamment le récepteur GABA_A et le récepteur NMDA (Figure 30, page 86). Ces récepteurs sont des canaux ioniques activés par des ligands aussi appelés récepteurs ionotropiques ou récepteurs-canaux ligand-dépendants (LGIC pour ligand-gated ion channels). Ce sont des protéines transmembranaires organisées autour d'un pore central qui permet un flux régulier d'ions à travers la membrane plasmique en réponse à la liaison d'un messenger chimique. Ces récepteurs jouent un rôle central dans la transmission synaptique rapide au sein du SNC. Ils traduisent les messages chimiques en réponses électriques, assurant ainsi la transmission de l'information d'un neurone à l'autre. Leur rôle dans la communication neuronale est lié à leur capacité à répondre très rapidement à la libération transitoire pré-synaptique de neurotransmetteurs qui activent alors les récepteurs canaux post-synaptiques (Smart & Paoletti, 2012). De cette activation naît un signal électrique rapide appelé potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) ou inhibiteur (PPSI). Cette conversion rapide de l'énergie chimique en énergie mécanique d'activation est essentielle à la neurotransmission au sein du SNC. Ces deux récepteurs-canaux sont constitués de multiples sous-unités qui s'assemblent pour former un récepteur entier fonctionnel. De nombreuses combinaisons entre ces sous-unités sont possibles, ce qui explique leur diversité et leurs propriétés fonctionnelles distinctes.

Le récepteur GABA_A

- Description

Les récepteurs GABA_A sont des récepteurs-canaux pentamériques. Ils sont nommés aussi récepteurs "cys-loop" en raison d'une boucle de treize acides-aminés entre deux cystéines liées par un pont disulfure au niveau de leur domaine extracellulaire de liaison au ligand (Miller & Smart, 2010). Cette boucle est essentielle à la communication entre les sites de liaison des ligands et le canal ionique membranaire. Ce sont des hétéro-pentamères formés de 5 sous-unités formant un canal préférentiellement perméable aux ions chlorures (Connolly & Wafford, 2004) qui peut être ouvert ou fermé. On dénombre aujourd'hui 19 sous-unités regroupées, en fonction des homologies de séquence, en sous-famille α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ et ρ 1-3 (Barnard *et al.*, 1998, Sarto-Jackson & Sieghart, 2008). La majorité des récepteurs GABA_A comprennent les sous-unités α , β et γ avec une stœchiométrie de 2:2:1 (Belelli *et al.*, 2002). Bien que différentes, ces sous-unités du récepteur GABA_A partagent une structure commune i.e. un grand domaine extracellulaire, quatre domaines transmembranaires hautement conservés et un domaine intracellulaire. Cette grande diversité de sous-unités se co-assemble pour générer l'expression de 20 à 30 isoformes distinctes du récepteur GABA_A dans le SNC, avec un profil d'expression,

des propriétés biophysiques et pharmacologiques et une distribution distincte, témoignant ainsi de la complexité et de la multiplicité des mécanismes inhérents à ce récepteur et la diversité de ses effets biologiques (Wisden *et al.*, 1992, Connolly *et al.*, 1996, Pirker *et al.*, 2000, Sieghart & Sperk, 2002, Waldvogel & Faull, 2015).

- **Mécanismes d'action**

Le site de liaison de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), son principal ligand, est situé à l'interface entre les sous-unités α et β (Connolly & Wafford, 2004, Sieghart *et al.*, 2012). Le GABA est synthétisé dans l'encéphale à partir du glutamate via l'action de l'acide glutamique décarboxylase, enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate permettant de former le GABA (Erlander *et al.*, 1991). Les effets du GABA sont médiés par deux classes de récepteurs GABA i.e. des récepteurs métabotropiques, GABA_B et des canaux ioniques perméables aux ions chlorures, GABA_c et celui qui nous intéresse GABA_A (Benarroch, 2012, Comenencia-Ortiz *et al.*, 2014). La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel de GABA_A permettant ainsi une entrée ou une sortie d'ions Cl⁻ en fonction du gradient électrochimique de cet ion. Le gradient électrochimique de Cl⁻ est généré et maintenu principalement par deux co-transporteurs, NKCC1 (fait entrer dans la cellule deux ions Cl⁻, un ion Na⁺ et un ion K⁺) et KCC2 (fait sortir de la cellule un ion Cl⁻ en même temps qu'un ion K⁺) (Ben-Ari *et al.*, 2012, Braat & Kooy, 2015). Le niveau relatif d'expression de ces deux co-transporteurs 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⁻. Le gradient électrochimique allant dans le sens d'une sortie de Cl⁻, les récepteurs GABA_A sont principalement dépolarisants. Avec le développement, le niveau d'expression entre NKCC1 et KCC2 s'inverse, reversant ainsi le gradient électrochimique de Cl⁻. Le gradient électrochimique allant dans le sens d'une entrée de Cl⁻, les récepteurs GABA_A sont hyperpolarisants (Ben-Ari *et al.*, 2012). Ainsi, ils sont responsables d'une proportion importante des inhibitions synaptiques rapides du SNC.

En plus du site de fixation au GABA localisé à l'interface des sous-unités α et β (Sieghart *et al.*, 2012), ce complexe macromoléculaire GABA_A comporte des sites de fixation à une variété de molécules thérapeutiques comme les benzodiazépines, les barbituriques, les anesthésiques généraux, certains anti-convulsionnants et quelques stéroïdes comme l'alloprégnanolone, métabolite de la progestérone (Frolund *et al.*, 2002, Whiting, 2003, Braat & Kooy, 2015, Knoflach *et al.*, 2016). En effet, une particularité du récepteur GABA_A est qu'il peut être modulé allostériquement par ces molécules qui accentuent ou diminuent l'effet du GABA sur le récepteur GABA_A mais sont sans effet en absence de GABA (Figure 31).

Modulations allostériques des neurostéroïdes sur les récepteurs GABA_A

Les sites de fixation des neurostéroïdes leur permettant de moduler allostériquement le récepteur GABA_A sont localisés au niveau du domaine transmembranaire hautement conservé de la sous-unité α (Hosie *et al.*, 2006). Les neurostéroïdes sont des modulateurs allostériques positifs ou négatifs, au sens où ils accentuent ou diminuent l'effet de GABA sur GABA_A respectivement (Figure 31) (Harrison & Simmonds, 1984, Lambert *et al.*, 1995, Lambert *et al.*, 2001, Belelli *et al.*, 2002).

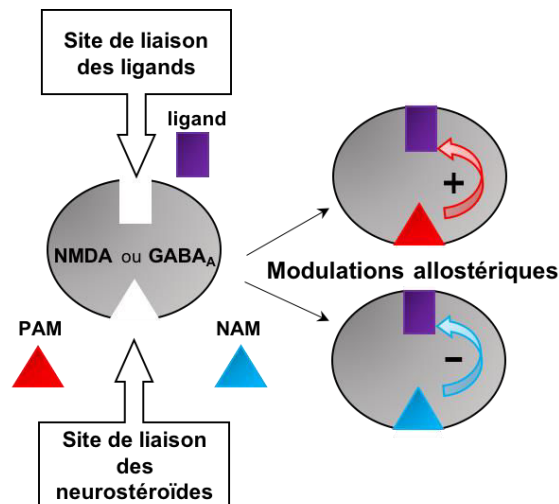


Figure 31 : Mode de liaison et effets des modulateurs allostériques sur les récepteurs GABA_A et NMDA

Les sites de liaison des ligands et des modulateurs allostériques sur les récepteurs GABA_A et NMDA sont distincts. Les modulateurs allostériques peuvent être positifs (PAM) ou négatifs (NAM) lorsqu'ils accentuent ou diminuent respectivement l'effet du ligand sur le récepteur. PAM: modulateur allostérique positif; NAM: modulateur allostérique négatif. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

La littérature a décrit des modulateurs positifs comme la pregnenolone ou l'allopregnenolone (Figure 32) (Majewska *et al.*, 1986, Ren & Greer, 2006a). Ces derniers ne modifieraient pas la conductance du canal mais prolongeraient son temps d'ouverture (Callachan *et al.*, 1987, Cottrell *et al.*, 1987). Il semblerait que le stradiolisme de la potentialisation exercé par les neurostéroïdes en tant que modulateur positif sur les récepteurs GABA_A fasse intervenir à la fois une augmentation de la fréquence et la durée d'ouverture des canaux (Figure 33) (Macdonald & Olsen, 1994, Carver & Reddy, 2013).

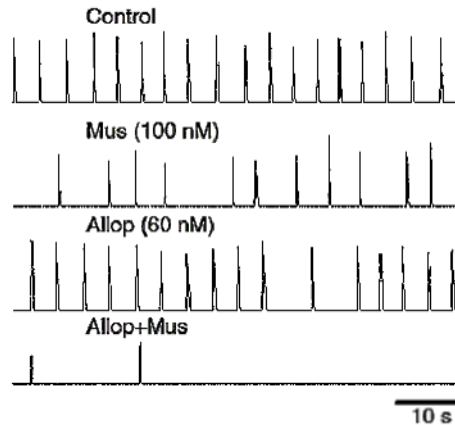


Figure 32 : Effet de l'allopregnanolone sur la fréquence respiratoire de préparations *ex vivo* de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés

Tracés électrophysiologiques représentant l'activité intégrée de la racine cervicale ventrale C4 lors d'une administration d'allopregnanolone (Allop) en absence et en présence de muscimol (agoniste des récepteurs GABA_A, Mus). L'Allop est un modulateur allostérique positif du récepteur GABA_A. D'après (Ren & Greer, 2006b)

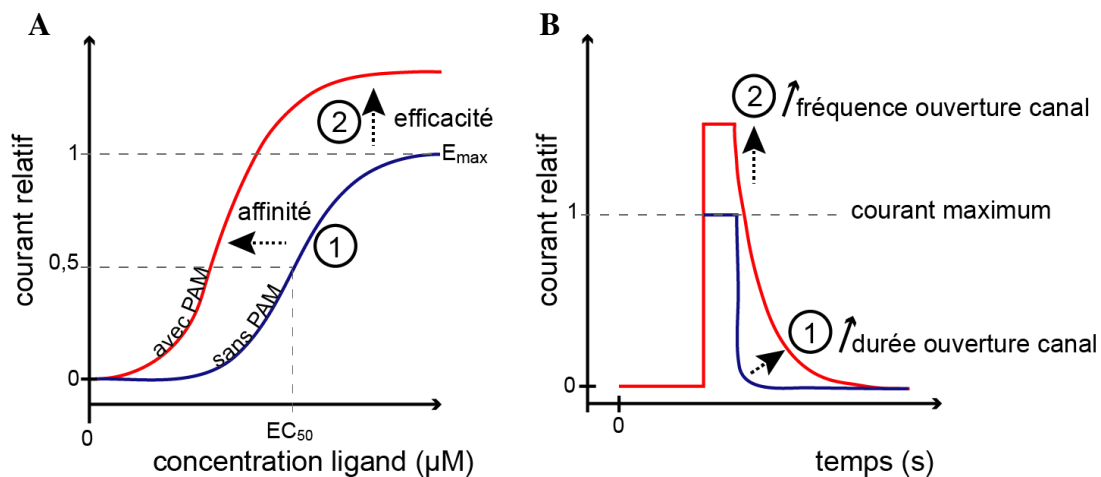
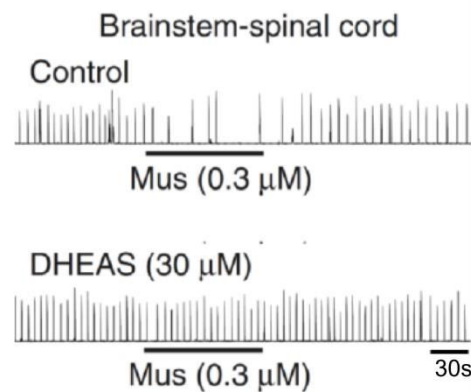


Figure 33 : Différents types d'effets allostériques positifs des neurostéroïdes sur les récepteurs NMDA et GABA_A

A. Les modulateurs allostériques modifient l'efficacité et/ou l'affinité des agonistes et donc régulent l'activité de ces derniers. La direction de la modulation peut être positive ou négative et est obtenue en stabilisant différentes conformations du récepteur. Dans le cas d'un neurostéroïde modulateur allostérique positif (PAM), l'effet de type 1 déplace l' EC_{50} de l'agoniste vers des valeurs inférieures et donc augmente son affinité pour le récepteur. L'effet de type 2 augmente l' E_{max} de l'agoniste sans modifier son EC_{50} et donc augmente son efficacité sur le récepteur **B.** L'effet de type 1 peut se traduire par un ralentissement de la cinétique de désactivation, c'est-à-dire l'affinité augmentée de l'agoniste prolonge la durée d'ouverture du canal. L'effet de type 2 augmente le courant maximum du récepteur. Les neurostéroïdes PAM ont généralement des effets mixtes de type 1 et 2 observés sur les récepteurs GABA_A et NMDA (Hackos & Hanson, 2017) et (Carver & Reddy, 2013). Le courant total simulé d'un récepteur est représenté par un courant relatif normalisé au courant à saturation de l'agoniste en l'absence de PAM. EC_{50} : concentration efficace moyenne de l'agoniste ; E_{max} : concentration efficace maximale de l'agoniste. Adaptée d'après (Hackos & Hanson, 2017).

Des modulateurs négatifs ont également été décrits, comme la pregnenolone sulfate ou encore la déhydroépiandrostérone sulfate (Figure 34) (Majewska & Schwartz, 1987, Majewska *et al.*, 1990, Majewska, 1992, Ren & Greer, 2006a), 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). Il semblerait qu'en se basant sur la structure chimique des stéroïdes, il est possible de prédire l'effet potentiel de ces derniers sur le récepteur GABA_A (Park-Chung *et al.*, 1999). Le groupement sulfate ou une charge négative en position C3 semblent conférer la propriété de modulateur négatif alors qu'un groupement hydroxyle ou cétone en C3 ainsi qu'un groupement acétyle en C17 confèrent la propriété de modulateur positif (Park-Chung *et al.*, 1999).

Figure 34 : Effet du déhydroépiandrostérone sulfate 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 de muscimol (agoniste des récepteurs GABA_A, Mus) en absence et en présence de déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS). Le DHEAS est un modulateur allostérique négatif des récepteurs GABA_A. D'après (Ren & Greer, 2006b)

La régulation allostérique du récepteur GABA_A par les neurostéroïdes semble dépendre de la composition du récepteur GABA_A en sous-unité. En effet, des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur l'ovocyte de xénope ont mis en évidence que l'effet modulateur de l'alloprégnanolone sur GABA_A 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 δ , $\alpha 1$, $\alpha 3$ confèrent aux récepteurs GABA_A une plus grande sensibilité à la modulation allostérique par l'alloprégnanolone, que la sous-unité β n'aurait pas d'influence, tandis que la présence de sous-unité ϵ semble le rendre insensible à cette modulation (Davies *et al.*, 1997, Belelli *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2002, Wohlfarth *et al.*, 2002, Belelli & Lambert, 2005). De plus, la régulation allostérique du récepteur GABA_A par les neurostéroïdes pourrait aussi dépendre de leur concentration. En effet, les réponses évoquées, médiées par les isoformes contenant les sous-unités $\alpha 1$ ou $\alpha 3$, semblent être renforcées par de faibles concentrations d'alloprégnanolone alors que les récepteurs équivalents qui incorporent les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ nécessitent des concentrations 3 à 10 fois plus grandes (Belelli *et al.*, 2002). La sensibilité de ces récepteurs aux stéroïdes diffère donc selon la concentration de ces derniers.

Par ailleurs, des modifications du niveau d'expression des sous-unités $\alpha 4$, $\beta 1$ et δ ont été corrélées à des fluctuations de la concentration d'allopregnanolone et de progestérone respectivement, suggérant que les neurostéroïdes pourraient moduler l'expression des sous-unités des récepteurs GABA_A et ainsi moduler la transmission GABA_Aergique (Gulinello *et al.*, 2001, Griffiths & Lovick, 2005, Maguire & Mody, 2009). L'état de phosphorylation du récepteur GABA_A est un autre mécanisme de régulation supplémentaire influençant l'effet de GABA sur le récepteur GABA_A (Lambert *et al.*, 2001). Les effets de la phosphorylation sur la fonction du récepteur GABA_A dépendent de l'isoforme, de la sous-unité, des résidus d'acides-aminés phosphorylés ainsi que des kinases ou des phosphatases mises en jeu (Belelli & Lambert, 2005, Song & Messing, 2005). Dans certains neurones, l'impact des stéroïdes sur l'activité du récepteur GABA_A 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_A (Koksma *et al.*, 2003, Harney *et al.*, 2003). Il semble que l'isoforme PKC ϵ soit impliquée dans la modulation du récepteur GABA_A par certains neurostéroïdes (Hodge *et al.*, 1999, Hodge *et al.*, 2002, Song & Messing, 2005).

- Localisation des récepteurs GABA_A au sein du SNC

Les récepteurs GABA_A sont largement distribués dans le SNC, localisés dans le système limbique, le cervelet, le tronc cérébral, et les noyaux gris centraux (Hortnagl *et al.*, 2013). Une grande part des neurones a des récepteurs GABA_A. Ils peuvent donc être inhibés, du moins chez l'adulte. Il existe une grande hétérogénéité dans la distribution des sous-unités du récepteur GABA_A. La composition en sous-unités du récepteur GABA_A contribue à la détermination de son ciblage subcellulaire (Fritschy & Mohler, 1995, Connolly *et al.*, 1996). De fait, les récepteurs GABA_A composés des sous-unités $\alpha 1-3$, $\beta 1-3$ et $\gamma 2$ sont essentiellement situés au niveau de sites synaptiques (Rudolph & Mohler, 2006) alors que les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4-6$, $\beta 2-3$ et δ sont principalement localisés au niveau de sites extrasynaptiques (Farrant & Nusser, 2005, Chandra *et al.*, 2006, Zheleznova *et al.*, 2009).

Les récepteurs NMDA

- Description

Les récepteurs NMDA sont appelés ainsi parce qu'ils sont activés par le N-méthyl-D-Aspartate, agoniste de synthèse (Watkins & Evans, 1981). Ce sont des récepteurs-canaux du glutamate (iGluR) codés par sept gènes (GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B) (Mayer, 2006, Mayer, 2016). Ce sont des hétéro-tétramères formés de quatre sous-unités arrangées autour d'un unique pore central, le canal ionique perméable aux ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. Ces hétéromères sont composés le plus souvent de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004, Paoletti & Neyton, 2007, Paoletti, 2011, Paoletti *et al.*, 2013). La sous-unité GluN1 est obligatoire pour obtenir des récepteurs fonctionnels, elle est exprimée de

façon ubiquitaire dans le SNC, qu'il soit embryonnaire ou adulte (Akazawa *et al.*, 1994). Cependant, on observe certaines variations selon le variant d'épissage, en fonction du stade de développement et de la localisation dans le SNC. Effectivement, la composition en sous-unité change pendant le développement et peut être régulée différemment dans différentes zones de l'encéphale. Par exemple, les sous-unités GluN2B et GluN2D sont principalement exprimées dans l'encéphale du rat nouveau-né, principalement dans le mésencéphale pour GluN2D et abondamment dans le cortex, le thalamus et la moelle épinière pour GluN2B. Elles sont ensuite remplacées au cours du développement par la sous-unité GluN2A et dans certaines régions par GluN2C (Watanabe *et al.*, 1993, Akazawa *et al.*, 1994, Monyer *et al.*, 1994, Cull-Candy *et al.*, 2001, Paoletti, 2011). Les sous-unités GluN2A sont principalement localisées au niveau des synapses et les sous-unités GluN2B au niveau des régions extra-synaptiques (Thomas *et al.*, 2006). Toutes les sous-unités adoptent une même architecture modulaire (Mayer, 2006, Mayer, 2016, Wollmuth & Sobolevsky, 2004) avec une extrémité C-terminale intracellulaire impliquée dans le trafic et l'ancrage des récepteurs à la synapse, une partie transmembranaire constituée de quatre domaines transmembranaires formant le canal ionique et enfin une extrémité N-terminale extracellulaire formée par le domaine de liaison des agonistes et des co-agonistes (Paoletti, 2011). La sous-unité GluN2 contient le site de liaison au glutamate tandis que GluN1 et GluN3 contiennent le site de liaison à la glycine ou la D-sérine, les co-agonistes. En effet, les récepteurs NMDA possèdent la propriété unique de devoir lier non seulement le glutamate mais aussi un co-agoniste, la glycine ou la D-sérine, pour être activés. Ainsi, des variations de la concentration locale de co-agonistes peuvent moduler les réponses NMDA. Par exemple, l'activité des récepteurs NMDA peut être régulée par les astrocytes qui peuvent synthétiser et libérer de la D-sérine (Panatier *et al.*, 2006). L'existence d'un tel répertoire de sous-unités permet de nombreuses combinaisons au sein d'un complexe récepteur tétramérique et est à l'origine de multiples populations de récepteurs NMDA fonctionnellement distinctes.

- Mécanismes d'action

L'activation des récepteurs NMDA requiert la présence de deux agonistes, le glutamate et la glycine (ou la D-sérine). De plus, ils ne peuvent s'activer qu'après dépolarisation de la membrane, afin de relever le blocage exercé par les ions Mg^{2+} extracellulaires sur le canal (Dingledine *et al.*, 1999). En effet, des concentrations physiologiques de Mg^{2+} dans le milieu extracellulaire bloquent l'activation des récepteurs NMDA au potentiel de repos des neurones qui est négatif. Ainsi, à -60 mV, le blocage est quasi-total, alors qu'il est inexistant aux potentiels dépolarisés, c'est-à-dire lorsque le potentiel membranaire devient positif. La nécessité de ces deux conditions simultanées confère aux récepteurs NMDA le rôle de détecteurs de coïncidences capables d'intégration synaptique entre éléments pré- et post-synaptiques. De fait, pour qu'il y ait activation des récepteurs NMDA post-synaptiques, il faut que les éléments pré-synaptiques libèrent du glutamate, et donc qu'ils soient dépolarisés, puis que les éléments post-synaptiques aussi soient dépolarisés pour lever le blocage par les ions

Mg²⁺. Dans le cas où ceci intervient alors que le glutamate est encore lié aux récepteurs NMDA, les ions perméants Ca²⁺ et Na⁺, K⁺ peuvent alors transiter au travers de leur canal ionique. La forte perméabilité calcique des récepteurs NMDA provoque alors un influx de Ca²⁺ intracellulaire, messenger extrêmement important qui active une cascade typique de réactions biochimiques dont les effets peuvent être multiples et qui conduiront essentiellement à l'augmentation prolongée de l'efficacité de cette synapse permettant l'initiation de diverses formes de plasticité essentielles aux phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Bliss & Collingridge, 1993, Dingledine et al., 1999, Sheng & Kim, 2002, Hackos & Hanson, 2017). Les récepteurs NMDA sont les principaux responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le SNC (Traynelis *et al.*, 2010). En effet, leurs cinétiques d'activation sont assez rapides pour répondre à une libération brève de glutamate dans la fente synaptique. Néanmoins, les récepteurs NMDA présentent une cinétique bien plus lente que les deux autres récepteurs au glutamate (récepteurs kaïnates sélectivement activés par l'acide kaïnique et récepteurs AMPA sélectivement activés par le (S)- α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique). Cette lenteur reflète un temps de résidence élevé du glutamate sur les récepteurs NMDA qui est dû au blocage des ions Mg²⁺. Cela permet aux récepteurs NMDA de jouer ce rôle de détecteur de coïncidence entre excitation des éléments pré- et post-synaptiques et en fait des éléments clé dans la plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme, la dépression à long terme, la formation de la mémoire et l'apprentissage (Bliss & Collingridge, 1993, Dingledine et al., 1999, Sheng & Kim, 2002, Hackos & Hanson, 2017).

Enfin, leur activité est sujette à de multiples modulations induites par des molécules, présentes de façon endogène ou exogènes dans le SNC, agissant sur le récepteur comme des modulateurs allostériques. Les propriétés du récepteur NMDA, de même que sa sensibilité aux agonistes, sa conductance unitaire et sa probabilité d'ouverture sont très variables selon les sous-unités qui le composent, le type de sous-unité GluN2 incorporée étant la principale source de cette diversité fonctionnelle (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004, Paoletti & Neyton, 2007, Paoletti et al., 2013). L'activité des récepteurs NMDA peut être donc modulée soit positivement soit négativement par des petites molécules et ions dont le site de liaison est différent des domaines de liaison des agonistes ou co-agonistes et du canal ionique (Mony *et al.*, 2009, Traynelis et al., 2010). De ce fait, leurs mécanismes d'action ne font pas appel à un processus d'inhibition compétitive avec un agoniste ni à un blocage du canal ionique. Les modulateurs allostériques peuvent agir au niveau du canal ionique, en modulant la probabilité ou le temps d'ouverture, et sur l'affinité des récepteurs pour l'agoniste (Hackos & Hanson, 2017). Ces modulateurs, dits allostériques, peuvent être endogènes dans le SNC comme les protons (Traynelis & Cull-Candy, 1990, Legendre & Westbrook, 1990, Traynelis et al., 2010) et le zinc (Mayer & Westbrook, 1987, Traynelis et al., 2010), principaux inhibiteurs allostériques ainsi que les neurostéroïdes (Traynelis et al., 2010, Korinek *et al.*, 2011). Ils peuvent également être exogènes, comme c'est le cas pour les neurostéroïdes synthétiques (Kussius *et al.*, 2009, Korinek et al., 2011). Ils ont été identifiés comme modulateurs allostériques positifs (Wu *et al.*,

1991) mais aussi comme modulateurs allostériques négatifs des récepteurs NMDA (Figure 31, page 93) (Park-Chung *et al.*, 1994).

Modulations allostériques du récepteur NMDA par des neurostéroïdes

La prégnénolone 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 en tant que modulateur allostérique 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 (Figure 33, page 94) (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 au 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).

Le degré de modulation de PS sur le récepteur NMDA semble être influencé par la composition en sous-unité de ce dernier (Horak *et al.*, 2006). En effet, 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). Cependant les dérivés oxystérol du cholestérol, une autre classe de neurostéroïdes, ont été décrits comme modulant positivement les récepteurs NMDA indépendamment des sous-unités qui le composent (Paul *et al.*, 2013, Linsenbardt *et al.*, 2014).

En enregistrant l'activité du récepteur NMDA sur des cultures de neurones de moelle épinière, des auteurs ont montré qu'une application de prégnanolone sulfate, un analogue de la prégnénolone sulfate (PS), entraînait une diminution du courant passant à travers le récepteur/canal. Le mécanisme qui sous-tend cet effet semble être une modulation allostérique négative 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). 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 entraîne 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 comme pour la PS que l'effet de la prégnanolone 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 voire quasiment

inexistante quand le récepteur contient respectivement les sous-unités GluN2A et GluN2B et GluN1A et GluN1B (Petrovic et al., 2005).

La modulation allostérique antonyme du récepteur NMDA par ces stéroïdes semble être liée à la présence d'un groupe chargé sur le carbone C3 du noyau stérane (Park-Chung *et al.*, 1997). Selon 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 prégnanolone sulfate et la prégnénolone sulfate, qui diffèrent par la présence d'une double liaison et par la configuration du carbone C3, vont avoir des effets opposés sur le récepteur NMDA. La structure des stéroïdes semble conditionner leur fonction en tant que modulateur allostérique positif ou négatif et donc leur effet sur le récepteur NMDA (Weaver et al., 2000, Stastna *et al.*, 2009).

- Localisation des récepteurs NMDA

Ils sont exprimés dans différentes structures respiratoires du tronc cérébral comme le NTS ventro-latéral et médian (Guthmann & Herbert, 1999, Liu & Wong-Riley, 2010), le noyau ambigu, le noyau de l'hypoglosse (Liu & Wong-Riley, 2010), les noyaux des RPa et ROb (Haghparast *et al.*, 2007, Sluka *et al.*, 2012) et au niveau du préBötC (dans 50 à 80% des neurones) (Liu & Wong-Riley, 2010). Au niveau supra-bulbaire, ils sont exprimés dans le PB, le KF (Guthmann & Herbert, 1999), l'aire hypothalamique latérale (Landeira-Fernandez, 2015) et ventro-médiane (Resch *et al.*, 2014). Les récepteurs NMDA sont principalement localisés au niveau de la membrane post-synaptique mais peuvent être retrouvés au niveau présynaptique, extrasynaptique et au niveau des cellules gliales (Blanke & VanDongen, 2009).

4. La progestérone, les progestatifs et la ventilation

Les conclusions de nombreuses études amènent à considérer que les progestagènes stimulent la ventilation au repos et potentialisent la réponse ventilatoire à l'hypercapnie en passant par une action sur le SNC.

a. Effet des progestagènes sur la ventilation basale

- Observations

Dès 1905, Fitzgerald et Haldane (Fitzgerald & Haldane, 1905) ont révélé que la PaCO₂ était plus faible chez les femmes que chez les hommes. Par la suite, d'autres études ont mis en évidence ce même dimorphisme sexuel au niveau de la ventilation basale en montrant que les femmes présentaient une plus grande ventilation minute associée à une PaCO₂ plus faible que les hommes (Haywood & Bloete, 1969, Patrick & Howard, 1972, White *et al.*, 1983, Dempsey *et al.*, 1986, Saaresranta & Polo, 2002). Certaines études indiquent une diminution de la PaCO₂ au cours de la grossesse, période caractérisée par la présence de forte concentration plasmatique

en progestérone (Hasselbach, 1912, Hasselbach & Gammeltoft, 1915). Ces observations sont étayées par d'autres études qui ont établi un lien entre la concentration plasmatique en progestérone élevée et l'hyperventilation au cours de la grossesse (Jensen *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont décrit une variation de la ventilation au cours du cycle ovarien de la femme. En effet, une hyperventilation associée à une diminution de la PaCO₂ est présente pendant la phase lutéale comparée à la phase folliculaire du cycle ovarien (England & Farhi, 1976, Goodland & Pommerenke, 1952, da Silva *et al.*, 2006, Slatkovska *et al.*, 2006), phénomène disparaissant avec la ménopause car il n'y a plus de phase lutéale et folliculaire (Griffith *et al.*, 1929). Cette variation de la ventilation au cours du cycle ovarien a par la suite été corrélée à la concentration plasmatique en progestérone, élevée lors de la phase lutéale et faible durant la phase folliculaire (Dempsey *et al.*, 1986, Bayliss *et al.*, 1987, Tatsumi, 1999).

L'augmentation de la ventilation associée à une diminution de la PaCO₂ chez les femmes, survenant pendant la grossesse ou au cours de la phase lutéale du cycle ovarien en corrélation avec une élévation de la concentration plasmatique de progestérone, suggère l'implication de cette hormone dans la régulation de la ventilation au moins dans l'hyperventilation hypercapnique.

Des études réalisées chez l'Homme ont montré que le medroxyprogestérone acétate (progestatif de la famille des pregnanes) seul ou associé avec de l'œstrogène, augmente la \dot{V}_E et diminue la PaCO₂ chez des femmes ménopausées (Regensteiner *et al.*, 1989) ou encore chez des hommes sains (Skatrud *et al.*, 1978a, Zwillich *et al.*, 1978). L'administration d'un progestatif semble donc entraîner une élévation de la ventilation associée à une diminution de la PaCO₂ similaire à celle observée lors de la grossesse ou au cours de la phase lutéale, confirmant l'implication de la progestérone dans la ventilation basale.

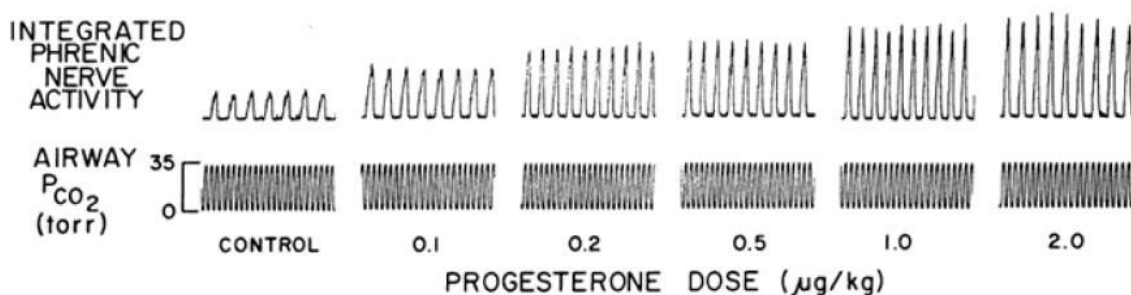
- Action des progestagènes

Les mécanismes d'actions par lesquels la progestérone influence la ventilation demeurent encore aujourd'hui assez mal connus. En étudiant l'effet ventilatoire de la progestérone et des progestatifs sur des modèles animaux et sachant la distribution des récepteurs capables de médier leurs effets au niveau central (Shughrue & Merchenthaler, 2001, Brinton *et al.*, 2008) mais aussi au niveau périphérique (Joseph *et al.*, 2006), il a été possible de mettre en évidence quelques voies d'action. Les progestagènes pourraient agir via un effet direct sur les structures génératrices du rythme respiratoire ou encore sur les structures qui modulent le rythme respiratoire au niveau central ou périphérique.

L'effet d'une administration intraveineuse de doses croissantes de progestérone sur l'activité du nerf phrénique chez le chat anesthésié et chémodénervé a été rapporté en 1987 par Bayliss et collaborateurs (Bayliss *et al.*, 1987). La progestérone a entraîné une augmentation dose-dépendante de la fréquence et de l'amplitude des décharges du nerf phrénique (Figure 35). Cet effet a été aboli par un pré-traitement avec un antagoniste des récepteurs nucléaires à la progestérone, le RU-486. De plus, une injection de progestérone dans le NTS a induit une

augmentation de l'activité du nerf phrénique. Ces résultats suggèrent que la progestérone, en agissant par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires, facilite la CCR et que cet effet stimulant de la ventilation passe par des mécanismes centraux faisant intervenir le NTS. Quelques années plus tard, la même équipe a publié une étude montrant, chez des chattes ovariectomisées et pré-traitées à l'oestradiol, que l'effet facilitateur de l'administration de progestérone sur l'activité du nerf phrénique était fortement diminué en cas d'ablation des structures rostrales au tronc cérébral (Bayliss *et al.*, 1990). Les auteurs posent alors l'hypothèse que les structures diencephaliques pourraient médier les effets facilitateurs de la progestérone sur la CCR. De plus, en montrant qu'une partie de ces effets était diminuée en cas de pré-traitement avec respectivement de l'anisomycin et de l'actinomycine-D, des bloquants de la synthèse protéique et des ARNm, les auteurs suggèrent une fois encore l'implication des récepteurs nucléaires à la progestérone (Bayliss *et al.*, 1990). Chez le cochon d'inde, une administration chronique de progestérone induit une hyperventilation qui est associée à une diminution de la PaCO₂ (Hosenpud *et al.*, 1983) et cet effet est amélioré en présence d'œstrogène. 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 PaCO₂, alors que l'administration de TZP4238 ou d'œstradiol seul n'a pas d'effet sur la ventilation (Tatsumi *et al.*, 1991). L'œstrogène est un médiateur des récepteurs de la progestérone. Il augmente le nombre et la sensibilité des récepteurs de la progestérone. En effet, les œstrogènes sont capables d'induire la synthèse et l'expression des récepteurs de la progestérone (Ing & Tornesi, 1997).

Figure 35 : Effet d'une administration intraveineuse de doses croissantes de progestérone sur l'activité du nerf phrénique chez le chat adulte



L'effet de la progestérone sur l'activité intégrée du nerf phrénique a été déterminé par l'administration intraveineuse de dose croissante de progestérone. La PCO₂ est maintenue à 32 Pa. D'après (Bayliss *et al.*, 1987).

Peu d'études ont étudié l'impact des hormones sexuelles sur les corps carotidiens. En 1989, une étude a rapporté une augmentation de l'activité du nerf du sinus carotidien en réponse à une élévation chronique de progestérone et d'œstrogène chez le chat, suggérant que les corps carotidiens pouvaient être sensibles à ces deux hormones stéroïdiennes circulantes (Hannhart *et al.*, 1989). Plus récemment, une étude a montré que la réponse à l'hypoxie *in vitro* des corps carotidiens est altérée en présence d'un antagoniste des récepteurs nucléaires à la progestérone,

la mifeprestone. Pour autant, ces effets ne semblent pas se traduire *in vivo* dans la mesure où la réponse respiratoire est équivalente avec ou sans traitement (Joseph *et al.*, 2012). 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 (P450_{scc}) (Joseph *et al.*, 2006), soulignent l'intérêt de mieux comprendre l'action de la progestérone sur les chémorécepteurs périphériques.

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 & Wenninger, 2008).

b. Effet des progestagènes sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

- Observations

Une étude a montré un abaissement de la valeur seuil de PaCO₂, valeur à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation, chez la femme par rapport à l'homme (Macnutt *et al.*, 2012). Mais le dimorphisme sexuel dans la réponse respiratoire à l'hypercapnie reste parfois assez contradictoire selon les études. Des études évaluant la réponse respiratoire au CO₂/H⁺ pendant la grossesse (Figure 36) (Jensen *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2007) ont montré que les femmes présentaient à la fois un abaissement de la valeur seuil de PaCO₂, déclenchant l'hyperventilation et une augmentation de la sensibilité du chémoréflexe ventilatoire. En comparant la réponse au CO₂/H⁺ chez des femmes pré- et post-ménopausée, une étude met en évidence une meilleure réponse au CO₂/H⁺ chez les femmes pré-ménopausées en corrélation directe avec leur concentration plasmatique en hormones sexuelles féminines plus importante que celles des femmes post-ménopausées (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 la femme ménopausée (Regensteiner *et al.*, 1989) et chez l'homme (Skatrud *et al.*, 1978b, Zwillich *et al.*, 1978, Saaresranta *et al.*, 1999, Saaresranta *et al.*, 2005). L'administration d'un progestatif semble donc avoir un effet similaire à la progestérone au cours de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

L'ensemble de ces études révèle le caractère potentialisateur des progestagènes sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

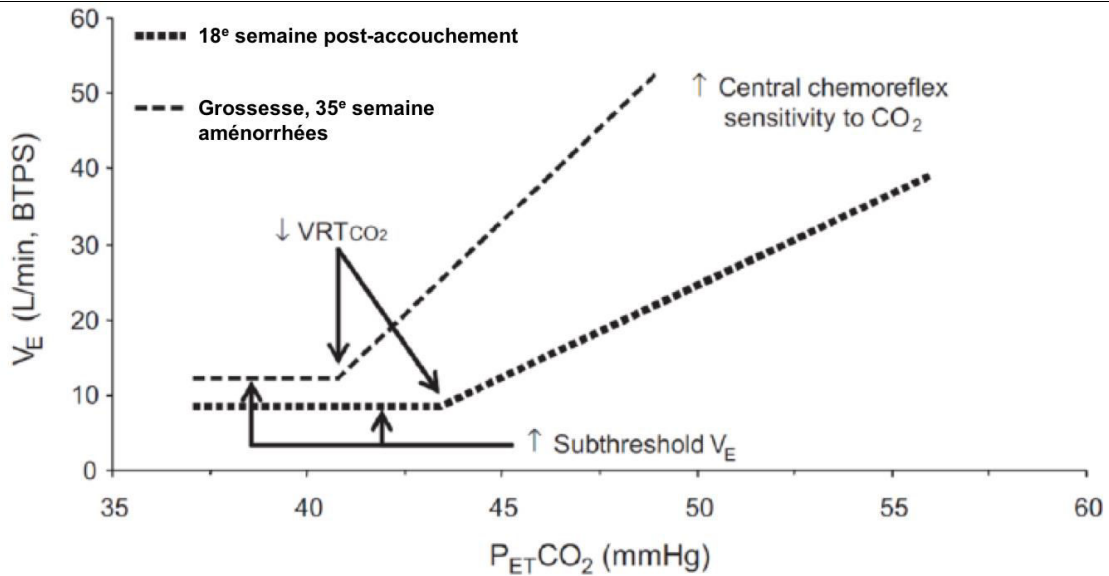


Figure 36 : Représentation de la \dot{V}_E en fonction de la $P_{ET}CO_2$ chez une femme pendant et après sa grossesse

Pendant la grossesse, une augmentation de la ventilation minute de base (Subthreshold \dot{V}_E), une diminution de la valeur seuil de $PaCO_2$ à partir de laquelle on observe une augmentation de la ventilation (VRT_{CO_2}) ainsi qu'une augmentation de la sensibilité du chémoréflexe ventilatoire sont observables par rapport la période post-accouchement. Adaptée d'après (Jensen et al., 2007).

- Action des progestagènes

Dans le but de décortiquer les mécanismes d'action sous-tendant l'effet de la progestérone sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, plusieurs études ont été réalisées chez l'animal. Dans l'étude de Bayliss et collaborateurs citée plus haut, les auteurs ont aussi évalué l'effet d'une administration de progestérone sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez le chat pré-traité à l'oestradiol en cas ou non d'une ablation des structures rostrales au tronc cérébral. Il est apparu que l'administration de progestérone augmente la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et que ce phénomène serait en grande partie médié par la présence du diencephale (Bayliss et al., 1990). Une autre étude a testé l'effet d'une exposition chronique à la progestérone sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez des souris femelles KO pour le gène codant les récepteurs nucléaires à la progestérone (Marcouiller *et al.*, 2014). Ces animaux ne présentent pas de potentialisation de la réponse respiratoire à l'hypercapnie après exposition chronique à la progestérone par rapport à leurs témoins.

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 récepteurs nucléaires à la progestérone.

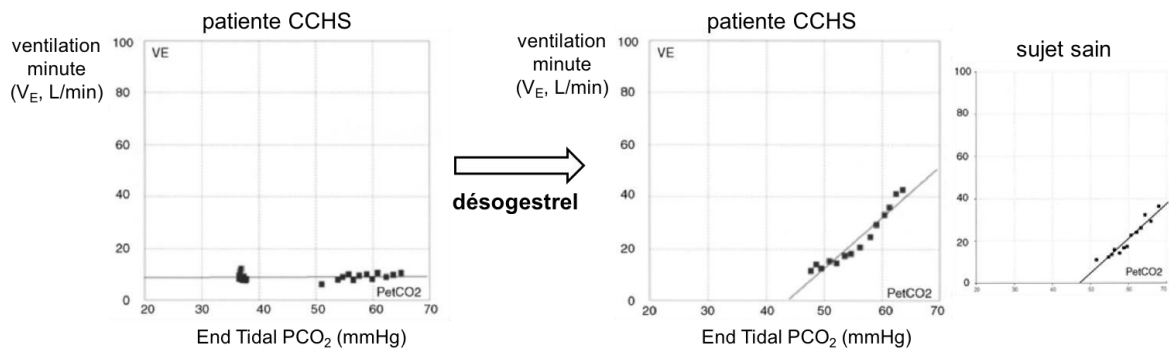
c. Pourquoi notre intérêt s'est-il porté sur un progestagène, le désogestrel ?

L'hypothèse selon laquelle la progestérone et les progestatifs exerceraient une influence facilitatrice sur la ventilation basale et potentialiseraient la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

et que ces effets seraient médiés par des mécanismes faisant intervenir le tronc cérébral et le l'hypothalamus, constitue une piste de recherche très intéressante et pertinente dans le cadre de pathologies avec atteintes respiratoires, notamment pour le traitement des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale. En 2003, une équipe a montré que des femmes ménopausées souffrant d'apnées du sommeil, recevant un traitement combiné d'œstrogène et de progestérone, présentaient une diminution significative du nombre d'épisodes apnéiques (Shahar *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). Chez des patients atteints de syndromes d'hypoventilation centrale, cet effet est plutôt controversé puisque certaines études ont mis en évidence un effet facilitateur de la médroxyprogestérone sur la réponse respiratoire à l'hypercapnie (Milerad *et al.*, 1985) alors que d'autres études ne montrent pas d'effet potentialisateur (Rapoport *et al.*, 1986, Sritippayawan *et al.*, 2002). Cette controverse souligne la nécessité de comprendre de manière plus affine les mécanismes d'action des progestagènes et fait ainsi valoir notre intérêt pour ces molécules dans l'objectif de développer une thérapeutique pour les CHS.

D'autres arguments en faveur du fait que les progestagènes pourraient constituer une cible thérapeutique résident dans une étude approfondie sur le désogestrel et la CCR (Joubert *et al.*, 2016) à laquelle j'ai participé, publiée au sein de l'UMR_S1158, un des laboratoires dans lequel ce travail de thèse a été réalisé. Celle-ci sera détaillée dans les résultats de ce manuscrit. Brièvement, il a été observé fortuitement chez deux patientes CCHS une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ concomitante à la prise d'un progestatif, le désogestrel (Figure 37).

Figure 37 : Réponse ventilatoire au CO_2 d'une patiente CCHS avant et pendant la prise



de désogestrel

Les graphiques représentent la ventilation minute (V_E) d'une patiente CCHS 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). La réponse ventilatoire au CO_2 observée chez la patiente CCHS sous désogestrel est similaire à celle d'un sujet sain (à l'extrême droite). Adaptée d'après (Straus *et al.*, 2010).

La première patiente CCHS a une mutation PARM 20/25 et lors de son intégration au centre de référence Ondine elle ne présentait aucune réponse respiratoire au CO_2/H^+ . Trois 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. 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 clinique¹ a été mise en place au sein de l'UMR_S11583 dans le but de tester l'effet du progestatif sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de patientes CCHS suivies au centre de référence. Les résultats préliminaires sont très hétérogènes i.e. certaines patientes présentent une récupération de la chémosensibilité tandis que d'autres semblent insensibles au progestatif. De plus, dans une autre équipe, le cas d'une patiente CCHS qui, placée sous désogestrel, ne présentait pas de récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ , a été relaté (Li *et al.*, 2013a). Ces résultats contradictoires avec les données observées chez les deux patientes présentées précédemment peuvent dépendre d'une variation inter-individuelle où la source de fluctuation de l'effet observé correspond donc aux individus (*e.g.* âge, mutations, idiosyncrasie pour le désogestrel) et/ou de l'action complexe du progestatif (Loiseau *et al.*, 2017).

Dans un tel contexte, un des objectifs a été de déterminer chez l'animal les modalités d'action des progestatifs tels que le désogestrel et ses métabolites biologiquement actifs sur la CCR.

II. Le système érythropoïétinergique

1. L'érythropoïétine

a. Description

En 1906, Paul Carnot et Clotilde Deflandre (Carnot & Deflandre, 1906) ont observé qu'une injection de sérum provenant de lapins subissant des saignées à des lapins n'en subissant pas provoquait la production de globules rouges aussi appelés érythrocytes, érythro du grec « eruthros » signifiant rouge (Jelkmann, 1986). Carnot et Deflandre ont postulé que cet effet pourrait être dû à la présence dans le sérum d'un facteur humoral hémotropique produit en

¹ 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 d'Explorations Fonctionnelles de la Respiration, de l'Exercice et de la Dyspnée à l'hôpital de La Pitié Salpêtrière et responsable de la branche adulte du centre de référence maladie rare pour le syndrome d'Ondine

réponse à un stimulus de saignement qu'ils nommèrent dès lors « hémopoïétine », hémopoï du grec « haïma », relatif au sang et poïétine du grec « poiein », signifiant fabriquer. Ce facteur sera renommé en 1948 « érythropoïétine » (Epo) par Bonsdorff et collaborateurs puisqu'il augmente spécifiquement la production des érythrocytes (Bonsdorff & Jalavisto, 1948). Ce terme est aujourd'hui communément utilisé. L'hypothèse de Carnot et de Flandre sera confirmée 45 ans plus tard grâce à une expérience de parabiose où la circulation sanguine est croisée entre deux rats (Reissmann, 1950), l'un maintenu en normoxie l'autre en hypoxie. Il s'ensuit une augmentation de l'érythropoïèse chez le rat placé en hypoxie mais également chez son partenaire placé en normoxie. Cela confirme ainsi l'existence d'un facteur humoral qui stimule l'érythropoïèse produit par le partenaire hypoxique qui a traversé la circulation parabiologique pour stimuler l'érythropoïèse chez le partenaire respirant de l'air normal (Reissmann, 1950). L'Epo est donc la principale hormone stimulant l'érythropoïèse, processus qui gouverne la production d'érythrocytes (Jelkmann, 1986). Dans les années 70, elle est isolée et purifiée à partir d'urines de patients anémiques (Miyake *et al.*, 1977). La réalisation de cette étape permet sa caractérisation génétique et structurale chez plusieurs espèces telles que le rat, la souris, le chien, le chat, le singe ou encore l'Homme (Wen *et al.*, 1993). Le gène codant pour l'Epo est localisé chez l'Homme sur le chromosome 7q22 (Law *et al.*, 1986). Hautement conservé entre les espèces, il présente une grande homologie de séquence avec celui du singe (92%), de la souris (80%) ou encore du rat (80%) (Jelkmann, 1992, Nagao *et al.*, 1992b, Wen *et al.*, 1993). Il code une protéine de 193 acides aminés parmi lesquels 27 résidus impliqués dans l'adressage sont clivés pour donner une protéine mature de 165 acides aminés (Lai *et al.*, 1986). Cette protéine mature subit une étape de glycosylation durant laquelle quatre chaînes de carbohydrates sont ajoutées, c'est-à-dire trois chaînes N-oligosaccharidiques liées aux résidus asparagine en position 24, 38 et 128 et une chaîne O-oligosaccharidique liée à une sérine en position 126. L'Epo est une glycoprotéine de 34kDa qui appartient à la famille des cytokines de type 1 (Lai *et al.*, 1986) dont 60% du poids moléculaire est représenté par les 165 acides aminés et 40% par les 4 chaînes de carbohydrates, groupements déterminants pour sa stabilité et sa demi-vie plasmatique (Lai *et al.*, 1986).

b. Synthèse périphérique et centrale

Un préalable essentiel à la synthèse d'Epo est qu'elle est étroitement liée au niveau d'O₂ dans le sang. En effet, la synthèse de l'Epo est stimulée lors d'une hypoxie, d'une anémie ou encore d'une hémorragie. C'est la régulation transcriptionnelle du gène de l'Epo qui régule la production d'Epo dans ses organes cibles. Il existe donc au niveau des cellules productrices d'Epo ou dans leur environnement immédiat, un système permettant de déceler les variations d'oxygène ; ce sont les facteurs de transcription activés lors d'hypoxie, dénommés HIF (hypoxia inducible factors), dont un en particulier, HIF-1. Ce facteur de transcription, induit par une hypoxie tissulaire, stimule la transcription du gène codant pour l'Epo (Wang & Semenza, 1993) qui contient en son promoteur une séquence nucléotidique appelée élément de

réponse à l'hypoxie (HRE). HIF-1, dont l'expression est ubiquitaire dans l'organisme, est un complexe hétéromérique composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β et dont l'activité biologique dépend des niveaux d'O₂ tissulaire. En condition normoxique, la sous-unité β est stable et ne présente pas de sensibilité aux changements des niveaux d'O₂. En revanche, la sous-unité α est instable et se trouve hydroxylée par une enzyme de la famille des prolyl-4-hydroxylases (PHDs) dont l'activité est O₂ dépendante. Cette étape d'hydroxylation entraîne sa reconnaissance et sa fixation par la protéine Von Hippel Lindeau (VHL). Ce complexe est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Ainsi, en normoxie, HIF-1 α possède une demi-vie plasmatique très courte rendant impossible sa liaison à la sous-unité β (Huang *et al.*, 1998, Hon *et al.*, 2002). En condition d'hypoxie, la diminution des niveaux d'O₂ empêche le processus d'hydroxylation de HIF-1 α . Ainsi elle devient stable, migre vers le noyau où elle se lie à HIF-1 β (Bunn *et al.*, 1998). Le complexe ainsi formé recrute d'autres partenaires, en particulier CBP/p300 (cyclic AMP response element (CREB) binding protein), et peut alors se fixer sur la séquence nucléotidique spécifique HRE située dans la région promotrice de gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie de l'O₂, dont celui codant pour l'Epo, et augmente ainsi sa transcription (Semenza *et al.*, 1991, Wang & Semenza, 1993, Wenger & Gassmann, 1997). Récemment, il a été mis en évidence que l'angiotensine II serait aussi un régulateur de la production d'Epo (Kim *et al.*, 2014b).

L'étude de la production d'Epo chez la souris a montré que les sites de production d'Epo changent au cours du développement de manière simultanée avec les sites de production d'érythrocytes. Chez la souris, dès le 8^{ème} jour de gestation (E8) et jusqu'au 11^{ème} (E11), l'Epo est synthétisée par les cellules de la crête neurale (Suzuki *et al.*, 2013). A partir de E11 et jusqu'à la naissance, la production d'Epo est assurée par les hépatocytes du foie (Obara *et al.*, 2008, Suzuki, 2015). A ce stade de développement embryonnaire, la production hépatique d'Epo est essentielle à l'érythropoïèse et au maintien de la vie *in utero* (Wu *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 1996). Enfin, après la naissance, même si une synthèse minoritaire par le foie subsiste (Zanjani *et al.*, 1981, Dame *et al.*, 1998), l'Epo est synthétisée au niveau des reins (Jacobson *et al.*, 1957, Suzuki *et al.*, 2011) par les cellules interstitielles de type fibroblaste dans le cortex et la médullaire externe, dénommées cellules rénales productrices d'Epo (REPC) (Suzuki *et al.*, 2007, Obara *et al.*, 2008, Yamazaki *et al.*, 2013, Souma *et al.*, 2015). L'Epo est également synthétisée, dans une moindre mesure, par d'autres organes tels que les poumons, le cœur, les muscles, les testicules, l'épithélium pigmentaire rétinien, la neurorétine et le SNC (Tan *et al.*, 1992, Fandrey & Bunn, 1993, Digicaylioglu *et al.*, 1995, Marti *et al.*, 1996, Baciu *et al.*, 2000, Ogilvie *et al.*, 2000, Hernandez *et al.*, 2006, Garcia-Ramirez *et al.*, 2008, Marzo *et al.*, 2008, Rundqvist *et al.*, 2009, Jelkmann, 2007, Miro-Murillo *et al.*, 2011). Ces autres régions de synthèse d'Epo mises en évidence font valoir d'autres fonctions non-érythropoïétiques de l'Epo au sein de l'organisme (Gassmann *et al.*, 2003). L'Epo est présente dans le SNC de plusieurs espèces telles que la souris, le rat, le singe et l'Homme (Marti *et al.*, 1996). Elle est synthétisée par les neurones et les astrocytes (Masuda *et al.*, 1994, Juul *et al.*, 1998, Bernaudin *et al.*, 2000,

Marti, 2004). De plus, plusieurs études tendent à montrer que l'Epo circulante puisse traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) mais en très petite quantité. Pour démonstration, seul 1% de l'Epo injectée en périphérie traverse la BHE (Brines *et al.*, 2000, Dame *et al.*, 2001, Xenocostas *et al.*, 2005, Brines & Cerami, 2005). Néanmoins, comme l'Epo est une molécule de grande taille avec une masse moléculaire de 34 kDa, cela semble peu probable et a par conséquent été remis en question (Boado *et al.*, 2010).

c. Principaux effets biologiques

L'Epo assure quotidiennement le renouvellement de deux milliards de globules rouges, c'est sa fonction première (Jelkmann, 2013). En effet, l'Epo contrôle le processus de l'érythropoïèse qui assure la production et la maturation des lignées cellulaires, dérivant de cellules souches hématopoïétiques, qui donnent les érythrocytes (Koury & Bondurant, 1990). Cependant, l'Epo se présente aujourd'hui comme une cytokine aux effets pléiotropiques car elle possède des propriétés beaucoup plus larges que sa seule action sur l'érythropoïèse en effectuant des actions non-érythropoïétiques dont les effets protecteurs sont remarquables. (Maiese *et al.*, 2005, Kowalczyk *et al.*, 2011, Vogel & Gassmann, 2011, Wang *et al.*, 2014). L'Epo s'avère être aussi impliquée dans le contrôle de la ventilation, point que nous détaillerons dans un paragraphe dédié à la description de ce rôle.

- Périphériques

L'Epo exerce principalement des effets cytoprotecteurs cardio-vasculaires, musculaires et rétinien en ayant un rôle anti-apoptotiques, anti-inflammatoire et pro-angiogénique sur les cardiomyocytes (Bullard & Yellon, 2005, Furlani *et al.*, 2008, Kertesz *et al.*, 2004, Marzo *et al.*, 2008, Sanchis-Gomar *et al.*, 2014), l'endothélium vasculaire (Ribatti *et al.*, 1999, Jaquet *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2003), les myoblastes (Scoppetta & Grassi, 2004, Hagström *et al.*, 2010, Jia *et al.*, 2012), l'épithélium pigmentaire rétinien et dans la neurorétine (Becerra & Amaral, 2002, Kilic *et al.*, 2005, Watanabe *et al.*, 2005, Hernandez *et al.*, 2006, Chung *et al.*, 2009, Rex *et al.*, 2009, Mohan *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2015). Cependant, il semblerait que les effets de l'Epo sur le muscle soient controversés (Rotter *et al.*, 2008, Launay *et al.*, 2010, Lamon *et al.*, 2014). De plus l'Epo, par ses effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et angiogéniques dans les cellules β -pancréatiques des îlots de Langerhans sécrétrices d'insuline, protège du diabète de type 1 et 2 (Choi *et al.*, 2010, Katz *et al.*, 2010). Enfin, l'Epo semble aussi agir comme un régulateur de l'homéostasie énergétique et semble ainsi protéger contre l'obésité (Wang *et al.*, 2013a, Wang *et al.*, 2014).

- Centraux

L'Epo et son récepteur sont tous deux présents dans le système nerveux central et périphérique (Digicaylioglu *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1997, Bernaudin *et al.*, 2000, Buemi *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2006). De plus, l'analyse du liquide céphalo-rachidien chez l'Homme révèle

une augmentation significative de l'Epo suite à son administration en périphérie, suggérant que l'Epo traverse la barrière hémato-encéphalique (Rasmussen *et al.*, 2010). L'Epo semble avoir des effets neuroprotecteurs très importants (Yu *et al.*, 2002, Byts & Siren, 2009, Wang *et al.*, 2014 {Blixt, 2018 #7030}). Cette action neuroprotectrice passerait par la stimulation de la neurogenèse (Yu *et al.*, 2002, Tsai *et al.*, 2006), la régulation de l'angiogenèse cérébrale (Kertesz *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2008) et de l'apoptose (Siren *et al.*, 2001, Vairano *et al.*, 2002, Kumral *et al.*, 2006) et également par des effets anti-inflammatoires (Lykissas *et al.*, 2007) et anti-cytotoxiques (Buemi *et al.*, 2003, Brines *et al.*, 2004, Brines, 2010) de l'Epo au niveau cérébral. A cela nous pouvons ajouter son rôle central sur le métabolisme énergétique (Teng *et al.*, 2011) et sur la plasticité neuronale (Adamcio *et al.*, 2008, El-Kordi *et al.*, 2009, Almaguer-Melian *et al.*, 2015).

2. Le récepteur à l'érythropoïétine

L'Epo agit sur ses différentes cellules-cibles par l'intermédiaire de sa liaison à un récepteur spécifique qui peut être de différentes formes selon la fonction considérée, lui conférant ainsi les nombreuses fonctions précitées. Le gène codant le récepteur à l'Epo (Epo-R), cloné en 1989 à partir de cellules érythrocytaires, est localisé sur le chromosome 19p13.3-p13.2 chez l'Homme (D'Andrea *et al.*, 1989). Structuralement, le récepteur à l'Epo appartient à la superfamille des récepteurs aux cytokines de type 1 (D'Andrea *et al.*, 1989, D'Andrea & Zon, 1990, Jones *et al.*, 1990). L'Epo-R ne possède donc pas d'activité tyrosine-kinase intrinsèque (Witthuhn *et al.*, 1993). Il se présente sous forme monomérique inactive. Tout comme les récepteurs aux cytokines de type I, il existe sous deux formes : une forme transmembranaire et une forme soluble (Figure 38) (Yoshimura & Arai, 1996) que nous allons détailler. De plus, plusieurs auteurs postulent l'existence d'un récepteur alternatif à l'homodimère classique qui serait responsable des effets neuroprotecteurs sans effets érythropoïétiques de l'Epo, dans le SNC. Ce récepteur serait un hétérodimère composé de l'association d'un monomère Epo-R et d'un monomère du récepteur commun β , commun à plusieurs autres récepteurs aux cytokines (Figure 38) (Jubinsky *et al.*, 1997, Brines *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2015). Cet hétérodimère est encore souvent ignoré lors de l'étude de la signalisation de l'Epo.

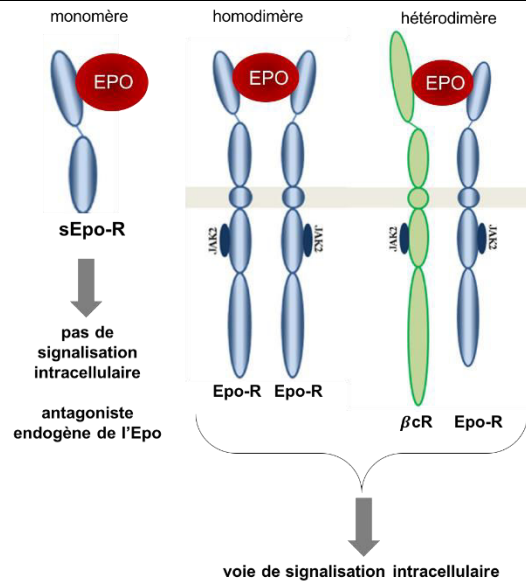


Figure 38 : Représentation des différents récepteurs de l'Epo.

La liaison de l'Epo à son récepteur soluble (sEpo-R) libre dans le plasma n'entraîne pas de signalisation intracellulaire. La liaison de l'Epo à ses récepteurs (Epo-R) membranaires forme des homo- ou d'hétéro-dimères composés respectivement de l'association soit de deux monomères Epo-R soit d'un monomère Epo-R et un monomère du récepteur commun β et active une voie de signalisation intracellulaire. Adaptée de (Debeljak *et al.*, 2014).

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

- Description

Le récepteur membranaire, membre de la famille des récepteurs au cytokines, se compose d'une partie extracellulaire permettant la fixation du ligand Epo, d'une partie membranaire et d'une partie cytoplasmique (Figure 38). La partie cytoplasmique peut se décomposer en deux parties, distale et proximale. La partie distale est impliquée dans l'arrêt du signal de transduction. La partie proximale permet la transduction du signal. Elle ne possède pas d'activité catalytique propre mais est liée à une protéine de type tyrosine kinase, JAK2 (Janus kinase 2), essentielle pour initier l'activation de la cascade intracellulaire après activation de l'Epo-R (Witthuhn *et al.*, 1993). Cette dernière pourrait également agir comme chaperon en facilitant l'adressage et la mobilité de l'Epo-R vers la membrane plasmique (Constantinescu *et al.*, 2001). L'affinité de l'Epo pour son récepteur dépend de la cellule cible. Par exemple, l'affinité de l'Epo pour Epo-R exprimé par les cellules PC12 est significativement plus basse que l'affinité pour Epo-R exprimé par les cellules érythroïdes (Masuda *et al.*, 1993). Les cellules PC12 ont des caractéristiques neurales et elles expriment une forme tronquée d'Epo-R, ce qui peut expliquer la différence d'affinité observée.

- Mécanisme d'action

L'Epo se fixe sur un monomère Epo-R et entraîne sa dimérisation avec un monomère adjacent. Ce rapprochement induit un changement de conformation qui permet la

transphorylation et l'activation des JAK2 associées à chaque monomère. Une fois activées, les JAK2 entraînent la phosphorylation des domaines tyrosines intracytoplasmiques de chaque monomère permettant l'activation du récepteur (Remy *et al.*, 1999). Il déclenche alors plusieurs voies de signalisation intracellulaires telles que les STAT5 (signal de transduction et activateur de transcription 5), ERK (extracellulaire signal regulated kinase), PI3Kinase/AKT (phosphatidylinositol-3/ Protein Kinase B) ou encore NF- κ B (Nuclear factor κ B) (Figure 39) (Digicaylioglu & Lipton, 2001, Rossert & Eckardt, 2005). Les mécanismes particuliers à chaque voie ne seront pas détaillés. Simplement, ces voies de signalisation peuvent agir de manière directe ou indirecte sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire. En particulier, des gènes anti-apoptotiques sont activés (*BCL2* et *BCLX*) tandis que les gènes pro-apoptotiques (*CASP3* et *CASP9*) sont inhibés.

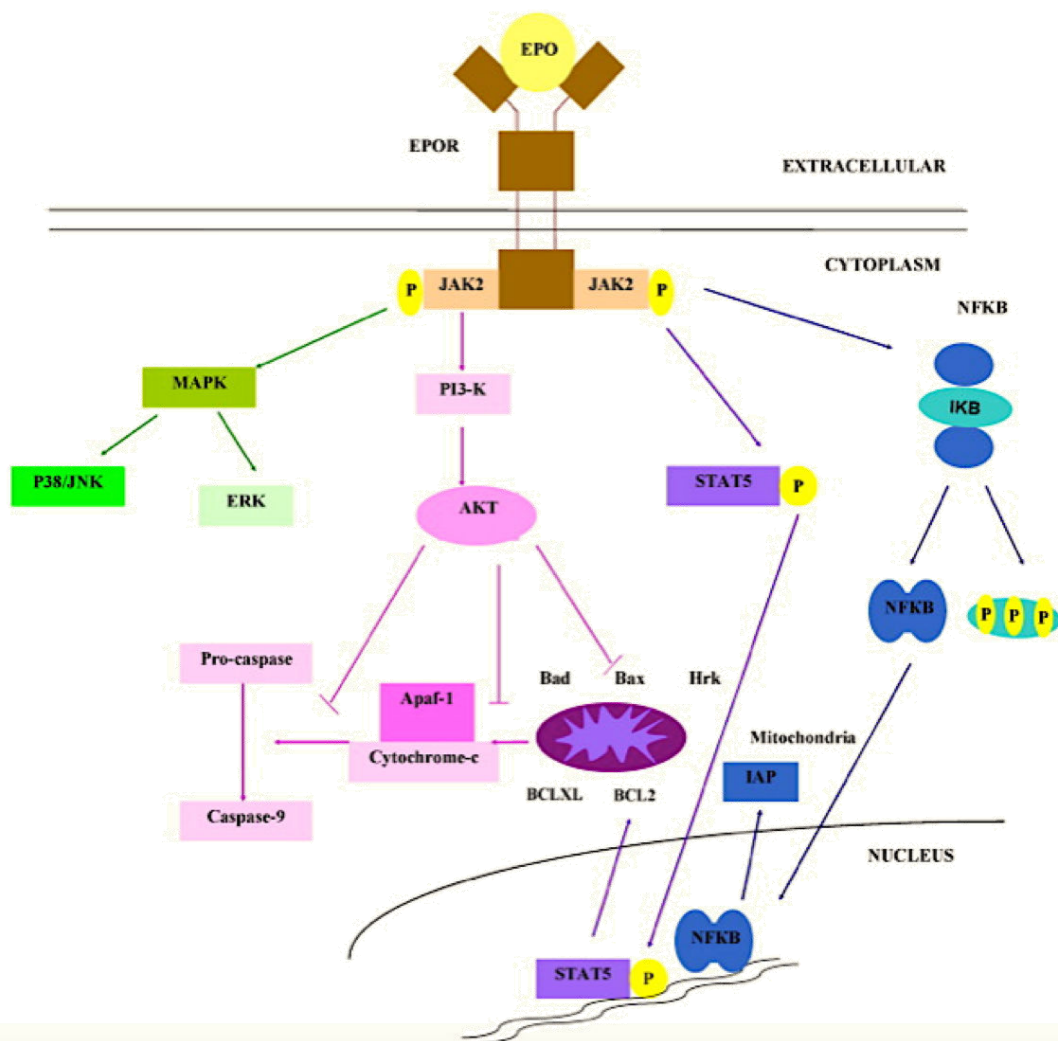


Figure 39 : Représentation des voies de signalisation intracellulaire activées par la fixation de l'Epo sur l'Epo-R

La fixation de l'Epo sur ses récepteurs membranaires (Epo-R) entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation directe (STAT 5) ou indirectes (NF- κ B, MAPK/ERK et PI3k/AKT). Ces voies activent des processus nucléaires et cellulaires. D'après (Kumral *et al.*, 2011).

- **Localisation**

Des récepteurs à l'Epo ont été détectés dans plusieurs tissus, notamment le cœur, l'endothélium vasculaire, la rétine et le SNC (Depping *et al.*, 2005, Zafiriou *et al.*, 2014).

Les Epo-R sont exprimés par les cellules endothéliales, les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales aussi bien chez le singe et le rongeur que chez l'Homme (Masuda *et al.*, 1993, Marti *et al.*, 1996, Siren *et al.*, 2001, Nagai *et al.*, 2001, Soliz *et al.*, 2005, Sanchez *et al.*, 2009). Les récepteurs de l'Epo sont présents dans différentes structures centrales respiratoires (Figure 42). Chez la souris adulte, ils sont mis en évidence par marquage immunohistochimique dans des structures clés de la CCR telles que le préBötC et le NTS ainsi que dans les groupes catécholaminergiques du tronc cérébral (A₁C₁, A₂C₂, A₅ et A₆) (Soliz *et al.*, 2005). Ils sont également présents dans les motoneurones phréniques au niveau de la quatrième racine cervicale de la moelle épinière (Dale *et al.*, 2012). Enfin, ils sont présents dans les corps carotidiens (Soliz *et al.*, 2005, Lam *et al.*, 2009).

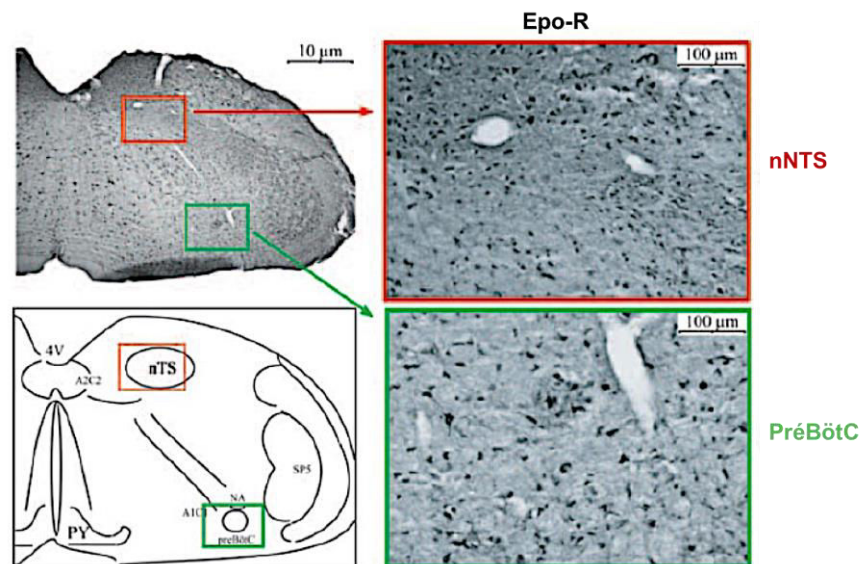


Figure 40 : Immunomarquage des récepteurs à l'Epo chez la souris adulte au niveau du bulbe rachidien

Représentation schématique d'une coupe transversale au niveau du bulbe rachidien montrant la localisation du noyau du tractus solitaire (nNTS ; rectangle rouge) et du complexe de pré-Bötzinger (PréBötC ; rectangle vert) et microphotographies montrant la présence des récepteurs à l'Epo (Epo-R) au niveau du nNTS (rectangle rouge) et du PréBötC (rectangle vert). D'après (Soliz *et al.*, 2005).

b. Le récepteur soluble à l'Epo (sEpo-R)

- **Description**

Il existe également une forme tronquée et circulante d'Epo-R, le récepteur soluble à l'Epo (sEpo-R) (Figure 38, page 111). Le sEpo-R est synthétisé par épissage alternatif à partir du gène codant pour l'Epo-R. Il possède le site de liaison à l'Epo, partie extracellulaire commune à l'Epo-R, mais pas les parties membranaire et cytoplasmique. La fonction du sEpo-

R est mal caractérisée bien que sa fonctionnalité et sa capacité à lier l'Epo aient été démontrées (Baynes *et al.*, 1993, Yet & Jones, 1993). De manière générale, les récepteurs solubles des cytokines sont connus pour jouer un rôle dans la modulation de l'activité de la cytokine soit en stabilisant le ligand soit en se liant au ligand et en changeant sa concentration effective ou encore en altérant l'interaction entre le ligand et son récepteur (Venkatesha *et al.*, 2006). Ainsi, le sEpo-R pourrait avoir un rôle analogue (Villafuerte *et al.*, 2014).

- Mécanisme d'action

Ne possédant pas les parties trans- et inter-membranaires mais uniquement la partie extracellulaire qui permet la liaison de l'Epo, le sEpo-R lié à son ligand Epo, n'entraîne donc pas l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Figure 38, page 111) (Nagao *et al.*, 1992a). Cela lui donne un rôle d'antagoniste endogène de l'Epo, en l'empêchant par sa liaison de se lier au récepteur membranaire. La concentration effective d'Epo à destination des organes va se retrouver ainsi diminuée. Le rapport Epo/sEpo-R est donc très important pour l'action de l'Epo. Par exemple, dans le cas du mal chronique des montagnes, l'érythrocytose excessive ne dépend pas uniquement des concentrations d'Epo dans le sang, mais bien du rapport Epo/sEpo-R (Villafuerte *et al.*, 2014). Il a été mis en évidence qu'une perfusion de sEpo-R directement dans les ventricules cérébraux avait pour effet de réduire la concentration intracérébrale d'Epo (Soliz *et al.*, 2007a). En 2011, une équipe a démontré que l'hypoxie intermittente entraînait une diminution de l'expression de sEpo-R chez l'Homme, ce qui pourrait augmenter la disponibilité de l'Epo (Brugniaux *et al.*, 2011). Dans cette même étude, il a été mis en évidence une corrélation négative entre sEpo-R et Epo mais aussi entre sEpo-R et volume courant (V_T), montrant donc un lien entre ventilation et Epo. Plus récemment, il a été mis en évidence que l'injection de sEpo-R avait pour effet de diminuer le V_T chez les mâles et la f_R chez des souris femelles (Ballot *et al.*, 2015a). Le sEpo-R est donc un élément important à prendre en compte dans l'étude de l'effet de l'Epo sur la ventilation en hypercapnie.

- Localisation

Sa présence a été détectée dans le plasma, le foie, les reins, la moelle osseuse et le SNC (Ferro *et al.*, 1993, Arcasoy *et al.*, 2003, Della Ragione *et al.*, 2007, Soliz *et al.*, 2007a).

3. L'érythropoïétine et la ventilation

L'Epo et son récepteur sont exprimés dans le SNC, dans lequel elle a de nombreux effets. L'Epo n'influence pas le système respiratoire seulement par son action sur la synthèse des globules rouges qui augmente le transport d' O_2 dans le sang. Il a été démontré que l'Epo était impliquée dans la ventilation en normoxie et dans la modulation de la ventilation en réponse à l'hypoxie. L'implication de l'Epo sur la chémosensibilité au CO_2 est assez mal documentée dans la littérature car peu d'équipes se sont intéressées à cette problématique. Une

partie de cette thèse a consisté à caractériser l'effet de l'Epo sur la commande centrale respiratoire et plus particulièrement au cours d'une hypercapnie.

a. Effet sur la ventilation de base

- Observations

Une étude montre qu'une injection intra-cérébro-ventriculaire d'Epo chez le rat anesthésié stimule les paramètres cardiovasculaires et respiratoires de façon dose dépendante. Plus précisément au niveau ventilatoire, le volume courant (V_T) ainsi que le débit ventilatoire (\dot{V}_E) augmentent dès la première minute après l'injection d'Epo et cette augmentation persiste jusqu'à 40 min après le début de l'injection (Yalcin et al., 2007). Cet effet stimulant de l'Epo sur la ventilation basale serait strictement central. Les auteurs se sont assurés de ce point en injectant en intraveineux la plus haute dose d'Epo injectée en intra-cérébro-ventriculaire, ce qui n'a provoqué aucun changement respiratoire et a donc confirmé l'effet central de l'Epo sur la ventilation en normoxie. De plus, une récente étude confirme ces résultats en montrant que l'Epo n'a pas d'effet sur l'activité des corps carotidiens en normoxie (Andrade *et al.*, 2018). Une deuxième étude montre qu'une injection intrathécale d'Epo chez le rat adulte induit une facilitation à long terme de l'activité phrénique. Cette facilitation, médiée par la phosphorylation des voies ERK et AKT, est observable 30 minutes après le début de l'application et persiste pendant 90 min (Dale et al., 2012). Le développement d'une souche de souris mutante Tg21 qui surexprime l'Epo au niveau central (4 fois supérieure à la normale), a permis la caractérisation des effets centraux de l'Epo *in vivo*, en s'affranchissant de ses effets plasmatiques (Wiessner *et al.*, 2001). La ventilation basale mesurée *in vivo* chez des souris mâles Tg21 est similaire à celle des souris témoins. En revanche, l'étude *in vivo* (Gassmann *et al.*, 2009) des paramètres ventilatoires en normoxie chez les souris femelles Tg6 qui présentent une surexpression de l'Epo au niveau plasmatique (12 fois supérieure à la normale) et central (26 fois supérieure à la normale) (Ruschitzka *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence une ventilation plus importante par rapport aux souris témoins (Figure 41). L'augmentation de la ventilation était due à une augmentation du V_T par rapport aux souris témoins. De manière intéressante, les souris femelles Tg21 présentaient elles aussi une augmentation du V_T associée en plus à une diminution de la fréquence respiratoire (Figure 41) (Gassmann et al., 2009). Cette association pourrait expliquer le fait que ces souris femelles ne présentent pas d'augmentation de leur ventilation par rapport à leurs témoins en normoxie. Aucune modification de la

ventilation n'a été observée chez les souris mâles Tg6 (Soliz *et al.*, 2007b) et Tg21 (Gassmann *et al.*, 2009) par rapport à leurs témoins.

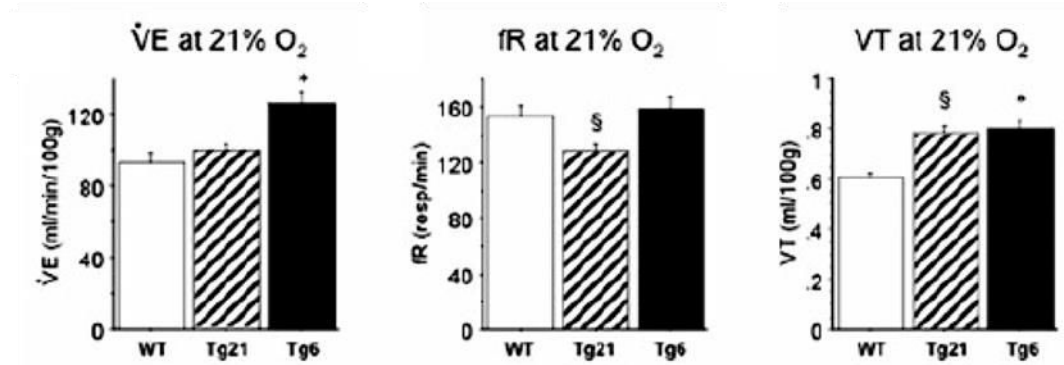


Figure 41 : Variables ventilatoires en normoxie chez des souris femelles Tg21 et Tg6

Les souris Tg 21 surexpriment l'Epo au niveau central (4 fois supérieur à la normale) et les souris Tg6 surexpriment l'Epo au niveau plasmatique (12 fois supérieur à la normale) et central (26 fois supérieur à la normale). \dot{V}_E : ventilation minute ; f_R : fréquence respiratoire ; V_T : volume courant ; WT : wild type. D'après (Gassmann *et al.*, 2009).

Les effets d'une injection intra-cisternale de sEpo-R chez des souris sauvages montrent que l'Epo est un stimulant respiratoire spécifique au sexe de l'individu (Figure 42) (Ballot *et al.*, 2015a). De plus, comparativement aux animaux sauvages, des souris femelles déficientes en Epo (Epo-TAg^h) comparées aux souris WT femelles avaient tendance à hyperventiler dans des conditions normoxiques (Jeton *et al.*, 2017). Les stéroïdes sexuels sécrétés à différents âges et différemment selon le sexe semblent moduler les effets de l'Epo sur la régulation respiratoire en normoxie et en réponse à l'hypoxie (Ballot *et al.*, 2015a). Ces observations suggèrent un effet stimulant de l'Epo en normoxie sur la ventilation qui pourrait passer, entre autres, par une action centrale. Ces résultats mettent aussi en avant un dimorphisme sexuel dans la régulation de la ventilation par l'Epo en normoxie, ce qui suggère l'implication des hormones sexuelles.

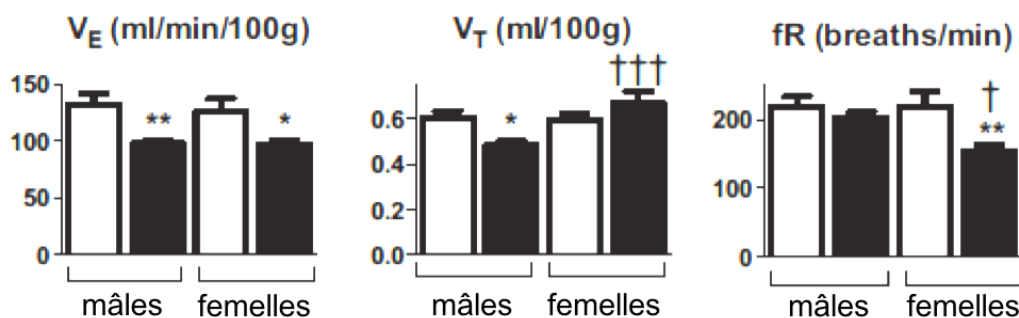


Figure 42 : Variables ventilatoires en normoxie après injection de sEpo-R (en noir) chez les mâles et les femelles

\dot{V}_E : ventilation minute ; f_R : fréquence respiratoire ; V_T : volume courant. D'après (Ballot *et al.*, 2015a).

b. Effet sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

- Observations

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne le rôle de l'Epo dans la commande centrale respiratoire au cours d'une hypercapnie. En effet, l'intérêt porté à l'effet de l'Epo sur la chémosensibilité s'est surtout concentré sur la sensibilité chimique à l'O₂. La littérature ayant trait à l'existence d'un effet de l'Epo sur la chémosensibilité au CO₂ est assez pauvre. Plusieurs études tendent à montrer que l'induction d'Epo par l'hypoxie semble être inhibée par la présence concomitante d'acidose respiratoire et métabolique (Cohen *et al.*, 1981, Eckardt *et al.*, 1990, Miller *et al.*, 1973). Cette interaction a été confirmée *in vitro*. En effet, une étude récente a montré que l'acidose diminue l'induction de l'ARN messager de l'Epo en condition hypoxique (Willam *et al.*, 2006). Une étude de Klausen et collaborateurs (Klausen *et al.*, 1996) a mesuré les effets du CO₂ sur la synthèse d'Epo, pendant un test hypoxique (10% O₂). Leurs résultats montrent que seule l'hypoxie hypocapnique permet de stimuler la synthèse d'Epo dont la concentration mesurée dans le plasma augmente de 28%. Une récente étude conclut que l'Epo pourrait être un modulateur de la chémosensibilité au CO₂ des corps carotidiens (Andrade et al., 2018). Il semble exister une interaction entre le CO₂ et la synthèse de l'Epo mais les effets de l'Epo sur la sensibilité chimique au CO₂ restent assez méconnus. C'est ce qui a intéressé une partie de ce travail doctoral. Le point de départ de nos réflexions s'ancre sur les observations de l'effet stimulant de l'Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie qui pourrait laisser penser que l'Epo pourrait intervenir de manière similaire sur la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que l'Epo modulerait la chémosensibilité à l'O₂ par une action directe sur la CCR (Soliz et al., 2005, Voituron et al., 2014, Pichon *et al.*, 2016, Jeton et al., 2017). Soliz et collaborateurs sont les premiers à caractériser les effets centraux de l'Epo sur la sensibilité chimique à l'O₂ et révèlent l'effet stimulateur de l'Epo sur la CCR en hypoxie (Soliz et al., 2005). Au niveau périphérique, l'injection intrapéritonéale d'Epo deux heures avant le début d'un test hypoxique aigu chez des souris sauvages ne modifie pas la réponse ventilatoire à l'hypoxie. De plus, une même injection d'Epo diminue la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez l'homme et l'augmente chez la femme (Soliz *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que l'Epo n'avait pas d'effet sur la sensibilité à l'O₂ des corps carotidiens chez des rats mâles ou femelles (Andrade et al., 2018). Ces résultats suggèrent que l'Epo plasmatique module l'activité des corps carotidiens de façon sexe-dépendante mais ne renseigne pas sur ses effets centraux car la dose utilisée et le temps d'action rendent hautement improbable sa diffusion jusqu'au SNC (Soliz et al., 2005).

- Actions

Au niveau du SNC, l'expression d'Epo-R a été retrouvée au niveau du tronc cérébral et plus particulièrement dans le PrBötC et le NTS chez les souris WT et Tg21, ce qui suggère que l'Epo a la capacité de moduler la ventilation en agissant directement sur le SNC (Figure

40) (Soliz et al., 2005). Les mécanismes à l'origine de ces effets sont encore méconnus. L'analyse de l'activité des voies classiques de l'Epo sur ses récepteurs (ERK, PI3Kinase/AKT, STAT5) montre que la régulation de l'Epo de la commande respiratoire centrale implique au moins deux voies de signalisation intracellulaires, les voies PI3K-Akt et MEK-ERK (Caravagna & Soliz, 2015, Seaborn & Caravagna, 2017). Cependant, le mécanisme exact qui sous-tend l'action de l'Epo sur le contrôle respiratoire central reste à déchiffrer, ainsi que les types cellulaires et les régions encéphaliques impliquées dans ce contrôle. De plus, l'analyse de l'activité des groupes catécholaminergiques montre une modification de leurs métabolismes. C'est donc par ce mécanisme que la réponse ventilatoire à l'hypoxie serait modulée, du moins chez les mutants Tg21 (Soliz et al., 2005).

Dans un tel contexte, un des objectifs de ce travail doctoral a été de déterminer chez l'animal les modalités d'action de l'Epo sur la CCR en condition hypercapnique à partir de modèles mutants (*i.e.* Epo-TAg^h, Tg21). L'ensemble des expériences avait pour but de déterminer si l'Epo pouvait avoir un rôle dans la mise en place de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie puis de préciser ce rôle en déterminant la localisation des actions de l'Epo (e.g. chémorécepteurs périphériques et/ou centraux, structures respiratoires du SNC).

III. Le système leptinergique

1. La leptine

a. Description

Le poids d'un individu reste, d'une manière générale, relativement constant au cours de sa vie d'adulte (Hervey, 1969). Il existe donc une régulation fine de la balance énergétique définie par l'équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique. La régulation de cette balance par un système endocrine intégrant les réserves énergétiques est maintenant étudiée depuis plus d'un demi-siècle. Le système leptinergique fait partie intégrante de ce système endocrinien. En 1951, Anand et Brobeck (Anand & Brobeck, 1951) montrent chez le rat que des lésions au niveau de l'hypothalamus induisent un déséquilibre de la balance énergétique et caractérisent ainsi les « feeding centers ». La lésion de l'hypothalamus ventro-médian induit une hyperphagie conduisant à une obésité morbide ainsi qu'à une altération de la thermorégulation alors que la lésion de l'hypothalamus latéral induit une forte réduction de la prise alimentaire conduisant à la mort par cachexie. Ces expériences sont les premières démonstrations de l'importance de l'hypothalamus en tant que centre de contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

En 1953, Kennedy (Kennedy, 1953) explique la constance du poids d'un individu au cours de sa vie par la régulation de la masse adipeuse de l'organisme et développe sa théorie lipostatique. En se basant sur les expériences de lésions hypothalamiques précitées, il émet

l'hypothèse d'une relation entre la masse adipeuse et le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. L'hypothalamus collecterait des informations relatives à la quantité de masse adipeuse de l'organisme par l'intermédiaire d'un facteur circulant et régulerait en retour prise alimentaire et dépense énergétique de manière adéquate.

En 1959 Hervey étaye la théorie lipostatique de Kennedy grâce au processus chirurgical de parabiose qui permet l'union de la circulation de deux rats vivants en suturant ensemble leur péritoine et leurs muscles (Huff *et al.*, 1950). Hervey (Hervey, 1959) réunit donc la circulation sanguine d'un rat rendu obèse par lésion de l'hypothalamus ventro-médian et d'un rat témoin. Suite à cette chirurgie, le comportement alimentaire du rat obèse n'est pas modifié tandis que le rat témoin cesse de s'alimenter. Hervey suggère alors l'existence d'un facteur de satiété circulant dont la concentration chez le rat obèse devait être augmentée par rapport au rat témoin. L'absence d'effet observée chez le rat ayant subi une lésion hypothalamique suggère également la présence du récepteur de ce facteur de satiété circulant au niveau de l'hypothalamus.

Dans les années 1970, les conclusions de Hervey ont été soutenues par des expériences sur des souches consanguines de souris où est apparue une mutation spontanée, la souris « obèse » (*ob/ob*) (Ingalls *et al.*, 1950) et la souris « diabète » (*db/db*) (Hummel *et al.*, 1966), caractérisées par une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et une obésité. En 1973, Coleman pose deux hypothèses pour expliquer l'obésité de ces souris i.e. soit le facteur circulant est absent ou inactif soit le facteur circulant n'est pas détecté par l'hypothalamus (Coleman, 1973). Pour démêler ses différentes hypothèses, il réalise des expériences de parabiose (Coleman, 1973) entre ces deux modèles murins. La parabiose entre souris témoin et *ob/ob* provoque une réduction de la masse adipeuse de la souris *ob/ob* et n'a pas d'effet sur la souris témoin. La parabiose entre souris contrôle et *db/db* n'a pas d'effet sur la souris *db/db* mais induit une forte réduction de la prise alimentaire chez la souris témoin, conduisant à sa mort. La parabiose entre les souris *ob/ob* et *db/db* n'induit aucun changement chez la souris *db/db* tandis que la souris *ob/ob* devient hypophagique et meurt. Coleman interprète ses résultats de la manière suivante : les souris *ob/ob* ne produisent pas le facteur de satiété tandis que les souris *db/db* le produisent mais y sont insensibles. Il sera démontré plus tard que le gène *obese* code pour la leptine (Ob) (Zhang *et al.*, 1994, Halaas *et al.*, 1997) et le gène *diabetes* (aujourd'hui nommé *lepr*) pour son récepteur (Ob-R ou encore Lep-R) (Tartaglia *et al.*, 1995, Tartaglia, 1997).

La découverte de la séquence du gène *obese* (*ob*) murin et humain a été réalisée par l'équipe de Friedman (Zhang *et al.*, 1994) grâce à la technique du clonage de position. Ils retrouvent ainsi une mutation du gène *obese* chez les souris *ob/ob*. La même équipe (Halaas *et al.*, 1997) montre que la protéine Ob obtenue à partir du gène *ob* est présente dans le plasma et que l'injection de celle-ci *in vivo* chez la souris produit une réduction de la prise alimentaire et de la masse adipeuse. Le facteur de satiété découvert par Coleman vingt ans plus tôt était identifié et l'équipe de Friedman baptisa le produit du gène *ob*, leptine, du grec « leptos » signifiant mince (Halaas *et al.*, 1997).

Le gène *ob* a été localisé sur le chromosome 6 chez la souris (Zhang et al., 1994) et sur le chromosome 7 chez l'Homme (Geffroy et al., 1995). Il comprend trois exons et deux introns. Les exons 2 et 3 sont transcrits en un ARNm de 4,5 kb chez la souris et de 3,5 kb chez l'Homme (Zhang et al., 1994, Cohen et al., 1996). Après traduction, la protéine de 18 kDa (167 aa chez la souris, 166 aa chez l'Homme) perd un peptide signal de 2kDa (21 aa) en libérant dans la circulation une forme de 16 kDa ne subissant aucune modification post-traductionnelle. 67 % de la séquence peptidique de la leptine a été conservée au cours de l'évolution, preuve du rôle primordial joué par cette hormone pour la survie des espèces (Ogawa et al., 1995). Il existe un fort taux d'homologie entre la leptine de rat et de souris et entre la leptine de souris et d'humain, respectivement 83 % et 84% (Zhang et al., 1997). La leptine a la structure d'une cytokine hélicoïdale de type 1 (e.g. IL-6), composée de quatre hélices α et de deux feuillets β (Madej et al., 1995, Zhang et al., 1997). La partie N-terminale de la protéine est indispensable à son activité biologique. Elle comporte un pont disulfure entre les cystéines 96 et 146 qui serait important pour la sécrétion, la stabilité et la solubilité de la leptine (Montague et al., 1997, Imagawa et al., 1998). La leptine circulante est un monomère, elle est présente sous forme libre ou liée à des protéines encore mal connues, parmi lesquelles une forme de récepteur soluble à la leptine (sOb-R) (Sinha et al., 1996). Sa demi-vie varie entre 25 min et 3 h (Ahima et al., 1996, Banks et al., 1996) et elle est éliminée par clairance rénale (Cumin et al., 1997).

b. Synthèse périphérique et centrale

Au niveau périphérique, la synthèse de leptine a initialement été attribuée au seul tissu adipeux, majoritairement par les adipocytes du tissu adipeux blanc (Zhang et al., 1994, Green et al., 1995) et en moindre partie par les adipocytes du tissu adipeux brun (Cinti et al., 1997). Cette production étant proportionnelle à la quantité de tissu adipeux (Maffei et al., 1995, Considine et al., 1996), les niveaux plasmatiques de leptine sont donc le reflet du statut énergétique d'un individu. Le statut de la leptine comme hormone spécifique de l'adipocyte, établi depuis 1994, a été renversé en 1997 par la découverte d'une seconde source de leptine : le placenta humain (Masuzaki et al., 1997, Hoggard et al., 1997, Hoggard et al., 2000). Depuis, une synthèse ectopique de l'hormone par d'autres tissus a été mise en évidence. Ainsi, l'estomac (Bado et al., 1998, Sobhani et al., 2000), l'épithélium intestinal (Sitaraman et al., 2004), le foie (Taouis et al., 1998), le muscle squelettique (Wang et al., 1998a), la peau (Glasow et al., 2001), les gonades (Cioffi et al., 1997, Ryan et al., 2002) ou encore la glande mammaire (Casabiell et al., 1997, Smith-Kirwin et al., 1998, Bonnet et al., 2002) produisent aussi la leptine.

Au niveau central, la leptine est exprimée dans le cortex piriforme, l'hypophyse, l'hippocampe et l'hypothalamus au niveau du noyau arqué (ARC), du noyau supraoptique (SON) et du noyau paraventriculaire (PVN) (Schwartz *et al.*, 1996b, Morash *et al.*, 1999, Ur *et al.*, 2002). Chez des sujets obèses à IMC égal, le taux de leptine plasmatique est augmenté par rapport à des sujets non obèses ainsi que le rapport des concentrations $[Lep]_{LCR}/[Lep]_{plasma}$ (Figure 43) (Caro *et al.*, 1996a). Les patients les plus obèses avaient tendance à avoir une plus grande concentration de leptine plasmatique (Maffei *et al.*, 1995, Considine *et al.*, 1996).

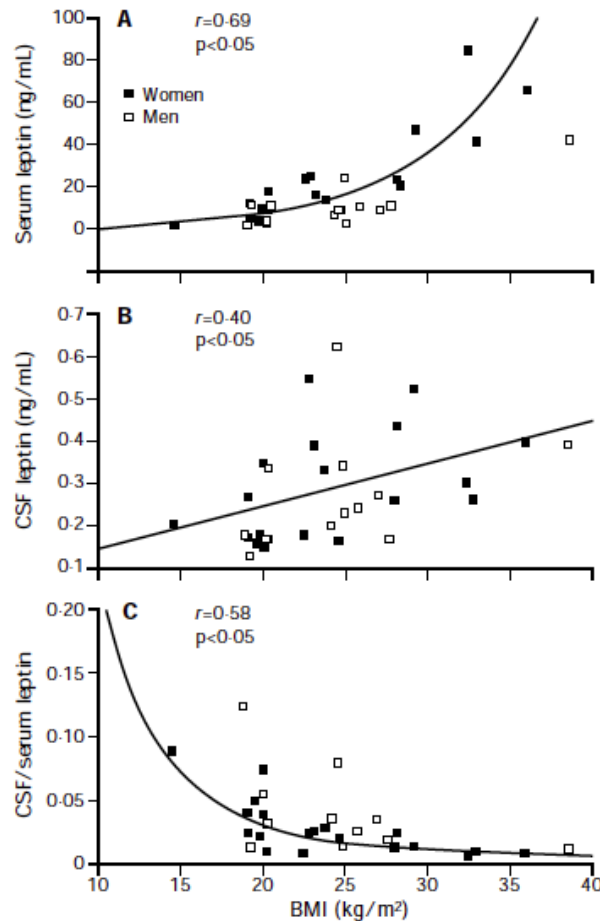


Figure 43 : Corrélation entre les concentrations de leptine sérique ou encéphalique et l'indice de masse corporelle

A. Corrélation positive entre la leptine sérique et l'IMC. La leptine sérique est plus élevée chez les sujets obèses (+318%) que chez les sujets non obèses. **B.** Corrélation positive entre la leptine dans le LCR et l'IMC. Cependant, la concentration de leptine dans le LCR n'était que de 30% plus élevée chez les sujets obèses que chez les sujets non obèses. **C.** Corrélation négative entre le ratio $[Lep]_{LCR}/[Lep]_{plasma}$ et l'IMC. Le ratio chez les sujets non obèses est plus élevé que chez les sujets obèses. BMI : body mass index ; CSF : cerebrospinal fluid. D'après (Caro *et al.*, 1996a)

La leptine plasmatique traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) et atteint le liquide céphalo-rachidien (LCR) via un système de transport saturable qui sera explicité dans la suite de ce chapitre (Schwartz *et al.*, 1996a, Banks *et al.*, 1999, Banks & Farrell, 2003) (Figure 44). En effet, chez l'Homme, la concentration de leptine dans le LCR était fortement

corrélée de manière non linéaire à celle plasmatique (Figure 44). De plus, comme la concentration de leptine plasmatique, la concentration de leptine dans le LCR était corrélée à l'indice de masse corporelle, démontrant que la leptine plasmatique entre dans le LCR proportionnellement à l'adiposité corporelle (Figure 44). Cependant, l'efficacité de cette absorption, mesurée par le rapport des concentrations $[Lep]_{LCR}/[Lep]_{plasma}$, était plus faible chez les patients obèses lorsque leur concentration plasmatique de leptine était plus élevée (Figure 44). Les auteurs de cette étude émettent alors l'hypothèse qu'un mécanisme saturable assure le transport de la leptine du plasma au LCR et que l'efficacité réduite de l'absorption de leptine dans le LCR chez les patients obèses avec des taux plasmatiques élevés de leptine par rapport à d'autres patients obèses où la concentration plasmatique est plus basse, pourrait expliquer une résistance à la leptine (Schwartz et al., 1996a). Une autre étude montre que chez les souris obèses le transport altéré de la leptine à travers la BHE se développe en tandem avec l'obésité et qu'il est réversible même avec une réduction de poids (Banks & Farrell, 2003).

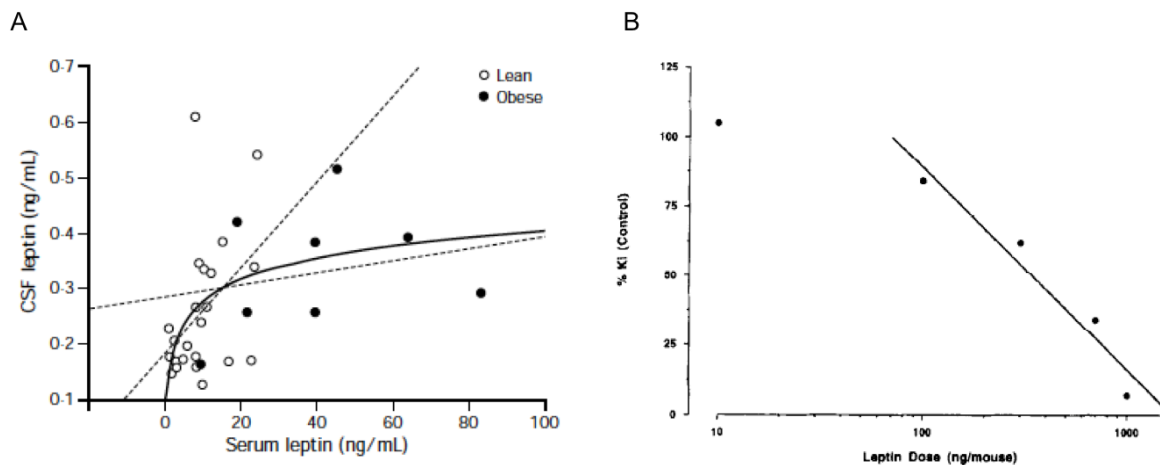


Figure 44 : Transport saturable de la leptine à travers la BHE

A. La concentration de leptine dans le sérum et le LCR est corrélée positivement mais chez les sujets obèses (ligne pointillée inférieure), la pente de la relation est faible par rapport aux sujets non obèses (ligne pointillée supérieure). La relation entre la leptine dans LCR et la leptine sérique chez les sujets obèses et les non obèses peut être décrite logarithmiquement (courbe trait plein) et traduit un phénomène de transport saturable de la leptine sérique vers le LCR. D'après (Caro et al., 1996a). **B.** Relation entre des doses croissantes de leptine non marquée par rapport à l'influx sanguin vers le cerveau de la leptine radiomarquée à l'iode radioactif. Des doses croissantes de leptine inhibent progressivement l'influx sanguin vers le cerveau de la leptine radiomarquée à l'iode radioactif (IK). La dose de leptine nécessaire pour inhiber le IK de 50% a été évaluée à 339 ng/souris D'après (Banks et al., 1996).

Le système de transport par lequel la leptine pénétrerait dans le SNC, se ferait par l'intermédiaire de transporteurs (Banks et al., 1996, Maresh *et al.*, 2001). Au niveau moléculaire, deux protéines candidates se situant à l'interface entre le système sanguin et le SNC ont été mises en avant. D'une part il s'agit de la forme tronquée du récepteur de la leptine (Ob-Ra) se situant au niveau des plexus choroïdes (Tartaglia et al., 1995, Devos *et al.*, 1996), des micro-vaisseaux de la BHE (Kastin *et al.*, 1999, Kastin & Pan, 2000, Hileman *et al.*, 2002)

et de l'éminence médiane (Balland *et al.*, 2014). D'autre part de la mégaline, une protéine capable d'internaliser par endocytose une grande variété de composants, notamment protéiques, qui est située au niveau des plexus choroïdes (Dietrich *et al.*, 2008). Ainsi, la leptine pourrait se lier à son récepteur et être internalisée par endocytose, permettant son passage sélectif du compartiment sanguin vers le compartiment encéphalique. Au niveau cellulaire, un type particulier de cellules gliales nommées tanocytes, localisées sur le plancher du 3^e ventricule dans l'hypothalamus, jouerait également un rôle important dans ce processus de passage de la BHE (Figure 45) (Langlet *et al.*, 2013, Balland *et al.*, 2014, Gao *et al.*, 2014, Goodman & Hajihosseini, 2015). Les tanocytes sont des cellules polarisées, leurs corps cellulaires sont localisés dans les parois du 3^e ventricule et leurs prolongements cytoplasmiques s'étendent dans le parenchyme cérébral au contact de la pie mère (Rodriguez *et al.*, 2005, Goodman & Hajihosseini, 2015). Dans l'éminence médiane comme dans les autres organes circumventriculaires, le type cellulaire impliqué dans la BHE est représenté par les tanocytes (Langlet *et al.*, 2013). Les tanocytes entrent en contact par leurs prolongements avec les vaisseaux fenestrés qui appartiennent, dans l'éminence médiane, au système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire (Mullier *et al.*, 2010, Schaeffer *et al.*, 2013). Les corps cellulaires des tanocytes bordent le plancher du troisième ventricule et sont joints entre eux par des jonctions serrées (Mullier *et al.*, 2010, Schaeffer *et al.*, 2013). Ainsi, de par leur localisation, les tanocytes régulent les échanges entre le compartiment ventriculaire baigné par le LCR et les vaisseaux fenêtrés et forment ainsi une barrière tanocytaire. L'itinéraire de la leptine via la barrière tanocytaire serait le suivant : la leptine entrerait dans le SNC à travers l'éminence médiane où elle serait captée par les prolongements des tanocytes et transportée par transcytose dans le 3^e ventricule, à partir duquel elle peut circuler dans le système ventriculaire et accéder aussi bien à l'hypothalamus qu'à des structures cérébrales plus distantes (Balland *et al.*, 2014, Cabral *et al.*, 2015) (Figure 45). En effet, l'utilisation de leptine marquée fluorescente (Vauthier *et al.*, 2013) a montré que la leptine sérique quitte librement le système porte hypothalamo-hypophysaire au travers des capillaires fenestrés de l'éminence médiane et est ensuite captée par les prolongements des tanocytes (Schaeffer *et al.*, 2013). Ce processus requiert l'activation d'un récepteur à la leptine (Ob-R) puisqu'une leptine recombinante mutée qui est capable de lier un Ob-R mais qui n'a pas d'activité biologique (Niv-Spector *et al.*, 2005) n'est pas internalisée par les tanocytes *in vivo* (Balland *et al.*, 2014). Les auteurs suggèrent que la forme longue du récepteur à la leptine (Ob-RB), la seule permettant la transduction du signal, pourrait être impliquée dans ce phénomène de transport de la leptine par transcytose (Balland *et al.*, 2014). En effet, l'analyse de l'activation du signal leptine via l'isoforme Ob-Rb, après l'injection intrapéritonéale de leptine, montre que les tanocytes sont les premières cellules à présenter la phosphorylation induite par le signal leptine de STAT3 (pour signal transducer and activator of transcription 3) dans l'hypothalamus (Figure 45). L'immunoréactivité de STAT3 phosphorylé, induite par la leptine dans les tanocytes, est observée dès 5 minutes après l'injection intrapéritonéale de leptine à la fois dans leurs prolongements et dans leurs noyaux

cellulaires (Figure 45) (Balland et al., 2014). La perte de la capacité de la leptine à activer les voies de signalisations intracellulaires chez les souris *db/db* mutées pour l'isoforme OB-Rb cause une accumulation de la leptine dans l'éminence médiane (Balland et al., 2014). Cela suggère que la leptine captée par les tanocytes de l'éminence médiane chez les souris mutées *db/db* n'est pas relarguée dans le troisième ventricule et reste piégée dans les tanocytes (Balland et al., 2014). Donc après son internalisation par les prolongements tanocytaires de l'éminence médiane, la leptine est transportée vers le pôle apical des tanocytes et relarguée dans le 3^e ventricule suite à l'activation intracellulaire de la voie ERK (pour extracellular-signalregulated kinase). De là, la leptine atteint l'hypothalamus pour ensuite diffuser librement dans le noyau arqué ainsi que dans les structures cérébrales profondes entourant les ventricules (Balland et al., 2014). L'activation pharmacologique de la voie de signalisation ERK des tanocytes est capable de restaurer la translocation de la leptine exogène de l'éminence médiane vers l'hypothalamus chez les souris *db/db*. Il serait donc envisageable, pour restaurer le transport de la leptine au cours d'une résistance dont la cause serait une anomalie de son transport à travers la BHE vers le LCR, de mettre au point des traitements pharmacologiques faisant intervenir des molécules capables d'activer cette voie de signalisation ERK spécifiquement dans les tanocytes, permettant ainsi de restaurer l'effet central de la leptine.

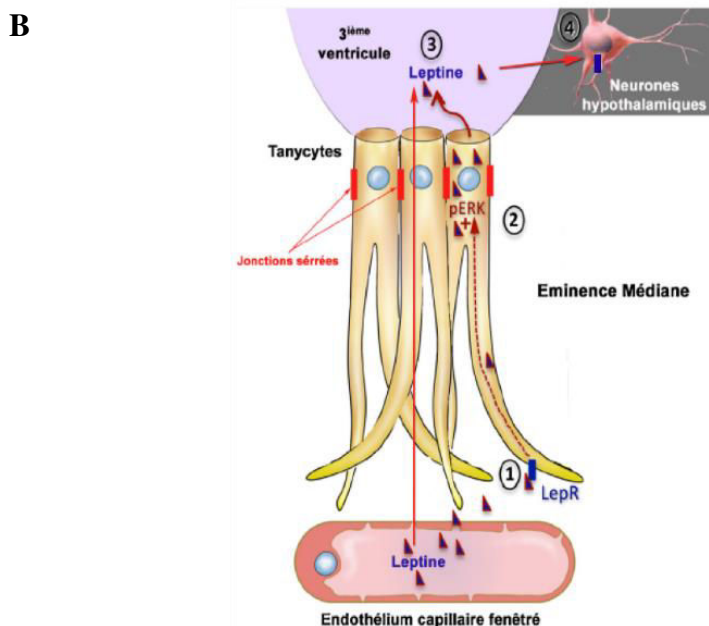
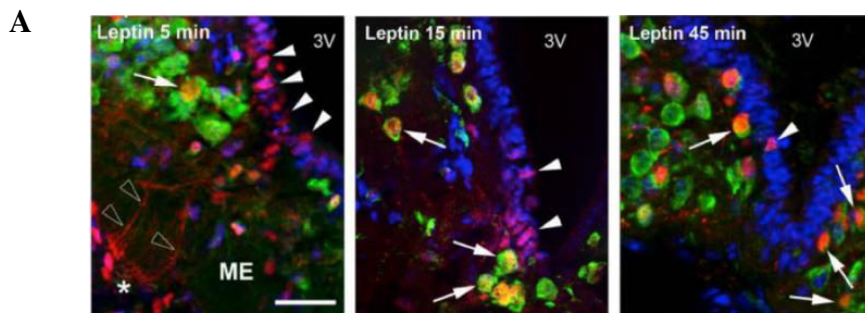


Figure 45 : Le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique par transcytose

A. Photomicrographies représentatives montrant STAT3 phosphorylé (p-STAT3, rouge) dans l'éminence médiane (ME) de souris sauvages adultes 5, 15 et 45 minutes après injection intrapéritonéale de leptine. Les pointes de flèche blanches et noires indiquent respectivement pSTAT3-IR dans les corps cellulaires de tanocytes bordant le sol du 3^{ème} ventricule (3V) et leurs prolongements cytoplasmiques en contact avec la surface piale (astérisque). Les flèches montrent des neurones immunoréactifs pour HuC/D, marqueur neuronal (vert) et pSTAT3 (rouge). D'après (Balland *et al.*, 2014). **B.** Représentation schématique retraçant les grandes étapes du transport de la leptine à travers la BHE par transcytose. La leptine circulante se lie à ses récepteurs situés sur les extensions podales des tanocytes à partir des vaisseaux sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire dont l'endothélium a la particularité d'être fenêtré (étape 1). Lors de son parcours dans le tanocyte, la leptine active une voie de signalisation ERK (étape 2) qui enclenche sa libération dans le liquide céphalorachidien (étape 3). La leptine peut alors exercer son action dans les zones encéphaliques qui expriment son récepteur (étape 4). D'après (Florent *et al.*, 2017).

La sécrétion de leptine est soumise à diverses régulations et il est très difficile de les classer en fonction de leur importance car celle-ci dépend de l'état physiologique de l'organisme ainsi que des fonctions biologiques étudiées. De nombreuses revues les répertorient et nous n'en donnerons ici qu'une liste non exhaustive (Margetic *et al.*, 2002). De plus, il ne faut pas oublier que si la leptine est synthétisée principalement par les adipocytes, il existe une synthèse ectopique de ce messager chimique dans de nombreux tissus, dont la régulation est certainement tissu-dépendants. Au niveau du tissu adipeux, de nombreux facteurs régulant la synthèse de leptine ont été répertoriés (Margetic *et al.*, 2002). Cette sécrétion est sensible aux statuts nutritionnel, physiologique et hormonal (Ahima & Flier, 2000, Gautron & Elmquist, 2011). Ainsi, chez le rongeur et l'Homme, une restriction alimentaire ou une période de jeûne induiront une diminution de la sécrétion de leptine tandis que la prise de nourriture et la suralimentation induiront une stimulation de la production de leptine (Porte *et al.*, 1998). L'insuline est l'un des facteurs hormonaux stimulant la production de leptine (Ceddia *et al.*, 1998) ; les hormones stéroïdes sexuelles en sont un autre exemple. En effet, chez l'Homme, elles modulent l'expression et la sécrétion de leptine. Un rôle stimulateur joué par les œstrogènes et un rôle inhibiteur joué par les androgènes sur les concentrations de leptine circulante ont été observés dans une étude menée chez des sujets transsexuels (Elbers *et al.*, 1997). De plus, une corrélation négative entre leptinémie et testostéronémie a été notée (Vettor *et al.*, 1997). Ceci concorde avec des résultats *in vitro* montrant une diminution importante de la sécrétion de leptine par des adipocytes humains traités avec de la testostérone (Wabitsch *et al.*, 1997). Cette régulation par les hormones sexuelles est probablement à l'origine d'une leptinémie plus élevée chez les femmes, indépendamment de leur indice de masse corporelle. En effet, il a été rapporté que la leptinémie est augmentée chez la femme comparée à l'homme, même à masse grasse égale (Wabitsch *et al.*, 1997, Licinio *et al.*, 1998, Ongphiphadhanakul *et al.*, 1999, Al Maskari & Alnaqdy, 2006). Lorsque les taux de leptine sont exprimés en fonction

de l'adiposité corporelle, les femmes ont des taux plus élevés que les hommes. Ceci pourrait être dû aux différences dans la distribution et le type de tissus adipeux entre les deux sexes. D'autre part, la sécrétion de leptine par le tissu adipeux dépend du rythme circadien diurne (Saladin *et al.*, 1995, Sinha *et al.*, 1996, Schoeller *et al.*, 1997, Saad *et al.*, 1998, Pu *et al.*, 2000, Kalra *et al.*, 2003). Effectivement, la sécrétion de leptine est plus importante durant la phase d'obscurité du cycle nyctéméral, ce qui correspond à la période d'activité pour les rongeurs et à l'inverse, à la période de sommeil pour l'Homme (Saladin *et al.*, 1995, Sinha *et al.*, 1996). Chez les rongeurs, l'hypersécrétion de leptine se produit en phase d'obscurité du cycle nyctéméral, ce qui correspond à leur phase d'activité {Xu, 1999 #7442, Pu *et al.*, 2000, Kalra *et al.*, 2003). En effet, L'augmentation de leptine plasmatique est donc associée avec le début de la prise alimentaire. Cette hypersécrétion durant la phase d'éveil est abolie par le jeûne chez les rongeurs (Saladin *et al.*, 1995). Contrairement à ce qui est observé chez les rongeurs, le taux plasmatique de leptine est plus élevé durant la phase de sommeil chez l'humain (Licinio *et al.*, 1997, Licinio *et al.*, 1998). L'augmentation nocturne de cette hormone est corrélée avec la rythmicité et l'heure de la prise alimentaire précédente (Schoeller *et al.*, 1997). Le rôle de cette rythmicité biologique dans le contrôle central de la prise alimentaire est pour l'instant mal défini. Elle pourrait intervenir dans la régulation au niveau périphérique d'autres acteurs moléculaires (comme la ghréline) impliqués dans les diverses fonctions de la leptine (Kalra *et al.*, 2003). De plus, à ces variations circadiennes se surimposent des pulsations irrégulières de la concentration plasmatique de leptine. La sécrétion de leptine par les adipocytes n'est donc pas continue mais pulsatile, caractérisée par des pics de sécrétion de faible amplitude mais de fréquence élevée (Licinio *et al.*, 1997, Bagnasco *et al.*, 2002). Sur une échelle de temps plus importante, cette sécrétion varie aussi en fonction de l'âge (Zhao *et al.*, 2002). Enfin, un pic de leptine postnatal a été mis en évidence chez la souris (Ahima *et al.*, 1998). Ce pic semble important pour le déclenchement de la puberté ainsi que pour le développement des connexions hypothalamiques régulant la prise alimentaire (Bouret, 2008).

La leptine participe à la régulation d'un panel de fonctions que nous décrirons succinctement dans la suite du manuscrit.

c. Principaux effets biologiques

La leptine a été considérée pendant quelques années comme une hormone « anti-obésité » en jouant un rôle clé dans la régulation du poids corporel (Ahima *et al.*, 1996, Elmquist *et al.*, 1999, Ahima & Flier, 2000, Ahima, 2000). A la lumière de nombreux travaux qui démontrent un profil d'expression ubiquitaire de son récepteur, cette conception initiale a été révisée en laissant entrevoir son rôle au niveau de nombreux tissus et organes dans la régulation de processus physiologiques variés (Margetic *et al.*, 2002, Deck *et al.*, 2017). La leptine s'avère être aussi impliquée dans le contrôle de la ventilation, nous le détaillerons dans un paragraphe dédié à la description de ce rôle.

- **Périphériques**

La leptine régule la balance énergétique, équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique, principalement en diminuant la prise alimentaire, en modulant la production de neurotransmetteurs dans l'hypothalamus, en augmentant la dépense énergétique et en contrôlant certaines sécrétions hormonales (Satoh *et al.*, 1997, Schwartz *et al.*, 1996b, Elmquist *et al.*, 1999, Ahima & Flier, 2000, Morrison, 2004, Morrison *et al.*, 2005, Myers & Simerly, 2010). Au contrôle de l'homéostasie énergétique, se sont rajoutés de nombreux autres effets biologiques de la leptine, notamment sur la fonction de reproduction (Margetic *et al.*, 2002, Moschos *et al.*, 2002), la régulation de la réponse immunitaire (Bennett *et al.*, 1996, Mikhail *et al.*, 1997, Gainsford & Alexander, 1999, Fantuzzi & Faggioni, 2000), la régulation de la masse osseuse (Reid & Comish, 2004). La liste des multiples fonctions périphériques de la leptine est loin d'être exhaustive, elle a pour simple ambition d'illustrer l'étendue et l'importance de ses actions dans la régulation de processus physiologiques majeurs. Deux revues de la littérature offrent un aperçu des effets périphériques relayés par la leptine qui ne sont pas cités dans ce manuscrit (Margetic *et al.*, 2002, Deck *et al.*, 2017).

- **Centraux**

Outre la régulation centrale de l'homéostasie énergétique, la leptine intervient dans des processus de plasticité synaptique, notamment dans certaines régions encéphaliques telles que l'hypothalamus, le cortex cérébral, l'hippocampe ou encore le cervelet. L'implication de la leptine dans le contrôle de certains processus cognitifs a été mise en évidence *in vivo* chez le rongeur dans des modèles d'obésité où le système leptinergique est rendu muet (Harvey, 2007). En effet, l'inactivation du gène *db* (ou *lepr*) codant pour le récepteur à la leptine chez les souris *db/db* ainsi que chez les rats Zucker est liée à des déficits d'apprentissages (Ohta *et al.*, 2003, Winocur *et al.*, 2005). Des études ont montré que la leptine pourrait influencer les performances mnésiques et les capacités d'apprentissage en modifiant la structure et l'excitabilité des neurones ainsi que la survie et la prolifération cellulaire (Harvey, 2007). Plus précisément, la leptine pourrait agir localement au niveau de la synapse (Harvey, 2007) pour réguler le fonctionnement du récepteur au glutamate NMDA (Shanley *et al.*, 2001) et des canaux potassiques de large conductance (Oomura *et al.*, 2006), permettant ainsi de moduler les processus de potentialisation (LTP) et dépression (LTD) à long terme (Li *et al.*, 2002). La leptine semble aussi capable de moduler la structure des neurones hypothalamiques et extra-hypothalamiques en favorisant notamment la croissance et l'arborisation neuritique (Oldreive *et al.*, 2008) et en modulant la morphogenèse du cône de croissance (Valerio *et al.*, 2006). Il semblerait aussi que la morphologie des astrocytes hypothalamiques soit modifiée suite à des injections intra-cérébro-ventriculaires de leptine (Garcia-Caceres *et al.*, 2011). Dernièrement, une étude a démontré que la délétion conditionnelle des récepteurs de la leptine exprimés dans les astrocytes hypothalamiques entraîne une modification de la morphologie astrocytaire, une diminution de la couverture astrocytaire et un changement du nombre et du type de synapses

au niveau des neurones POMC (pour pro-opiomélanocortine) et NPY (pour neuropeptide Y) du noyau arqué. La suppression de la prise alimentaire induite par la leptine a été diminuée chez ces souris. Ces données dévoilent un rôle actif des cellules gliales dans l'initiation de la plasticité synaptique hypothalamique et le contrôle central de l'alimentation (Kim *et al.*, 2014a). Enfin, la leptine agit aussi comme un agent neuroprotecteur en favorisant la survie neuronale et la prolifération cellulaire (Signore *et al.*, 2008), fonction particulièrement primordiale lors des périodes de développement des structures encéphaliques.

2. Les récepteurs à la leptine

Physiologiquement, la leptine agit en se fixant sur son récepteur. Cette liaison est responsable des différents effets précités de la leptine. En 1995, Tartaglia et collaborateurs (Tartaglia *et al.*, 1995) identifient sur le chromosome 4 le gène murin du récepteur de la leptine, *diabetes (db* ou encore *lepr*), à partir des cellules des plexus choroïdes. Par la suite, le gène *db* sera localisé chez l'Homme dans la région du chromosome 1. Il existe une homologie importante entre les récepteurs murins et humains, 78% pour le domaine extracellulaire et 71% pour le domaine intracellulaire (Tartaglia, 1997). Le récepteur de la leptine appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe 1 contenant notamment les récepteurs aux interleukines 2, 3, 4, 6, 7, à la prolactine et à l'Epo (Bazan, 1989). Six isoformes différentes du récepteur à la leptine nommées d'Ob-Ra à Ob-Rf ont été mises en évidence et sont produites par épissage alternatif à partir du gène *db* (Figure 46) (Wang *et al.*, 1996). Cinq isoformes ont un domaine transmembranaire tandis que l'isoforme Ob-Re, sans domaine ni transmembranaire ni intracellulaire, correspond à un récepteur soluble circulant (Figure 46) (Lee *et al.*, 1996, Friedman & Halaas, 1998). Les différentes isoformes du récepteur de la leptine possèdent un domaine extracellulaire commun de 816 acides aminés en position N-terminale comportant le site de liaison de la leptine (Fong *et al.*, 1998). Le segment transmembranaire ainsi que le domaine intracellulaire C-terminal du récepteur permettent de classer les différentes isoformes

en trois catégories i.e. une isoforme longue (Ob-Rb), des isoformes courtes (Ob-Ra,c,d,f) et une isoforme soluble (Ob-Re) (Figure 46) (Ahima & Flier, 2000).

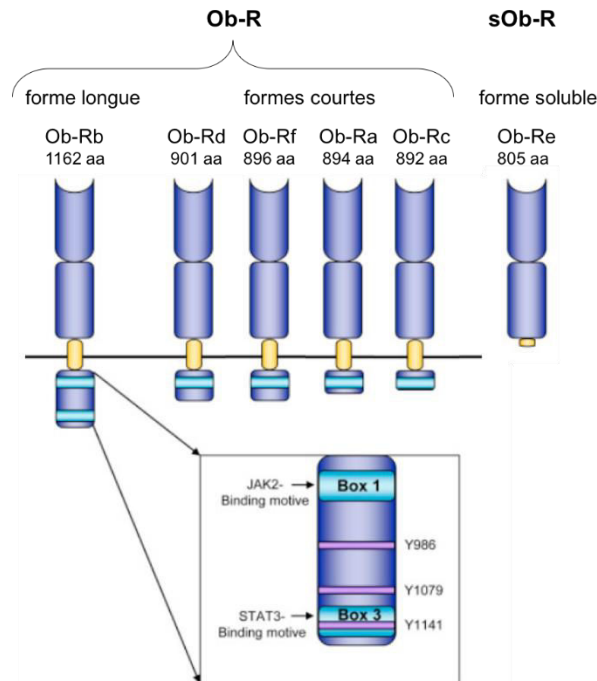


Figure 46 : Structure des 6 isoformes du récepteur Ob-R chez la souris

Les différentes isoformes du récepteur de la leptine possèdent un domaine extracellulaire commun comportant le site de liaison de la leptine. Cinq isoformes (longues et courtes) ont un domaine transmembranaire identique tandis qu'une isoforme (forme soluble) ne possède ni domaine transmembranaire ni domaine intracellulaire. (Fong et al., 1998). Seul le domaine intracellulaire de la forme longue du récepteur contient tous les motifs protéiques capables d'activer la voie de transduction du signal (Box1, Box2 ici non représenté, Box3) ainsi que trois tyrosines conservées correspondant aux positions Y985, Y1077 et Y1138. Les formes courtes possèdent un domaine intracellulaire tronqué, dépourvu des motifs Box2 et Box3 et sont donc moins capables d'activer les voies de signalisation induites par la fixation de la leptine. Adaptée d'après (Schaab & Kratzsch, 2015).

a. Le récepteur membranaire à la leptine (Ob-R)

Nous regroupons dans ce paragraphe les isoformes courtes et l'isoforme longue car elles ont la particularité de posséder en commun le domaine extracellulaire de 816 acides aminés en position N-terminale comportant le site de liaison de la leptine et le domaine transmembranaire de 34 acides aminés. En revanche, leur domaine intracellulaire C-terminal est variable (Figure 46).

L'isoforme longue Ob-Rb

- Description

Chen et collaborateurs ont pu isoler l'isoforme longue de Ob-R, l'Ob-Rb (Chen *et al.*, 1996). Le domaine intracellulaire C-terminal est composé de 302 acides aminés. Cette isoforme

est la seule à posséder un domaine intracellulaire complet, comportant les motifs nécessaires à la fixation des protéines JAK (Janus Kinase) et STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et donc à la transduction du signal. La mutation de cette isoforme retrouvée chez les souris *db/db* (Lee et al., 1996, Chen et al., 1996) conduit à l'obésité et à une déficience de la voie de signalisation « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT) induite par la leptine (Ghilardi *et al.*, 1996), suggérant son rôle prépondérant dans l'établissement des voies de signalisation induites par la leptine. Ob-Rb peut donc être considérée comme l'isoforme la plus importante du récepteur de la leptine.

- Mécanisme d'action

Ob-Rb ne possède pas d'activité kinase intrinsèque comme tous les récepteurs aux cytokines de type 1. La présence de protéines tyrosines kinases constitutivement associées au récepteur est donc nécessaire à la transduction du signal (Baumann *et al.*, 1996, Devaskar *et al.*, 1997). Ce sont les protéines JAK-2 (Janus Kinase 2) qui remplissent ce rôle. En effet, Ob-Rb possède au niveau de son domaine intracellulaire des domaines de liaisons aux protéines kinases JAK-2 ainsi qu'aux protéines STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), toutes deux impliquées dans la cascade de signalisation décrite (Baumann et al., 1996, Bahrenberg *et al.*, 2002). Bien qu'initialement Ob-Rb soit considérée comme la seule isoforme capable d'activer les voies de signalisation induites par la leptine, des études ont montré que l'isoforme courte pouvait également participer à la régulation de ces voies mais cela reste encore à ce jour controversé. En absence de leptine, les Ob-Rb sont présentes au niveau de la membrane plasmique sous la forme de monomères ou d'homodimères. Quand la leptine est présente, elle interagit avec Ob-Rb selon une stœchiométrie de 1:1, conduisant à la formation de complexes tétramériques récepteur-ligand (Devos *et al.*, 1997) composés de deux molécules de leptine et de deux molécules d'Ob-Rb. La dimérisation du récepteur par la fixation de la leptine induit un changement conformationnel de ce dernier permettant l'activation des protéines JAK par transphosphorylation (Ihle & Kerr, 1995, Ihle *et al.*, 1998, Couturier & Jockers, 2003, Biener *et al.*, 2005, Niv-Spector et al., 2005). La transduction du signal de la leptine est majoritairement médiée par la protéine JAK2 (Ghilardi et al., 1996, Ghilardi & Skoda, 1997, Bjorbaek *et al.*, 1997, Bjorbaek & Kahn, 2004) ainsi que par JAK1 dans une moindre mesure (Bjorbaek et al., 1997). Une fois activées, les protéines JAKs phosphorylent le domaine intracellulaire du récepteur au niveau de plusieurs résidus tyrosine. Chaque tyrosine phosphorylée permet le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques et ainsi l'initiation des différentes voies de signalisation comme JAK2/STAT3 qui est particulièrement impliquée dans la régulation de la prise alimentaire par la leptine au niveau hypothalamique mais aussi les voies IRS/PI3K (Insulin Receptor Substrate/Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Benomar *et al.*, 2005a, Benomar *et al.*, 2005b, Bjorbaek et al., 1997, Niswender *et al.*, 2004) et la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Bjorbaek et al., 1997).

- **Localisation**

A l'origine, l'isoforme Ob-Rb a exclusivement été décrite dans le SNC (Couce *et al.*, 1997), par opposition aux isoformes courtes, décrites en périphérie. Depuis, une expression d'Ob-Rb à un niveau faible (Chen *et al.*, 1999) a aussi été mise en évidence au niveau d'organes périphériques tels que le tissu adipeux, les glandes médullosurrénales, les reins, les poumons, le cœur, les muscles, les intestins, le pancréas, le foie, la glande mammaire et le placenta (Fei *et al.*, 1997, Tsuchiya *et al.*, 1999, Hoggard *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000).

Au niveau du SNC, cette isoforme est majoritairement exprimée par l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex frontal, le thalamus, le cervelet, l'amygdale et la substance noire ou encore certains noyaux du tronc cérébral (Mercer *et al.*, 1996, Elmquist *et al.*, 1998, Elmquist *et al.*, 1997, Hakansson *et al.*, 1998, Grill *et al.*, 2002, Funahashi *et al.*, 2003, Burgos-Ramos *et al.*, 2010). Au sein de l'hypothalamus, Ob-Rb est majoritairement exprimé par les neurones orexigènes et anorexigènes du noyau arqué (Mercer *et al.*, 1996, Cheung *et al.*, 1997, Schwartz *et al.*, 1997, Elmquist *et al.*, 1998, Baskin *et al.*, 1999, van den Top *et al.*, 2004), des noyaux dorso- et ventro-médians (Funahashi *et al.*, 1999) ainsi que de l'aire hypothalamique latérale (Leininger *et al.*, 2009, Leininger, 2011), du noyau paraventriculaire (Mercer *et al.*, 1996, Hakansson *et al.*, 1998, Scott *et al.*, 2009), du noyau supra-optique (Hakansson *et al.*, 1998) et du noyau prémamillaire ventral (Donato *et al.*, 2011). Au sein du tronc cérébral, Ob-Rb peut être exprimé au niveau du noyau du tractus solitaire, du noyau parabrachial, du locus coeruleus, de la partie rostrale du bulbe ventro-latéral et du complexe de Bötzing (Elias *et al.*, 2000, Grill *et al.*, 2002, Grill & Hayes, 2009, Bassi *et al.*, 2012, Bassi *et al.*, 2016). L'isoforme Ob-Rb est physiologiquement fonctionnelle dans le tronc cérébral ainsi que dans l'hypothalamus (Hosoi *et al.*, 2002). Autant de structures hypothalamiques et du tronc cérébral impliquées dans la CCR et sa modulation laissant présager un rôle non négligeable de la leptine dans la genèse de la ventilation et de sa modulation.

Les astrocytes expriment aussi Ob-Rb, suggérant l'importance de ce type cellulaire dans la régulation centrale leptinergique (Pan *et al.*, 2008, Hsuchou *et al.*, 2009a, Hsuchou *et al.*, 2009b, Pan *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2014a).

Les isoformes courtes Ob-Ra, c, d, f

- **Description**

Ob-Ra, c, d et f, sont les isoformes courtes du récepteur. Elles possèdent un domaine intracellulaire C-terminal tronqué de 30 à 40 acides aminés par rapport à la forme longue Ob-Rb qui en possède 302. Ce sont les travaux de Tartaglia qui ont les premiers caractérisé l'une des isoformes du récepteur de la leptine, Ob-Ra dans le plexus choroïde de souris (Tartaglia *et al.*, 1995). Ces isoformes sont parfois présentées comme des transporteurs potentiels de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Tartaglia *et al.*, 1995, Banks *et al.*, 1996, Hileman *et al.*, 2002, Bouret, 2008). Les mécanismes de transport de la leptine depuis la

périphérie jusqu'au SNC ne sont pas encore totalement décryptés et seront présentés dans le paragraphe suivant. Les autres isoformes pourraient jouer un rôle non seulement de transport de la leptine mais aussi de clairance et de relargage de leptine (Tartaglia, 1997). Le fait que leur domaine intracellulaire soit réduit par rapport à l'isoforme longue Ob-Rb soulève un doute concernant leur capacité à activer les voies de signalisation induites par la fixation de la leptine. Certaines études ont montré qu'Ob-Ra était capable d'activer la voie de signalisation MAPK (Bjorbaek et al., 1997, Yamashita *et al.*, 1998) tandis que d'autres auteurs supposent qu'Ob-Ra ne possède pas les motifs intracellulaires nécessaires à l'activation des JAKs (Kloek *et al.*, 2002).

- **Mécanisme d'action**

Des injections intraveineuses de leptine radio-marquée ont permis de caractériser son transport du compartiment sanguin dans lequel elle circule partiellement liée à la forme soluble de son récepteur ou aux protéines plasmatiques, (Bouret, 2008, Lammert *et al.*, 2001) vers le SNC. Ces études ont montré qu'en conditions physiologiques, la leptine est transportée selon un mécanisme unidirectionnel et partiellement saturable (Banks et al., 1996, Banks et al., 1999, Burguera *et al.*, 2000). Après analyse des autoradiogrammes, un marquage est présent au niveau du noyau arqué, de l'éminence médiane et des plexus choroïdes, structures identifiées pour leur implication dans le transport de la leptine (Maresh et al., 2001, Banks & Lebel, 2002, Banks, 2004). Au niveau moléculaire, des études menées *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que la leptine pénétrerait dans ces structures par l'intermédiaire d'un transporteur (Banks et al., 1996, Maresh et al., 2001). Deux protéines pourraient être candidates i.e. la forme tronquée du récepteur de la leptine, Ob-Ra, qui est exprimée dans les plexus choroïdes (Tartaglia et al., 1995, Devos et al., 1996), les micro-vaisseaux de la BHE (Kastin et al., 1999, Kastin & Pan, 2000, Hileman et al., 2002) et l'éminence médiane (Balland et al., 2014) et la mégaline, protéine impliquée dans les processus d'endocytose et exprimée par les plexus choroïdes (Dietrich et al., 2008). La leptine traverserait la BHE probablement par endocytose médiée à partir du récepteur Ob-Ra (liaison et internalisation de la leptine). En l'état actuel des connaissances, les mécanismes de transport de la leptine depuis la périphérie jusqu'au SNC sont très peu décrits mais représentent un sujet d'étude essentiel à la compréhension de désordres métaboliques tels que l'obésité ou la leptino-résistance (Couce *et al.*, 2001, Banks & Farrell, 2003, Balland et al., 2014).

- **Localisation**

Les isoformes courtes d'Ob-R ont une vaste distribution tissulaire et sont essentiellement exprimées au niveau des tissus périphériques comme les poumons, les reins, les gonades, le tissu adipeux, l'endothélium vasculaire, le foie, la rate, le rein, l'estomac (Lollmann *et al.*, 1997). Au niveau central, Ob-Ra et Ob-Rc sont présents au niveau des plexus choroïdes, de l'éminence médiane ainsi que des micro-vaisseaux de la BHE et dans l'hypothalamus (Tartaglia et al., 1995, Hileman et al., 2002).

b. Le récepteur soluble à la leptine (sOb-R) – L'isoforme Ob-Re

- Description

L'isoforme Ob-Re est dépourvue du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire C-terminal mais possède le domaine extracellulaire N-terminal de liaison à leptine de 816 acides aminés (Figure 46, page 129) (Ahima & Flier, 2000). Il est donc capable de fixer la leptine mais n'a pas la capacité d'activer les voies de signalisation leptinergiques.

- Mécanisme d'action

Ce récepteur circulant ou soluble est qualifié de protéine de liaison de la leptine (Li *et al.*, 1998, Lammert *et al.*, 2001). Ses principales fonctions proposées seraient de stabiliser la leptine plasmatique, de réguler la proportion de leptine libre dans le plasma et donc son action biologique (Lou *et al.*, 2010). Une autre hypothèse présente Ob-Re comme un antagoniste au passage de la leptine par la barrière hémato-encéphalique, la piégeant ainsi dans le compartiment plasmatique (Pan *et al.*, 2008, Tu *et al.*, 2008). L'ARNm codant pour Ob-Re est présent chez la souris et le rat mais aucun ARNm correspondant n'a été découvert chez l'Homme alors que la protéine Ob-Re est bien présente dans le plasma (Chua *et al.*, 1997). Ob-Re humain n'est donc pas produit par épissage alternatif. Différentes études ont suggéré que la forme humaine d'Ob-Re résulterait d'un clivage protéolytique d'Ob-Ra ou d'Ob-Rb au niveau de leur domaine extracellulaire (Maamra *et al.*, 2001, Ge *et al.*, 2002). Ce processus de clivage pourrait jouer un rôle majeur dans le contrôle des effets physiologiques assurés par la leptine. En effet, des études chez l'Homme ont montré que l'obésité est associée à une baisse d'Ob-Re circulant dans le plasma tandis qu'une perte de poids est associée à son augmentation (van Dielen *et al.*, 2002). A l'inverse, d'autres études n'ont montré aucune différence dans la concentration plasmatique d'Ob-Re chez les patients obèses, cependant ceux-ci présentaient environ 75% d'Ob-Re lié à la leptine, contre seulement 33% chez les sujets sains. Dans tous les cas, la majorité de la leptine circule sous forme libre chez les individus obèses (Wu *et al.*, 2002).

- Localisation

L'isoforme Ob-Re est libre dans le plasma. Elle est exprimée par les plexus choroïdes au niveau central et par le foie, les poumons, le cœur, la rate, les reins ou encore les testicules au niveau périphérique (Lollmann *et al.*, 1997).

3. La leptine et la ventilation

La plupart des études animales et humaines portant sur les effets ventilatoires de la leptine ont été réalisées en utilisant le modèle murin déficient en leptine (*ob/ob*) ou des sujets atteints du syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (OHS) (Yee *et al.*, 2006, Campo *et al.*, 2007, Redolfi *et al.*, 2007, Phipps *et al.*, 2002) car cette pathologie décrit un phénotype

ventilatoire similaire aux souris *ob/ob*. Ces différentes études convergent vers l'hypothèse que la leptine est un stimulant respiratoire indépendamment du poids.

a. Effet sur la ventilation de base

Les souris *ob/ob* déficientes en leptine présentent une hyperphagie, une obésité morbide, un diabète, des anomalies neuroendocriniennes et une infertilité (Lindstrom, 2007). D'un point de vue du phénotype ventilatoire, ces souris ont une ventilation caractérisée par une hypoventilation et une diminution de la réponse ventilatoire au CO₂ (Figure 47). En effet, leur \dot{V}_E basale et en condition hypercapnique, même si significativement plus élevée par rapport à des souris sauvages, demeure plus faible que chez des individus de même poids (Tankersley *et al.*, 1996, Tankersley *et al.*, 1998, O'Donnell *et al.*, 1999, O'Donnell *et al.*, 2000, Groeben *et al.*, 2004). En effet, ces modifications ventilatoires observées chez les souris *ob/ob* ne sont pas présentes chez des souris sauvages où les voies leptinergiques ne sont pas altérées mais qui sont rendues obèses par un régime riche en graisses. Les souris WT obèses ont donc un phénotype ventilatoire adapté à leurs conditions physiologiques à l'inverse des souris *ob/ob*. En effet, l'augmentation de la masse corporelle chez des souris obèses entraîne une augmentation de leurs besoins métaboliques (i.e. consommation O₂ et production CO₂) et donc une augmentation de la ventilation par rapport à des sujets non obèses dont les besoins métaboliques sont moindres, permettant ainsi le maintien de leur homéostasie. Cela est à mettre en relation avec l'augmentation de leur concentration plasmatique en leptine par rapport aux souris WT non obèses et sous-tend l'implication de la leptine dans la stimulation de la ventilation permettant de répondre aux exigences mécaniques et métaboliques imposées par l'obésité sur le système respiratoire. Cette élévation du régime ventilatoire observée également chez les souris *ob/ob* ne leur permet de maintenir une homéostasie car elle est insuffisante par rapport à des souris sauvages obèses. Les souris *ob/ob* ont une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie avant la survenue de l'obésité caractéristique de l'âge adulte, ce qui est un argument en faveur d'un rôle propre de la déficience en leptine sur le système ventilatoire (Tankersley *et al.*, 1996, Malli *et al.*, 2010). Elles développent par la suite un régime ventilatoire rapide en augmentant leur poids corporel (Tankersley *et al.*, 1996). L'administration prolongée de leptine empêche les modifications de ce régime ventilatoire (Tankersley *et al.*, 1998). L'administration en aiguë de la leptine augmente la ventilation basale et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie à l'éveil et durant le sommeil (Figure 47) (O'Donnell *et al.*, 1999).

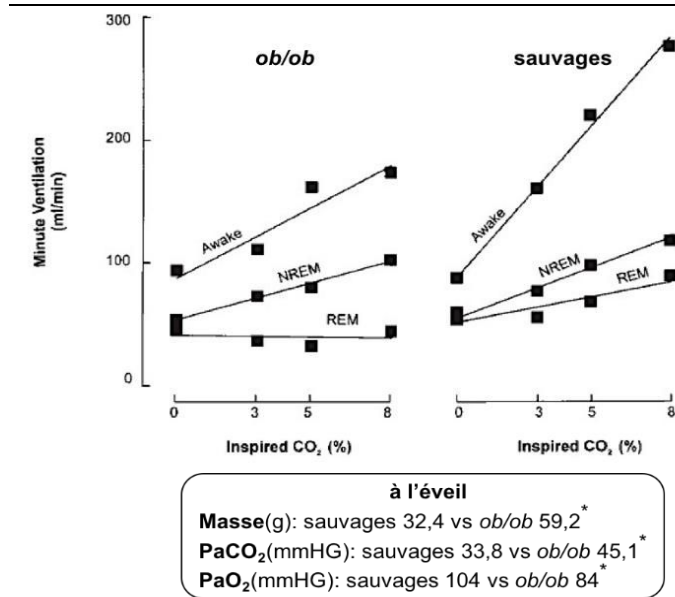


Figure 47 : Phénotype ventilatoire des souris *ob/ob*

Chez une souris *ob/ob* adulte, la réponse ventilatoire à l'augmentation croissante du taux de CO₂ inspiré est atténuée dans les trois états de sommeil lent (NREM), paradoxal (REM) et à l'éveil, comparée à celle d'une souris sauvage adulte. Les souris *ob/ob* hypoventilent car leurs PaCO₂ et PaO₂ sont respectivement augmentées et diminuées significativement par rapport à des souris sauvages. *P < 0,001 *ob/ob* versus sauvages. D'après (O'Donnell et al., 1999)

En effet, l'hypothèse d'une action directe et centrale de la leptine sur le phénotype ventilatoire est confirmée par la supplémentation systémique ou centrale en leptine chez les souris *ob/ob*. L'injection systémique en continu pendant 3 jours, via une mini pompe osmotique implantée à des souris *ob/ob*, rétablit une ventilation normale en condition basale sans variation du poids corporel, ce qui est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle indépendant des modifications de la masse corporelle (Figure 48) (O'Donnell et al., 1999). De plus, une injection de leptine au niveau du quatrième ventricule provoque la récupération d'un phénotype ventilatoire homéostatique chez les souris *ob/ob* (Bassi et al., 2012). Aussi, une perfusion intraveineuse de leptine pendant 60 min a provoqué une augmentation durable de l'amplitude du signal électrique enregistrée au niveau du nerf phrénique chez des rats, soutenant le rôle de la leptine comme facilitateur de la ventilation (Chang *et al.*, 2013). Dès que la supplémentation en leptine cesse, les souris *ob/ob* retrouvent leur phénotype ventilatoire caractéristique, à savoir une hypoventilation et une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

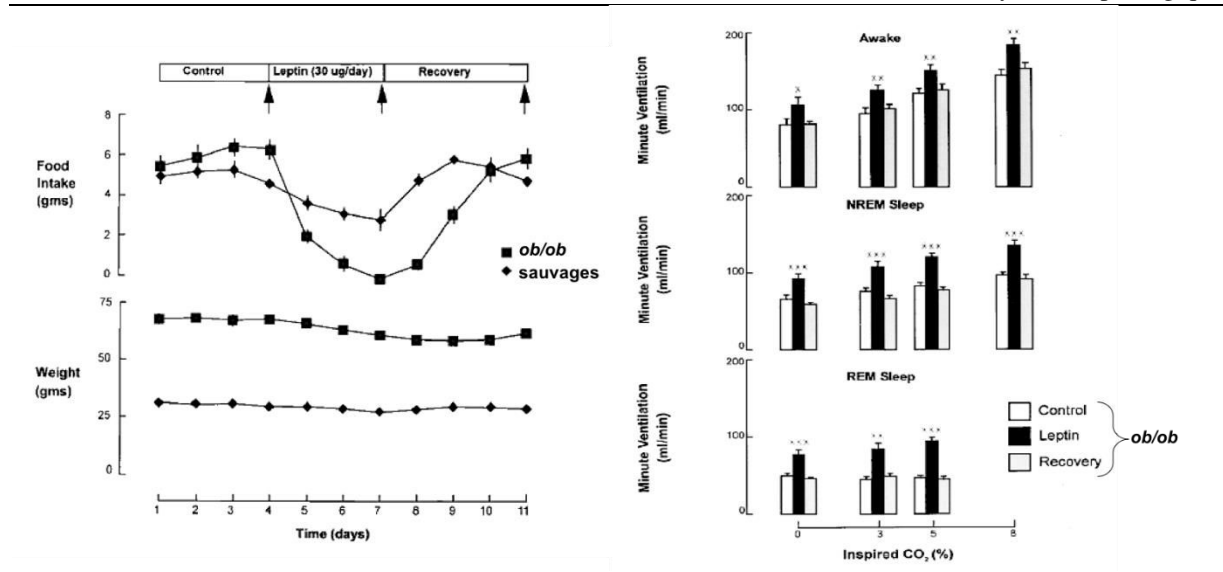


Figure 48 : Effet d'une supplémentation en leptine sur la ventilation des souris *ob/ob*
 A gauche, représentation graphique montrant l'effet de 3 jours de perfusion de leptine à 30 mg/jour sur la prise alimentaire et le poids de souris *ob/ob* et sauvages. Les flèches vers le haut indiquent les jours où les variables ventilatoires ont été collectées. A droite, représentation graphique de la réponse ventilatoire à l'augmentation croissante du taux de CO₂ inspiré chez des souris *ob/ob* avant, pendant et après la supplémentation en leptine lors du sommeil lent (NREM), paradoxal (REM) et à l'éveil. La perfusion de leptine stimule la ventilation chez les souris *ob/ob* à tous les taux de CO₂ inspiré et dans tous les états de vigilance par rapport aux conditions de contrôle et de récupération. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 control versus recovery. D'après (O'Donnell et al., 1999)

L'ensemble de ces résultats suggère que la leptine est un puissant stimulant ventilatoire réversible et indépendant du poids en condition basale dont l'action est centrale. Son action semblerait intervenir à court terme puisque les effets sont observables quelques minutes après une supplémentation.

b. Effet sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

Les souris *ob/ob* présentent également, nous l'avons vu, une réponse ventilatoire hypercapnique réduite qui est corrigée par une supplémentation systémique ou centrale en leptine (Figure 47, page 135 et Figure 48) (Tankersley et al., 1996, Tankersley et al., 1998, O'Donnell et al., 1999, O'Donnell et al., 2000, Bassi et al., 2012, Bassi et al., 2014). La leptine semble donc être également un stimulant de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Cependant, la cause de l'obésité chez les souris *ob/ob* est différente de celle chez l'humain qui est fréquemment associée à une hyperleptinémie (Malli et al., 2010, Caro et al., 1996a). Il existe quelques rares cas humains de déficience en leptine, à l'origine d'une obésité morbide et d'un phénotype ventilatoire altéré caractérisé par une hypoventilation et une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, décrit dans littérature (Montague et al., 1997). Récemment, de jeunes patients présentant une déficience congénitale en leptine avec un phénotype ventilatoire similaire à celui décrit chez les souris *ob/ob* ont été traités avec de la

leptine recombinante. Une restitution d'un phénotype ventilatoire homéostatique a été observée avec une augmentation du \dot{V}_E basal et une amélioration de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Lucaccioni et al., 2015). Contrairement aux attentes, les patients OHS avaient souvent des niveaux élevés de leptine par rapport aux patients sains (Caro et al., 1996a, Phipps et al., 2002, Shimura *et al.*, 2005, Yee et al., 2006, Campo et al., 2007, Malli et al., 2010). En effet, chez des sujets obèses à IMC égal, le taux de leptine plasmatique est augmenté par rapport à des sujets non obèses et suit la même tendance que la PaCO_2 (Maffei et al., 1995, Considine et al., 1996). La mesure de la réponse ventilatoire au CO_2 et celle de la pression d'occlusion $P_{0,1}$ mesurée à l'ouverture des voies aériennes supérieures, deux tests évaluant l'adaptation de la CCR au stimulus CO_2 , est altérée chez des sujets OHS mais se corrige après la mise en route d'une assistance ventilatoire (VNI) (Redolfi et al., 2007). Lors de la mise en route d'un traitement par ventilation non invasive (VNI) visant à corriger l'hypoventilation de ces patients, deux variations opposées de la concentration plasmatique en leptine ont été mises en évidence. Ainsi, les patients OHS qui améliorent l'hypoventilation sous VNI présentent soit un taux plasmatique de leptine réduit (Yee et al., 2006) soit une augmentation du taux de leptine plasmatique (Redolfi et al., 2007) par rapport aux patients OHS sans VNI. Deux mécanismes pouvant expliquer ces différences ou ces incohérences sont alors décrits. D'une part une résistance périphérique à la leptine et d'autre part une carence en leptine. Dans le cas d'une résistance à la leptine, les patients présentent avant la mise en place de la VNI des taux de leptine largement supérieurs à ceux de sujets obèses eucapniques à IMC équivalent. Cette augmentation des taux de leptine, décrite précédemment comme stimulant respiratoire, pourrait être un mécanisme mis en place afin de contrer l'hypoventilation installée en stimulant la ventilation. Ce mécanisme ne semble pas opérant chez ces patients qui continuent d'hypoventiler malgré des taux élevés de leptine et suggère donc l'existence d'une résistance à la leptine. De ce fait, la diminution de l'hypoventilation par la VNI aurait pour effet de diminuer les taux de leptine circulants de ces patients. Les mécanismes à l'origine de cette résistance à la leptine sont mal compris à ce jour mais différentes pistes restent plausibles *i.e.* anomalie du transport à travers la BHE vers le LCR mis en évidence par une décroissance du ratio $[\text{Lep}]_{\text{LCR}}/[\text{Lep}]_{\text{plasma}}$ dans l'obésité (Figure 43, page 121) (Caro et al., 1996a, Schwartz et al., 1996a), anomalie du transport vers les sites d'action au niveau du SNC (Van Heek *et al.*, 1997), anomalie de transduction du signal au niveau du récepteur de la leptine Ob-R (Munzberg *et al.*, 2005). Dans le cas d'une carence en leptine, les patients présentent des taux de leptine relativement bas par rapport à des sujets obèses eucapniques. Ceci pourrait être expliqué par l'hypoxémie sévère toxique pour les adipocytes qui ne peuvent dès lors plus synthétiser la leptine et par la fragmentation du sommeil, phase de production de la leptine (Redolfi et al., 2007). Ainsi, la VNI, en augmentant la durée et la qualité du sommeil mais aussi en corrigeant l'hypoxémie, réduit les effets néfastes sur la production de la leptine, celle-ci se retrouvant donc augmentée.

Les discordances fréquemment observées dans les études animales et humaines suggèrent que la physiopathologie des fonctions respiratoires de la leptine est complexe et reste à clarifier par d'autres études et notamment des études plus fondamentales (Malli et al., 2010).

- **Actions**

Des expériences de micro-injections centrales de leptine suggèrent des effets directs de la leptine sur les structures élaborant ou régulant la CCR au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus. Au niveau du tronc cérébral, il a été démontré chez le rat *in vivo* que des micro-injections de leptine dans le NTS (Inyushkin *et al.*, 2009, Inyushkina *et al.*, 2010) sont associées à des changements respiratoires, tels qu'une augmentation dose-dépendante du V_E accompagnée d'une augmentation de l'amplitude de l'EMG intégré des muscles intercostaux externes et du diaphragme, en conditions basales et en réponse à l'augmentation croissante de CO_2 inspiré. De plus, des micro-injections *in vivo* chez la souris *ob/ob*, au niveau de la partie rostrale du bulbe ventro-latéral contenant notamment les noyaux A_1C_1 , améliore la ventilation basale et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de manière à récupérer un phénotypique ventilatoire semblable à celui de souris sauvages, indépendamment des changements dans le poids corporel (Bassi et al., 2014, Bassi *et al.*, 2015b). Ces résultats suggèrent que les effets ventilatoires stimulants de la leptine en normocapnie et en hypercapnie sont médiés au moins en partie par les neurones du NTS, de la région rostrale et ventro-latérale du bulbe rachidien (Figure 49).

Enfin, des micro-injections de leptine au niveau du RTN/pFRG chez des souris *ob/ob* pendant 3 jours (Bassi et al., 2014) sont corrélées à une augmentation de la ventilation basale et à une amélioration de la chémosensibilité au CO_2 semblable à celle observée chez des souris sauvages, indépendamment des changements dans le poids corporel. D'autre part, des tests *in vitro* n'ont montré aucun effet du traitement aigu (10 minutes) par la leptine sur la sensibilité au CO_2/H^+ des neurones chémosensibles ou des astrocytes du RTN et sur l'excitabilité des neurones chémosensibles du RTN dans des tranches de bulbes chez le rat (Bassi *et al.*, 2013). Ces résultats contradictoires pourraient être liés aux différentes espèces étudiées (souris *versus* rat) ou bien parce que les effets de la leptine sur la chémosensibilité centrale au CO_2/H^+ pourraient dépendre de son action chronique. Il est également possible que la leptine n'agisse pas directement sur les neurones chémosensibles ou les astrocytes du RTN. En effet, la leptine pourrait agir sur d'autres neurones non chémosensibles qui font partie des circuits neuronaux impliqués dans le chémoréflexe, comme ceux situés dans la RVLN et dans le complexe Böttinger dans lequel les Ob-Rb sont présents (Barnes *et al.*, 2010, Bassi et al., 2012) (Figure 49). De plus, nous n'avons trouvé aucune preuve que les récepteurs de la leptine sont présents sur les neurones chémosensibles ou les astrocytes du RTN. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'activité des neurones ou des astrocytes du RTN n'est pas modulée par la leptine sur une courte échelle de temps.

Au niveau de l'hypothalamus, des micro-injections *in vivo* chez le rat pendant 6 jours dans un ventricule latéral (Bassi et al., 2015b) augmentent la ventilation basale et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, ce qui suggère une action de la leptine via l'hypothalamus. De plus, quand les récepteurs à la mélanocortine MC3/4 sont bloqués, l'effet potentialisateur de la leptine sur la ventilation quand elle est injectée au niveau d'un ventricule latéral suggère l'implication du système de la mélanocortine dans la médiation des effets de la leptine sur la ventilation (Figure 49).

La leptine pourrait agir directement via sa liaison à ses récepteurs Ob-Rb dont nous avons vu la distribution au sein du SNC et notamment sur des structures respiratoires essentielles à la CCR et sa modulation mais elle pourrait aussi agir de manière indirecte via les récepteurs à la mélanocortine (MC3/4R) (Figure 49) (Bassi et al., 2015b). En effet, la leptine dépolarise les neurones à POMC du noyau arqué qui vont libérer un peptide, l' α -MSH (pour alpha-melanocyte-stimulating hormone), qui peut en se fixant activer les récepteurs MC3/4R localisés dans plusieurs noyaux hypothalamiques et bulbaires, notamment les noyaux paraventriculaires (PVN) et périfornical (PeF) et dorso-médian (DM), l'aire hypothalamique latérale (LH), le NTS et la RVLM au niveau de la VLM (Figure 49) (Bassi et al., 2015b).

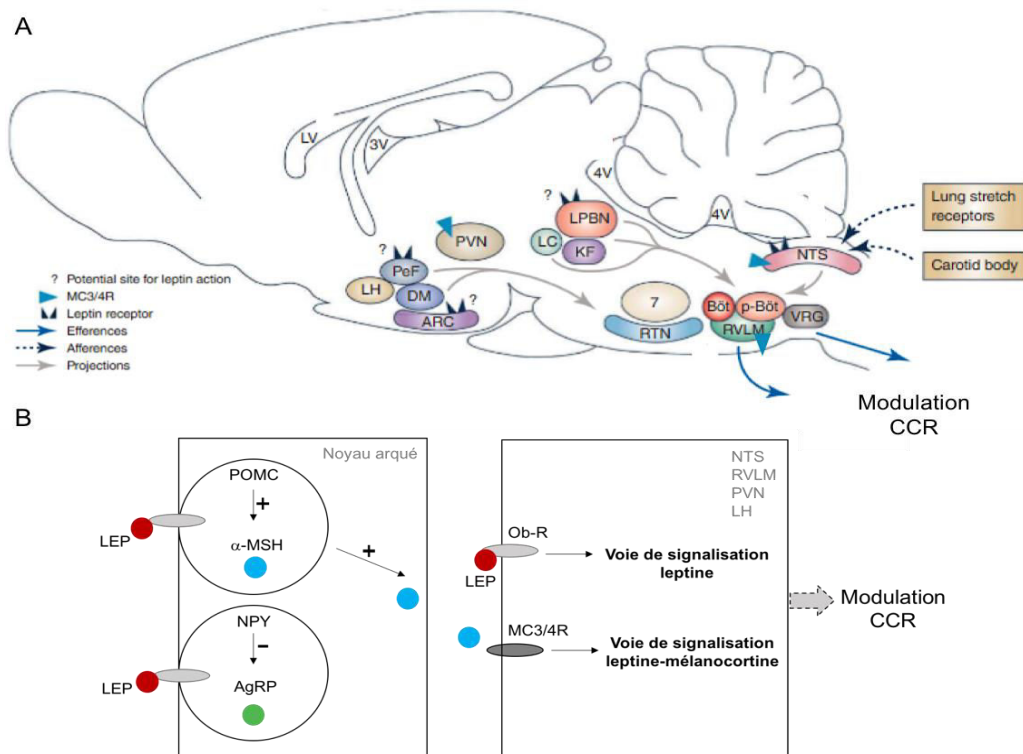


Figure 49 : Sites et mécanismes d'action potentiels de la leptine afin de moduler la CCR
A. Représentation schématique montrant la distribution des sites d'actions possibles de la leptine dans le SNC pouvant être impliqués dans la modulation de la CCR. La leptine peut agir directement dans différentes structures encéphaliques respiratoires qui expriment son récepteur mais aussi indirectement dans des structures encéphaliques respiratoires qui expriment les récepteurs 3 et 4 à la mélanocortine. Adaptée de (Bassi et al., 2016). B. Mécanisme d'action éventuel de la leptine illustrant la voie directe de signalisation leptinergique et la voie indirecte de signalisation leptine-mélanocortine. La leptine agit directement via l'intermédiaire de ses

récepteurs spécifiques ou indirectement par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs à la mélanocortine. Au niveau des neurones à POMC et à NPY du noyau arqué, la liaison de la leptine sur son récepteur provoque respectivement une augmentation de la sécrétion d' α -MSH et une baisse de la sécrétion de NPY. L' α MSH, en se fixant sur les récepteurs mélanocytaires MC3/4R, pourrait être capable d'induire des effets ventilatoires. ARC : noyau arqué ; DM : noyau dorso-médian ; LH : aire hypothalamique latérale ; LV : ventricule latéral ; PeF : noyau perifornical ; PVN : noyau paraventriculaire ; KF : noyau de Kölliker-Fuse ; LBPN : noyau parabrachial latéral ; LC : locus coeruleus ; RVLM : partie rostrale du bulbe ventro-latéral ; RTN : noyau retrotrapézoïde ; NTS : noyau du tractus solitaire ; VRG : groupe respiratoire ventral ; 7 : noyau facial ; Böt : complexe de Bötzinger ; p-Böt : complexe de pré-Bötzinger ; NPY : neuropeptide Y ; AgRP : agouti-related protein ; POMC : neurones à pro-opiomélanocortine ; α -MSH : α -mélanine stimulating hormone ; MC3/4R : récepteurs à la mélanocortine de type 3 et 4. © Anne-Sophie Perrin-Terrin

Dans un tel contexte, un des objectifs de ce travail doctoral a été de mieux comprendre les modalités d'action de la leptine sur la CCR en condition normocapnique et hypercapnique par l'étude de souris *ob/ob* et leurs témoins. L'ensemble des expériences avait pour but de déterminer quelles sont les structures centrales dont l'activité est modulée par la leptine, et ce notamment dans des conditions d'hypercapnie.

METHODOLOGIES EXPERIMENTALES

Ce travail doctoral repose sur trois grandes approches expérimentales distinctes :

- La technique de pléthysmographie corps entier a permis d'évaluer les variables ventilatoires de souris *in vivo* ;
- La technique d'électrophysiologie a permis d'apprécier la CCR par l'enregistrement de l'activité électrique de la 4^e racine cervicale ventrale sur des préparations *ex vivo* de système nerveux central isolé qui contiennent le bulbe rachidien et la moelle épinière ;
- La technique de détection immunohistochimique de la protéine c-FOS couplée à la détection de certains marqueurs phénotypiques neuronaux a permis de mettre en évidence et de caractériser les structures respiratoires activées lors de différents stimuli expérimentaux.

La comparaison des données obtenues *in vivo* et *ex vivo* dans différentes conditions expérimentales nous a permis de proposer des mécanismes d'action de ces molécules, impliquant ou pas les structures périphériques et supra-bulbaires en plus des structures respiratoires bulbaires. Ces informations récoltées nous ont permis d'écrire l'histoire, parfois encore incomplète, de nos trois molécules d'intérêt sur leur implication dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

Les paragraphes qui vont suivre sur chacune des techniques n'ont pas vocation à décrire dans les détails ces trois approches mais plutôt de rappeler succinctement leurs principes généraux. Les précisions expérimentales se trouvent dans les articles ou manuscrits à soumettre réalisés au cours du doctorat et présentés dans la partie des résultats.

I. Pléthysmographie corps entier

La pléthysmographie corporelle totale animale est née en 1868 grâce aux idées pionnières à la base de cette technique de Paul Bert, décrites le 28 mars 1868 dans un article lu à la Société de biologie de Paris s'intitulant « Changement de pression de l'air dans le poumon pendant les deux temps de l'acte respiratoire » (Huard, 1979, Jacquemin & Varene, 1968). Par la suite, dans « Leçons sur la physiologie comparée de la respiration » professées au Muséum d'histoire naturelle et publiées en 1870, le physiologiste français décrit un appareil permettant d'enregistrer les variations de la tension aérienne intra-pulmonaire d'un animal placé dans une cloche tubulée reliée à un polygraphe de Marey et déclare que cet appareil est « un moyen fort commode d'enregistrer la respiration des animaux, moyen qui pourrait être fort précieux si l'on voulait mettre en expérience les animaux rares, ou très farouches et dangereux à manier » (Huard, 1979, Jacquemin & Varene, 1968). Cette technique sera perfectionnée plus tard (Chapin, 1954, Drorbaugh & Fenn, 1955, Bartlett & Tenney, 1970, Mortola & Frappell, 1998) et introduite en clinique par Arthur B. Dubois en 1955 (Dubois *et al.*, 1956a, Dubois *et al.*, 1956b).

La pléthysmographie corps entier est une technique qui permet de mesurer *in vivo* les variables respiratoires d'un animal non anesthésié de manière non invasive puisque ce dernier, non contraint, est libre de ses mouvements (Figure 50). Les mesures pléthysmographiques sont basées sur la loi de Boyle-Mariotte selon laquelle, dans des conditions isothermes, lorsqu'une quantité constante de gaz est comprimée ou décomprimée, le volume du gaz diminue ou augmente et sa pression varie dans le sens inverse de façon à ce que le produit du volume et de la pression reste constant à tout moment. Ainsi, les variations du volume pulmonaire qui accompagnent une compression ou une décompression du gaz dans les poumons pendant le cycle ventilatoire peuvent être estimées à partir des variations de pressions (Bartlett & Tenney, 1970).

L'animal est placé dans l'enceinte de mesure relativement spacieuse avec de l'eau et de la nourriture à disposition, hermétiquement fermée et ventilée en continu par un mélange gazeux de notre convenance (e.g. normocapnie : 21% O₂, 79% N₂ ; hypercapnie 3% CO₂, 21% O₂, 76% N₂/ 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂/ 8% CO₂, 21% O₂, 71% N₂) (Figure 50). Lorsque l'animal respire, l'air inspiré est réchauffé et humidifié en traversant l'arbre bronchique, à l'inverse, l'air expiré est refroidi à la température ambiante et désaturé en eau. Dans l'enceinte de mesure, on enregistre, par rapport à l'enceinte de référence, les variations de pressions secondaires aux variations de température et de saturation en eau de l'air inspiré et expiré par l'animal à l'aide du capteur différentiel de pression. Ainsi, l'augmentation du volume de l'animal à l'inspiration peut être estimée à partir de la surpression provoquée dans l'enceinte. L'augmentation de pression due au réchauffement et à la saturation en vapeur d'eau intrathoracique de l'air inspiré est proportionnelle au V_T. La variation de pression entre les deux

enceintes est transformée en signal électrique visualisé sur un écran (Figure 50). On peut ainsi directement mesurer les variables qui nous intéressent, entre autres la f_R , le V_T et le \dot{V}_E .

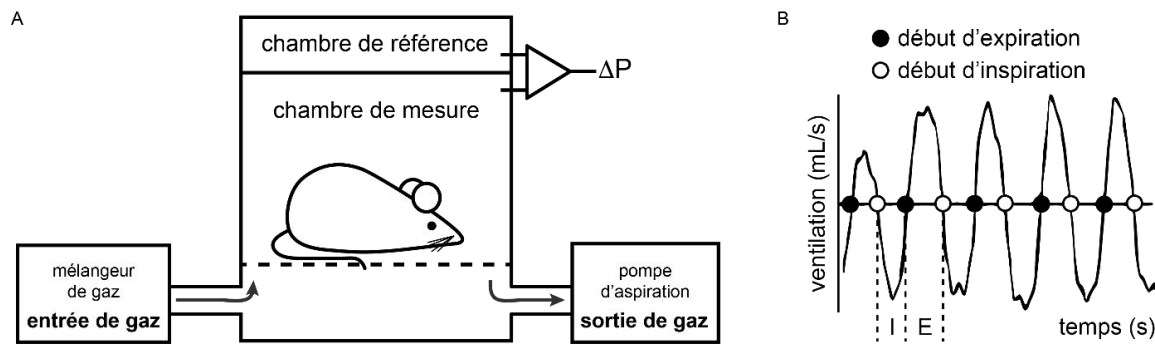


Figure 50 : Schéma du dispositif de pléthysmographie corps entier chez la souris
A. Représentation schématique d'une enceinte de pléthysmographie pour souris adulte composée de deux chambres, une de mesure dans laquelle la souris est placée (20mL) et une de référence. Un capteur différentiel de pression se trouve entre les deux chambres afin de mesurer les variations de pressions. Un système de circulation des gaz est connecté à l'enceinte de pléthysmographie avec une entrée de gaz via un mélangeur de gaz à un débit de 0,5 L.min⁻¹ et une sortie de gaz via une pompe d'aspiration aspirant les gaz. **B.** Représentation schématique d'un tracé de ventilation obtenu par la technique de pléthysmographie corps entier. ΔP : différence de pression ; I : inspiration ; E : expiration. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

II. Electrophysiologie extracellulaire

L'étude des circuits neuronaux régissant l'activité respiratoire peut être conduite de façon directe et à un niveau organisationnel réduit par le biais d'enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur des préparations de système nerveux central isolé qui contiennent au minimum le bulbe rachidien et la moelle épinière. Cette technique, d'abord développée en 1931 par Adrian et Buytendijk à partir de l'encéphale de poisson rouge, consiste à isoler le tronc cérébral de l'animal pour le placer ensuite dans une cuve d'enregistrement où le tissu baigne dans une solution dioxygénée dont la composition ionique et nutritive s'apparente au liquide céphalo-rachidien, servant à approvisionner par diffusion le tissu nerveux en glucose et en O₂ (Adrian & Buytendijk, 1931). À l'origine, le choix de cette préparation reposait sur le désir d'éliminer les sources périphériques de variation électrique, comme le cœur et les muscles squelettiques, afin de s'assurer que les changements enregistrés étaient bel et bien d'origine centrale (Adrian & Buytendijk, 1931). À l'aide d'une paire d'électrodes aspirant les racines du nerf crânien VII, Adrian et Buytendijk parvinrent à enregistrer une succession d'ondes lentes dont le cycle avait une durée de 1 à 3 secondes. Ainsi, ils ont démontré non seulement que le tronc cérébral était capable de produire une activité rythmique en absence d'afférence périphérique mais qu'en plus il y avait de fortes chances que celle-ci soit reliée à la respiration, car la fréquence de ces ondes était similaire à la fréquence à laquelle se produisent les mouvements respiratoires chez un poisson rouge *in vivo*. Depuis ces travaux pionniers, la préparation *ex vivo* de système nerveux central isolé contenant au

minimum le bulbe rachidien et la moelle épinière fut raffinée et appliquée chez différents groupes de vertébrés comme les agnathes (la lamproie)(Bongianni *et al.*, 2006, Mutolo *et al.*, 2011), les amphibiens (Galante *et al.*, 1996, Liao *et al.*, 1996, Broch *et al.*, 2002, Fournier *et al.*, 2007, Fournier & Kinkead, 2008, Straus *et al.*, 2011), les tortues (Johnson *et al.*, 2002, Bartman *et al.*, 2010), les oiseaux (le poulet) (Fortin *et al.*, 1999, Fortin *et al.*, 2000), ce qui permit d'accroître substantiellement notre compréhension de la commande centrale respiratoire. Toutefois, c'est l'adaptation de cette technique chez les mammifères réalisée par Suzue en 1984, s'inspirant de la préparation *ex vivo* de la moelle épinière isolée chez le rat nouveau-né introduite par Otsuka et Konishi en 1974 (Otsuka & Konishi, 1974), qui la rendit la plus populaire et qui permit, dans les années qui suivirent, de faire un grand nombre de découvertes majeures en neurobiologie respiratoire (Suzue, 1984, Richter & Spyer, 2001, Hedrick, 2005, Kinkead, 2009, Johnson *et al.*, 2012).

Dans nos travaux expérimentaux, nous avons utilisé des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris nouveau-nées entre 0 et 4 jours post-natal (Figure 51). Au-delà, la maturation du SNC et en particulier sa myélinisation induit une réduction de la diffusion d'O₂ au sein des tissus. Après anesthésie au froid du souriceau, son système nerveux central est extrait puis une section est effectuée avec précision entre le pont et le bulbe rachidien, au niveau de l'artère cérébelleuse antéro-inférieure afin d'isoler une préparation de bulbe rachidien-moelle épinière (Figure 51).

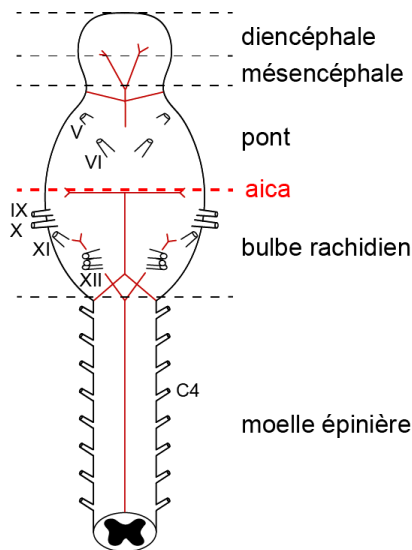


Figure 51 : Représentation schématique de la préparation *ex vivo* de SNC isolé de souris nouveau-née

Représentation schématique de la préparation *ex vivo* de SNC isolé de souris nouveau-née comprenant la moelle épinière, le bulbe rachidien et les structures supra-bulbaires (pont, mésencéphale et diencephale) obtenue après dissection d'un souriceau âgé de 0 à 4 jours. La ligne rouge représente la section rostrale effectuée entre le pont et le bulbe rachidien, au niveau de l'aica afin d'isoler une préparation de bulbe rachidien-moelle épinière. C4 : 4^e racine nerveuse cervicale ventrale ; XII : racine du nerf hypoglosse ; XI : racine du nerf spinal ; X : racine du nerf vague ; IX : racine du nerf glossopharyngien ; Aica : artère cérébelleuse antéro-inférieure. Inspiré de (Loiseau *et al.*, 2017) ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

Cette préparation est transférée puis fixée en *decubitus* dorsal dans une cuve d'enregistrement (Figure 52). Dans cette cuve circule en continu à un débit de 10mL.min⁻¹ du LCRA à pH 7,4 ayant une température de 26±1°C et carbogéné (95% O₂ - 5%CO₂) (Figure 52). Sa composition peut être manipulée dans le but de changer les conditions expérimentales et d'observer le comportement de la préparation (Figure 52). L'activité électrique au niveau de la 4^{ème} paire de racine cervicale ventrale, par où passent les axones des motoneurones phréniques, a été enregistrée au moyen d'une électrode de succion reliée à une seringue et munie d'un fil

d'argent relié à un système d'acquisition. L'extrémité de l'électrode a été amenée à proximité de la racine et une légère dépression exercée au moyen de la seringue permettait de placer la racine dans l'électrode. Le LCRA accompagnant la racine permettait d'assurer la continuité électrique avec le fil d'argent. Les signaux électriques ont ensuite été dirigés vers un système d'enregistrement où ils ont été filtrés (10-3000 Hz), amplifiés (gain 5000 ; RPS 107, GRASS), digitalisés au moyen d'une carte d'acquisition CED micro 1401 (Cambridge Electronic Design), intégrés (Dual channel integrator) et enfin visualisés et analysés grâce à un système d'analyse de données SPIKE 2 (Cambridge Electronic Design). Les décharges motrices spontanées enregistrées en C4 sont classiquement assimilées à la CCR (Suzue, 1984). Cette dernière est caractérisée par la fréquence respiratoire (f_R), définie comme étant le nombre de cycles respiratoires (bouffées de décharge inspiratoire suivie d'une période de silence assimilée à l'expiration) pendant une minute ($\text{cycles}\cdot\text{min}^{-1}$) et l'amplitude de l'activité inspiratoire intégrée de la racine C4 (IntC4). Ce sont ces deux variables respiratoires que nous avons analysées et dont le produit matérialise la CCR. Ces préparations ont pour avantage de s'affranchir des afférences périphériques et supra-bulbaires et donc de restreindre les observations concernant la CCR au réseau respiratoire bulbaire.

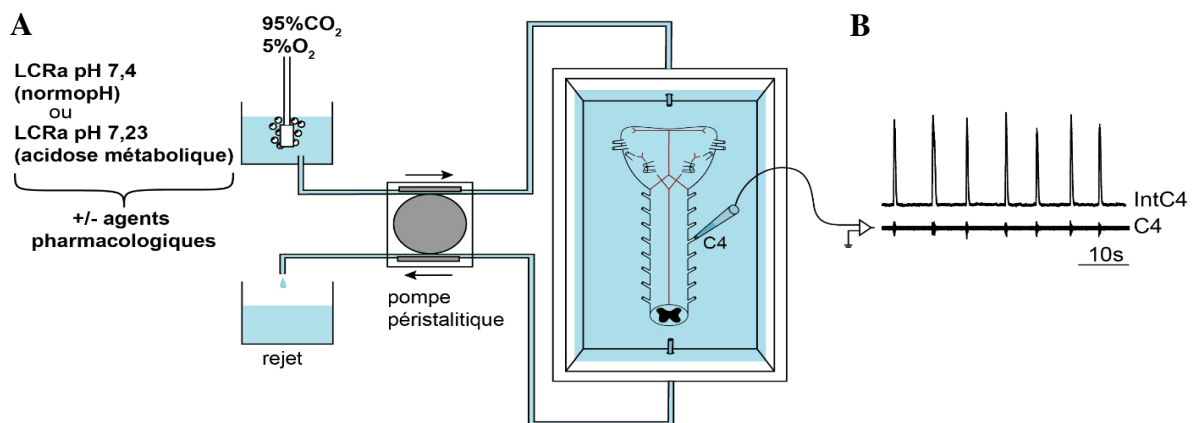


Figure 52 : Schéma du dispositif d'induction des stimuli et d'enregistrement des signaux électrophysiologiques sur la préparation *ex vivo* de moelle épinière-bulbe rachidien isolé de souris nouveau-née

A. Représentation schématique d'une préparation *ex vivo* de moelle épinière-bulbe rachidien isolé de souris nouveau-nées âgées de 0 à 4 jours en *decubitus* dorsal dans une cuve d'enregistrement et entièrement submergée par du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRA) en circulation. Une pompe péristaltique a été utilisée pour faire circuler en continu du LCRA à un débit de $10\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à une température de $26\pm 1^\circ\text{C}$, dioxygéné et ajusté à un pH de 7,4 (normopH) ou de 7,23 (acidose métabolique) par un mélange gazeux composé de 95% O₂ et 5% CO₂. Des agents pharmacologiques peuvent être éventuellement ajoutés au LCRA selon les conditions expérimentales. L'enregistrement des décharges motrices spontanées assimilées au rythme respiratoire a été effectué au niveau de la 4^e racine nerveuse cervicale ventrale (C4) à l'aide d'une électrode à succion. **B.** Enregistrement électrophysiologique et son intégration obtenus sur cette préparation. Le tracé du bas représente le signal brut enregistré au niveau de la racine C4 (assimilé à l'activité inspiratoire), celui du haut correspond à l'intégration de ce signal. C4 : activité inspiratoire de C4 ; IntC4 : activité intégrée de C4. ©Anne-Sophie Perrin-Terrin

III. Détection immunohistochimique de la protéine c-FOS

- **Article publié:** *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*

Cette technique a été décrite dans un article méthodologique réalisé au cours de ce doctorat et publié en 2016 dans *Journal of Visualized Experiments* :

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

Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, Frugiere A, Richalet JP, Bodineau L, Voituron N
Journal of Visualized Experiments, 2016, 110, e53613

L'article et son résumé en français vous seront présentés ci-dessous.

1. Résumé

La détection immunohistologique de la protéine c-FOS : un outil utile en tant que marqueur des populations neuronales impliquées dans les réponses physiologiques spécifiques *in vivo* et *ex vivo*

Objectif

Décrire la procédure expérimentale de l'analyse de changements de l'activité neuronale par immunohistochimie de c-FOS, à la fois chez des souris adultes *in vivo* et nouveau-nées *ex vivo* en réponse à des stimuli hypoxiques et hypercapniques afin de la standardiser. Dans le contexte de l'étude expérimentale de syndromes d'hypoventilations centrales (CHS), il est d'un intérêt majeur d'identifier les structures encéphaliques, en particulier celles impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, dont la modulation d'activité pourrait constituer un mécanisme clé dans la correction des CHS. Dans cet article, nous nous sommes donc concentrés sur l'identification des populations neuronales du tronc cérébral impliquées dans l'adaptation ventilatoire à l'hypoxie ou à l'hypercapnie.

Contexte scientifique

De nombreuses études expérimentales cherchent à identifier et cartographier les régions encéphaliques impliquées dans des régulations physiologiques spécifiques. L'activité neuronale peut être déterminée par différentes techniques, parmi lesquelles une approche immunohistologique de détection de l'expression du gène *c-fos* (*Finkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma oncogene homolog, cellular component*). Cette dernière est couramment utilisée pour détecter des modifications d'activité des populations neuronales en réponse à différents stimuli (Herdegen & Leah, 1998) tels que l'hypoxie et l'hypercapnie/acidose métabolique (Bodineau *et al.*, 2001, Voituron *et al.*, 2011, Bodineau *et al.*, 2003, Voituron *et al.*, 2006, Voituron *et al.*, 2005, Bodineau & Larnicol, 2001) à la fois *in vivo* (Teppema *et al.*, 1997, Bodineau *et al.*, 2001, Berquin *et al.*, 2000b, Takakura *et al.*, 2006b) et *ex vivo* (Voituron *et al.*, 2006, Bodineau *et al.*, 2001, Okada *et al.*, 2002, Saadani-Makki *et al.*, 2004, Voituron *et al.*, 2005, Voituron *et al.*, 2011). En effet, le proto-oncogène *c-fos*, qui code un facteur de transcription, appartient à un groupe de gènes dits « de réponse précoce » qui sont induits très rapidement, de façon transitoire, par de très nombreux stimuli et cela dans un grand nombre de types cellulaires. Son produit protéique nucléaire c-FOS peut être facilement détecté avec des techniques immunohistochimiques conduisant ainsi à cartographier des groupes de neurones qui présentent des changements dans leur activité en réponse à des stimuli. Les données de la littérature soutiennent l'hypothèse qu'il s'agit d'un excellent outil pour l'analyse de la stimulation neuronale étant donné que *c-fos* 1) est exprimé à un niveau négligeable en l'absence de stimulation, ce qui permet une quantification plus aisée de l'activité neuronale en présence de stimuli (Herdegen & Leah, 1998), 2) son expression est rapidement induite après stimulation

car la protéine c-FOS est détectable en immunohistologie après seulement 90 minutes (Morgan *et al.*, 1987), 3) son taux d'expression est en effet corrélé à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} neuronal, laissant supposer par extrapolation que cela soit corrélé à la fréquence de décharge neuronale (Fields *et al.*, 1997, Sheng & Greenberg, 1990, Sheng *et al.*, 1990).

Méthodologie expérimentale

Deux approches ont été décrites pour identifier les populations neuronales impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie, d'une part chez des animaux *in vivo* et d'autre part sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé. La comparaison de ces deux approches permet la détermination de l'origine de l'activation neuronale, c'est-à-dire périphérique et / ou centrale dans un contexte de challenges hypoxiques ou hypercapniques.

In vivo, les animaux ont été exposés à un mélange gazeux hypercapnique (4% CO₂, 21% O₂, 75% N₂) ou hypoxique (8% O₂, 92% N₂) pendant 120 minutes. Les animaux témoins étaient exposés à un mélange gazeux normoxique/normocapnique composé de 21% O₂ et 79% N₂ pendant le même temps. Toutes les précautions ont été prises afin de minimiser une expression de *c-fos* non spécifique. A l'issue de la période de stimulation, les souris ont été anesthésiées avec une injection intrapéritonéale de pentobarbital à une dose subléthale (de 60 à 90mg/kg), puis fixées par perfusion transcardiaque par une solution à 4% de paraformaldéhyde.

Ex vivo, les préparations de SNC isolé ont été superfusées en continu avec du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) ayant une température de $26\pm 1^{\circ}C$, soit en condition d'acidose métabolique, modélisant l'hypercapnie *in vivo* en utilisant un mélange gazeux composé de 95% O₂ et 5% CO₂ et ajusté à pH de 7,23 pour équilibrer le LCRa, soit en condition d'hypoxie en utilisant un mélange gazeux composé de 95% N₂ and 5% CO₂ et ajusté à un pH de 7,4. Les préparations *ex vivo* témoins ont été maintenues dans des conditions de normopH en étant superfusées par du LCRa carbogéné par bullage d'un mélange gazeux composé de 95% O₂ et 5% CO₂ et ajusté à pH de 7,4. Les diverses stimulations ont été effectuées sur une période de 30 minutes après une période de stabilisation en normopH de 30 minutes également. Toutes les précautions ont été prises afin de minimiser une expression de *c-fos* non spécifique. A l'issue de la période de stimulation les préparations de SNC isolé ont été fixées par immersion dans une solution à 4% de paraformaldéhyde. En effet, une étude antérieure suggère que des tissus de moins de 10 mm de diamètre, ce qui est le cas de ces préparations, peuvent être fixés par simple diffusion (Start *et al.*, 1992).

In vivo et *ex vivo*, les encéphales des souris ont été cryoprotégés par immersion dans une solution cryoprotectrice et coupés en coupes coronales de 40 μm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat. Les coupes transversales ainsi obtenues ont été engagées dans des protocoles d'immunodétection d'une part de c-FOS seul et d'autre part de c-FOS avec un co-marqueur. Les coupes transversales ainsi obtenues ont été placées dans l'ordre rostro-caudal dans une plaque à 12 puits contenant du PBS puis elles ont été soumises au protocole d'immunodétection

de c-FOS afin d'identifier les groupes de cellules du tronc cérébral activés par des stimulations hypoxiques ou hypercapniques. La révélation immunohistochimique de la protéine c-FOS sur coupes flottantes était basée sur une méthode indirecte permettant d'amplifier le signal en associant le complexe avidine-biotine-péroxydase (ABC) à un substrat chromogène, le tetrahydrochlorure de diaminobenzidine (DAB). Cette méthode met en jeu un anticorps polyclonal primaire et un anticorps secondaire biotinylé. La biotine fixée à l'anticorps secondaire sert de point de fixation au complexe ABC. L'avidine possède quatre sites de fixation pour la biotine sur laquelle est liée la peroxydase. Le rapport des concentrations entre la biotine et l'avidine est déterminé de façon à laisser des sites libres sur les molécules d'avidine afin que l'ensemble ABC se fixe sur les molécules de biotine portées par les anticorps secondaires. En présence d'un substrat enzymatique, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et d'un substrat chromogène, la DAB, un précipité coloré stable apparaît localisé au niveau des sites antigéniques et visible au microscope photonique dans le noyau de neurones. Le précipité de la DAB ayant la propriété d'absorber les métaux lourds, l'ajout de nickel avec le substrat chromogène permet de moduler l'intensité de coloration du précipité.

Les cellules c-FOS positives ont été comptées dans diverses structures du tronc cérébral connues pour leur implication dans l'élaboration et la modulation de la CCR à l'aide d'un atlas de SNC murin (Paxinos & Franklin, 2001, Paxinos *et al.*, 2007) et de repères anatomiques précis afin de standardiser la procédure de quantification (Berquin *et al.*, 2000b, Stornetta *et al.*, 2005, Voituron *et al.*, 2006, Voituron *et al.*, 2011, Huckstepp *et al.*, 2015). Le nombre total de cellules c-FOS-positives a ensuite été comparé entre les conditions hypoxie/hypercapnie/acidose métaboliques et la condition témoin respectivement de normoxie/normocapnie/normopH pour chacune des structures. En comparaison avec la condition témoin, le stimulus hypoxique ou hypercapnique a augmenté et/ou diminué le nombre de cellules marquées pour c-FOS dans plusieurs sites spécifiques du tronc cérébral qui sont donc constitutifs des voies neuronales impliquées dans l'adaptation de la commande respiratoire centrale au challenge étudié.

Conclusion

Nous fournissons ainsi un protocole pour l'étude de modification d'activité neuronale en réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Une telle approche peut être utilisée, notamment dans le cadre de pathologies respiratoires telles que les CHS, pour identifier des structures cibles potentielles de certains agents pharmacologiques dans la recherche d'un traitement des troubles respiratoire des patients.

Video Article

The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses *In Vivo* and *Ex Vivo*

Anne-Sophie Perrin-Terrin^{1,2}, Florine Jeton^{1,3}, Aurelien Pichon^{1,3,4}, Alain Frugière², Jean-Paul Richalet^{1,3}, Laurence Bodineau², Nicolas Voituron^{1,3}

¹Sorbonne Paris Cité, Laboratory "Hypoxia & Lung" EA2363, University Paris 13

²UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, Sorbonne Universités

³Laboratory of Excellence GR-Ex

⁴Laboratory MOVE (EA 6314), University of Poitiers

Correspondence to: Nicolas Voituron at nicolas.voituron@univ-paris13.fr

URL: <http://www.jove.com/video/53613>

DOI: [doi:10.3791/53613](https://doi.org/10.3791/53613)

Keywords: Molecular Biology, Issue 110, Central Nervous System, c-FOS protein, immediate early gene, Immunohistochemistry, Neuronal marker, Transcription Factor

Date Published: 4/25/2016

Citation: Perrin-Terrin, A.S., Jeton, F., Pichon, A., Frugière, A., Richalet, J.P., Bodineau, L., Voituron, N. The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses *In Vivo* and *Ex Vivo*. *J. Vis. Exp.* (110), e53613, doi:10.3791/53613 (2016).

Abstract

Many studies seek to identify and map the brain regions involved in specific physiological regulations. The proto-oncogene *c-fos*, an immediate early gene, is expressed in neurons in response to various stimuli. The protein product can be readily detected with immunohistochemical techniques leading to the use of c-FOS detection to map groups of neurons that display changes in their activity. In this article, we focused on the identification of brainstem neuronal populations involved in the ventilatory adaptation to hypoxia or hypercapnia. Two approaches were described to identify involved neuronal populations *in vivo* in animals and *ex vivo* in deafferented brainstem preparations. *In vivo*, animals were exposed to hypercapnic or hypoxic gas mixtures. *Ex vivo*, deafferented preparations were superfused with hypoxic or hypercapnic artificial cerebrospinal fluid. In both cases, either control *in vivo* animals or *ex vivo* preparations were maintained under normoxic and normocapnic conditions. The comparison of these two approaches allows the determination of the origin of the neuronal activation *i.e.*, peripheral and/or central. *In vivo* and *ex vivo*, brainstems were collected, fixed, and sliced into sections. Once sections were prepared, immunohistochemical detection of the c-FOS protein was made in order to identify the brainstem groups of cells activated by hypoxic or hypercapnic stimulations. Labeled cells were counted in brainstem respiratory structures. In comparison to the control condition, hypoxia or hypercapnia increased the number of c-FOS labeled cells in several specific brainstem sites that are thus constitutive of the neuronal pathways involved in the adaptation of the central respiratory drive.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/53613/>

Introduction

The *c-fos* gene was identified for the first time at the beginning of 1980^{1,2} and its product was characterized in 1984 as a nuclear protein having gene-activator properties^{3,4}. It participates in long-term mechanisms associated with neuron stimulation. Indeed, changes in neuronal activity lead to second messenger signaling cascades that induce the expression of the immediate early gene *c-fos*, which induces the production of the transcription factor c-FOS. The latter initiates the expression of late genes and thus participates in adaptive responses of the nervous system to many different types of stimuli⁴. Thus, since the end of 1980^{5,6}, c-FOS protein detection has been frequently used to study the effects of exogenous factors on gene transcription in general⁴ and on the activity of the central nervous system (CNS) for mapping out neuronal pathways involved in different physiological conditions.

Basal *c-fos* expression has been studied in various species including mice, rat, cat, monkey, and human⁴. Thereby, the kinetics of its expression is relatively well known. The transcription activation is rapid (5 to 20 min)^{7,8}, and the mRNA accumulation reaches a maximum between 30 and 45 min after the onset of stimulation⁹ and declines with a short half-life of 12 min. The c-FOS protein synthesis follows mRNA accumulation and could be detected by immunohistochemistry at 20 to 90 min post stimulation⁶.

Analysis of *c-fos* expression is classically used in *in vivo* studies to identify the central respiratory network involved in the ventilatory responses to hypoxia or hypercapnia¹⁰⁻¹⁴. More recently, this tool was also used in *ex vivo* brainstem preparations to explore central respiratory network adaptations to hypoxia or hypercapnia¹⁵⁻¹⁸. Indeed, these preparations generate a rhythmic activity classically assimilated to the central respiratory drive¹⁹. Thus, this type of preparation has the advantage of being completely deafferented, and therefore, results regarding *c-fos* expression only reflect the consequences of a central stimulation without any intervention of peripheral structures.

The c-FOS detection could be made by immunohistochemical or immunohistofluorescence approaches. Indirect immunodetection necessitates the use of a primary antibody against c-FOS and a secondary antibody directed against the species in which the primary antibody was produced. For the immunohistochemical method, the secondary antibody is conjugated with an enzyme (peroxidase, for example) that acts on a substrate (H_2O_2 for the peroxidase). The product of the enzymatic reaction is developed by a chromogen (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride), which stains it and can be observed under light microscopy. The reaction could be reinforced using nickel ammonium sulphate. These methods allow the detection of active neurons during different physiological challenges and therefore the identification and/or the mapping of peripheral and central pathways involved in the consecutive physiological responses.

Protocol

Note: c-FOS detection is a standardized procedure involving several steps (**Figure 1**). All experiments were performed on rats or mice. Experimental protocols were approved by the Ethics Committee in Animal Experiment Charles Darwin (Ce5/2011/05), done in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and conducted in accordance with French laws for animal care.

1. Preparation of Solutions

1. Prepare 0.2 M Sodium phosphate buffer: add 6.24 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ and 22.56 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ to 1 L distilled water while stirring.
2. Prepare 4% Paraformaldehyde (PFA): add 20 g of PFA to 150 ml distilled water. Heat the solution to 80 °C while stirring. To clear the solution, reduce heat and add 1 or 2 drops of 1 N NaOH to help the paraformaldehyde dissolve. Complete to 250 mL with distilled water and add 250 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4). Store at 4 °C. Take appropriate care when using these reagents. Handle with gloves, lab coat, and safety goggles under a chemical hood.
Note: Prepare 4% PFA on the day before the perfusions. Determine the volume of 4% PFA as a function of age, number and species of animals.
3. Prepare cryoprotective solution: In 250 ml of 0.2 M phosphate-buffered saline, mix 5 g of Polyvinyl-pyrrolidone, 150 g of sucrose and 2.5 g of sodium chloride. After complete dissolution, add 150 ml of ethylene glycol and adjust to 500 ml with distilled water. Store the cryoprotective solution at 4 °C.
4. Prepare 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS): add 18 g of NaCl to 1 L distilled water while stirring. After complete dissolution, add 1 L 0.2 M of sodium phosphate buffer.
5. Prepare Phosphate Buffered Saline supplemented with 0.3% Triton X100 (PBST): Add 3 ml of Triton X100 to 997 ml of PBS.
6. Prepare 0.05 M Tris-Buffer (pH 7.6): add 3.03 g of Tris-Hydrochloride and 0.70 g Tris-base to 500 ml distilled water while stirring.
7. Prepare 2% goat serum in PBST: for one plate, prepare 30 ml of solution. Add 600 μ l of goat serum to 30 ml PBST and mix well. Add 2.5 ml per well.
Note: Serum used must come from species used for secondary antibody production
8. Prepare rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein (1:4000, sc-52) in PBST with bovine serum albumin (0.25%). For one plate, prepare 30 ml of solution. Add 75 mg of bovine serum albumin to 30 ml PBST and mix well. Then, add 7.5 μ l of rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein.
9. Prepare biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:500) in PBST with serum albumin bovine (0.25%). For one plate, prepare 30 ml of solution. Add 75 mg of bovine serum albumin to 30 ml PBST and mix well. Then, add 60 μ l of biotinylated goat anti-rabbit antibody.
10. Prepare avidin-biotin-peroxidase complex (1:250) in PBST (ABC solution). For one plate, prepare 30 ml of solution. Add 120 μ l of reagent A and 120 μ l of reagent B to 30 ml PBST and mix well.
Note: ABC solution must be prepared at least 30 min before use.
11. Prepare substrate solution. Immediately before use, prepare the solution as follows (for one plate): add 20 mg of nickel ammonium sulfate and 10 mg of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride to 50 ml Tris-Buffer. Filter and protect from light. Add 2.0 ml per well. In the remaining solution (25 ml) add 17 μ l of H_2O_2 (H_2O_2 solution 30% in H_2O). Add 2.0 ml per well.
Note: Appropriate care should be taken when using these reagents. Handle with gloves and lab coats.

2. c-fos Induction and Tissue Processing *In Vivo*

Note: Experiments were performed in rats (Sprague Dawley) or mice (C57BL/6).

1. Place the animals in an airtight box ventilated with a hypoxic (O_2 8% balanced N_2) or hypercapnic (CO_2 4%, O_2 21% balanced N_2) gas mixture for 2 hr (**Figure 2A**).
2. Anaesthetize the animal with intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg). Perfuse the animal transcardially with 4% PFA²⁰. Handle with care and use gloves under a chemical hood.
3. After perfusion, dissect the brain²⁰ and immerse it in 7 ml of 4% PFA in a 15 ml tube for 48 hr at 4 °C. Then remove the brain from PFA and immerse it completely in the cryoprotective solution. Store at -18 °C (**Figure 3**). Dispose of the rest of the animal's body by the appropriate waste-processing pathway.
Note: Cryoprotection is a step between PFA fixation and freezing. It reduces the formation of ice crystals in cells with a solution whose freezing will be in amorphous form. The fixed samples must be impregnated in the cryoprotective solution (prepared in step 1.3) for at least 24 hr at 4 °C. Handle with care and gloves under chemical hood.

3. c-fos induction and Tissue Processing *Ex Vivo*

Note: Experiments were performed in newborn rats or mice only.

1. Isolate the CNS as described by Suzue¹⁹. Place it in a recording chamber and superfuse it continuously with artificial cerebro-spinal fluid at a rate of 7.5 ml/min at 26 °C²¹ (aCSF: in mM: 130.0 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 26.0 NaHCO₃, 30.0 D-glucose; saturated with O₂ and adjusted to pH 7.4 by gassing with 95% O₂ and 5% CO₂) (**Figure 2B**).
2. Replace the aCSF with a deoxygenated aCSF (same composition bubbled with 95% N₂ and 5% CO₂, pH 7.4) for hypoxia or by an acidified aCSF (standard aCSF with NaHCO₃ reduced to 10.0 mM, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂) for hypercapnia. Apply the stimulation for 30 min (**Figure 2B**).
3. *Ex vivo*, after the induction period, transfer the CNS of newborn mice or rats in 2.5 ml of 4% PFA in a 2.5 ml tube for 48 hr and store at -18 °C in a cryoprotective solution for later use (**Figure 3**).
Note: *Ex vivo*, it is not necessary to perfuse animals. A previous study suggests that small specimens measuring less than 10 mm in diameter can be fixed by simple diffusion²². A quoted rate of penetration (distance, in mm, for the fixative diffusion into the tissue) for aldehyde is 2 or 3 mm/hr.

4. Brainstem Sectioning

Note: From this step to the end, the protocol is strictly the same for *in vivo* and *ex vivo* inductions.

1. Before slicing, place one individual well insert in a 12-well plate and add 2.5 ml of PBS in each well.
2. Make serial coronal sections (40 μm) of the brainstem with a cryostat and collect them in the 12-well plate. For the entire adult brainstem, make about 70 slices (**Figure 3**).
Note: It is possible to section tissue from several animals in parallel in one plate.

5. Immunohistological Procedures (Table 1)

Note: Throughout the procedure, the sections remain in the well inserts.

1. **Day 1 - Endogenous peroxidase activity destruction, non-specific binding site blockade, and incubation with the primary antibody (Figure 4)**
 1. Wash the sections for 10 min with 0.1 M PBS at RT (2.5 ml per well). Repeat 3 times.
 2. Suppress the endogenous peroxidase activity by incubating the coronal sections for 30 min at RT with hydrogen peroxide H₂O₂, 3% in 0.1 M PBS (2.5 ml per well).
 3. Wash the sections for 10 min with 0.1 M PBS at RT (2.5 ml per well). Repeat 3 times.
 4. Block the non specific binding site by incubating the coronal sections for 1 hr at RT with goat serum (2%) in PBST.
 5. Incubate the coronal sections for 48 hr at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against the c-FOS protein (1:4000, sc-52,) in PBST with bovine serum albumin (0.25%) (2.5 ml per well).
2. **Day 3 - Incubation with secondary antibody and development of a color reaction (Figure 4)**
 1. Wash the sections for 10 min with PBS 0.1 M at RT (2.5 ml per well). Repeat 3 times.
 2. Incubate the coronal sections for 1 hr at RT with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:500) in PBST with bovine serum albumin (0.25%) (2.5 ml per well).
Note: The investigator can also use a secondary antibody coupled to a fluorescent probe at this stage. In this case, stop the protocol at this stage and examine directly using a fluorescence microscope.
 3. Wash the sections for 10 min with PBST at RT (2.5 ml per well). Repeat 3 times.
 4. Incubate the coronal sections for 1 hr with an avidin-biotin-peroxidase complex (1:250) in PBST (2.5 ml per well).
 5. Wash the sections for 10 min with PBST at RT (2.5 ml per well). Repeat 2 times.
 6. Wash the sections for 10 min with 0.05 M Tris-Buffer at RT (2.5 ml per well). Repeat 2 times.
 7. Incubate the coronal sections with 0.02% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.04% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris-buffer (pH 7.6) at RT (2.0 ml per well). In the remaining solution (25 ml) add 17 μl H₂O₂ (H₂O₂ solution 30% in H₂O) (2.0 ml per well).
Note: The investigator should determine development times under light microscope. However, 5 to 10 min provides good staining intensity.
 8. When staining intensity is optimal (controlled under light microscope, see **Figure 5** and **Figure 6**), stop the reaction by washing the sections for 10 min with 0.1 M PBS at RT (2.5 ml per well). Repeat 4 times. Then, wash the sections with distilled water.
3. **Sampling mounting (handle with care and gloves under chemical hood)**
 1. Mount sections serially on slides and air-dry. For this, carefully spread the sections in rostro-caudal order with brushes on the slides. Clearly label the slides according to the samples.
 2. Dehydrate with absolute alcohol: immerse the slides for 30 sec at RT in absolute alcohol bath. Repeat twice.
 3. Clear with xylene: immerse the slides in xylene bath for 3 min at RT. Repeat twice.
 4. Coverslip the slides with mounting medium. For this, apply 5 drops of mounting medium on the slide and then apply the cover glass by driving out the air bubbles. Air-dry for 48 hr.

6. Data and Statistical Analysis

1. Examine sections under a light microscope. Visually count FLI neurons at high magnification (200x) using standard landmarks^{23,24}. The c-Fos punctiform staining is localized in nuclei of neurons.
2. For each analyzed area, count the number of c-FOS-positive cells per section and compare the mean number between control and stimulated conditions. Depending on the normality of the data, use unpaired student's *t* test or Mann-Whitney test. Differences were

considered significant if $P < 0.05$. Plot the distribution of FLI neurons onto a drawing (magnification 100x) using a drawing tube attached to the microscope and photographed with a digital camera (Figure 5).

Representative Results

The c-FOS detection is a useful tool that allows identifying groups of activated cells under specific conditions such as hypoxia and hypercapnia *in vivo* (Figure 2A) or in situations that mimic these conditions *ex vivo* (Figure 2B). *In vivo*, newborn, young, or adult rodents were placed in an airtight box in which the gaseous environment is continually renewed by a gas mixture with a composition precisely defined for 30 to 180 min^{13,25,26} (Figure 2A). As the stimulation acts on the whole body, the related change in c-FOS could reflect both central and peripheral activated pathways. *Ex vivo*, deafferented preparations containing the medulla oblongata and spinal cord were placed in a chamber continuously superfused with an aCSF with different levels of O₂ or pH in order to model hypoxic or hypercapnic conditions (Figure 2B) for 30 min^{16-18,27}. As the stimulation acts only in these deafferented preparations, it is possible to conclude that only central mechanisms were involved in the activation of cells in the c-FOS identified structures.

The CNS was fixed with PFA, either by a perfusion via the systemic circulation *in vivo*, or by an immersion *ex vivo* (Figure 3). Due to this difference, the fixative diffusion is longer *ex vivo* than *in vivo*. Thus, the c-FOS signal might be affected, particularly in deep structures. However, because the c-FOS analysis is always performed in a comparative approach between control and stimulated *in vivo* animals or *ex vivo* preparations, this difference would not interfere with the results from a strict comparison of control and stimulated data. After that, the CNS was cryoprotected, sectioned, and engaged in the immunohistochemical procedure (Figure 3, Figure 4). In this way, some respiratory brainstem areas have been identified *in vivo* as modifying their activity under hypoxic or hypercapnic challenges, including the retrotrapezoid nucleus (RTN), which is the main central site of CO₂ chemoreception^{10,13,28,29}, the ventrolateral medulla (VLM), which contains the inspiratory rhythm generator¹³, the commissural and median parts of the nucleus *tractus solitarius* (c/mNTS), which are the projection areas of the carotid bodies input^{13,25,26,30} (Figure 5), and the medullary *raphe* nuclei^{12,13}.

Ex vivo, in deafferented conditions, neurons of the RTN and the VLM have been described to change their c-FOS immunoreactivity under conditions of reduced O₂¹⁶⁻¹⁸. The c-FOS detection may also be combined with other immunohistochemical detections to characterize the phenotype of activated cells^{14,31}.

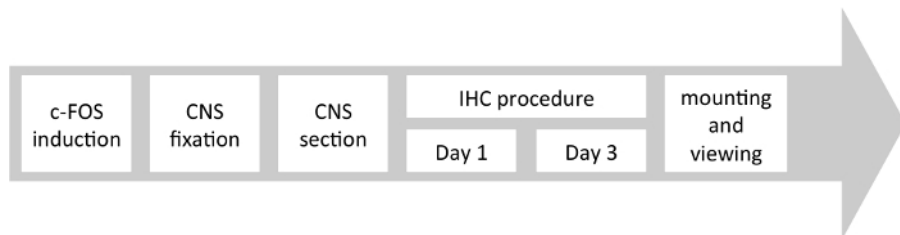


Figure 1. Study Design for the Use of c-FOS Detection to Map the Neuronal Structures Involved in the Respiratory Adaptations to Hypoxia or Hypercapnia. Chronological steps of c-FOS detection technique in the CNS. CNS: Central Nervous System; IHC: Immunohistochemistry. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

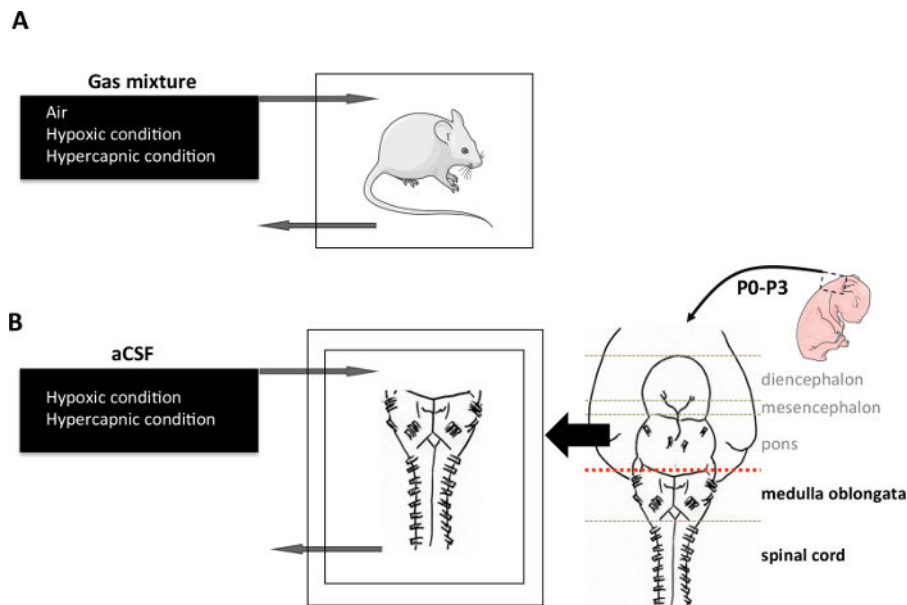


Figure 2. C-FOS induction. (A) *In vivo* induction protocol. An animal was placed in a hermetic chamber and exposed to either air (21% O₂; 79% N₂), hypercapnic (21% O₂; 4% CO₂; 75% N₂), or hypoxic (10% O₂; 90% N₂) gas mixture for 2 hr. (B) *Ex vivo* induction protocol. CNS was dissected out from newborn rodent aged 0 to 4 days. Medulla oblongata and spinal cord were isolated under magnification to obtain the preparations. They were placed in a chamber with the ventral surface facing upward, superfused with aCSF (pH 7.4) at 26 ± 1 °C. Modeling hypoxic stimulation *in vivo* was performed by reducing the fraction of O₂ in the aCSF by bubbling an anoxic gas mixture containing 95% N₂ and 5% CO₂. Modeling hypercapnic stimulation *in vivo* was performed using an acid aCSF that differed from normal aCSF in terms of NaHCO₃ concentration (decrease). The acid aCSF is saturated with O₂ and adjusted to pH 7.23 by bubbling with 95% O₂ and 5% CO₂. Each stimulation condition was applied for 30 min. aCSF: artificial cerebrospinal fluid. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

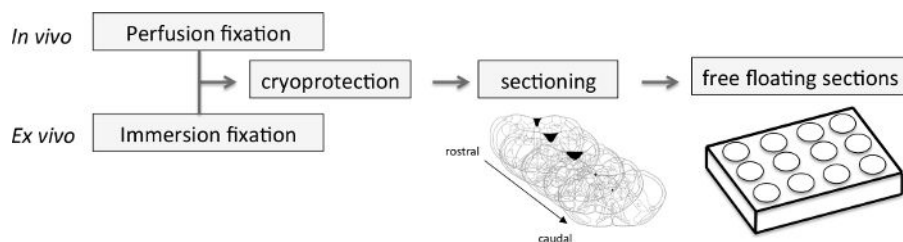


Figure 3. Central Nervous System Sampling. *In vivo*, the CNS was obtained by dissection after fixative procedure using 4% paraformaldehyde perfused via the vascular system. *Ex vivo*, the CNS was directly immersed in 4% paraformaldehyde after dissection. Subsequently, the CNS was cryoprotected by immersion in a cryoprotective solution and sliced into 40 μm thick coronal sections using a cryostat. The rostro-caudal sections of medulla were placed in a 12-well plate containing PBS before immunohistochemical procedures. CNS: Central Nervous System; PBS: Phosphate-Buffered Saline. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

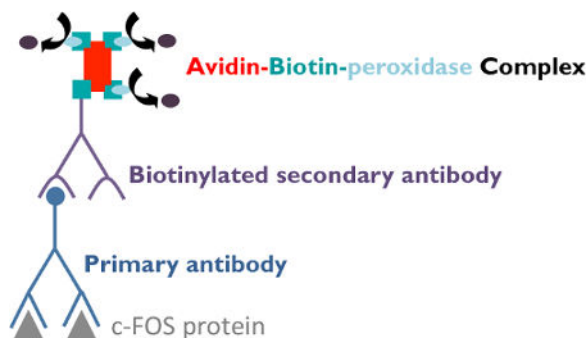


Figure 4. Indirect Immunohistochemical Procedures. The sections were first incubated with a rabbit polyclonal primary antibody against the c-FOS protein. Afterwards, they were treated with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody against the primary antibody. Following this incubation, sections were treated with an Avidin-Biotin-peroxidase complex, which binds tightly to the secondary antibody to amplify the signal. Indeed, the complex contains several peroxidase molecules leading to a high staining intensity. Finally, sections were stained using a solution of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and nickel ammonium sulfate, which produces a dark gray precipitate in the presence of the peroxidase enzyme. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

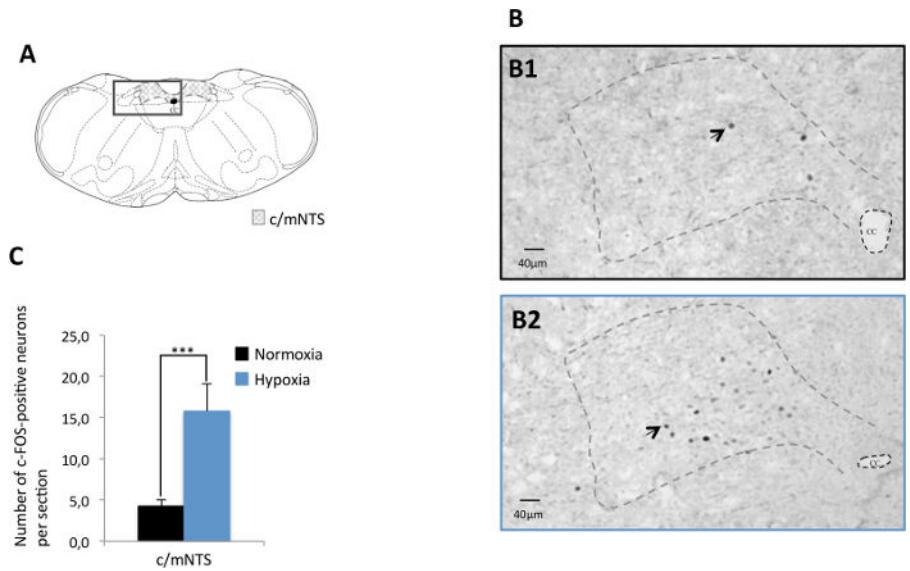


Figure 5. c-FOS-positive neurons on sections of the medulla oblongata in control mice and mice submitted to hypoxia *in vivo*. (A) Drawing of a section of the medulla oblongata adapted from Paxinos and Franklin²⁴ (Bregma -7, 48 mm). The dotted area delimitates the commissural and median parts of the nucleus tractus solitarius c/mNTS. The box illustrates the structures illustrated by photomicrographs (B1 and B2). (B) Photomicrographs performed (x100) at the c/mNTS level in normoxia (B1. control, black frame) or under hypoxia (B2. blue frame). The black arrows show c-FOS-positive cells. (C) Histogram showing the mean number of c-FOS-positive cells per section at c/mNTS level in normoxia (black bar) or under hypoxia (blue bar). Values are expressed as mean \pm SD. * indicates a significant difference between normoxia and hypoxia values - Student's unpaired *t* test; ****p* < 0.001. CC: central canal of spinal cord; c/mNTS: commissural and median parts of the nucleus tractus solitarius. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Time	Step	Media	Duration	T°C	
Day 1	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	room temperature	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
	Endogenous peroxidase activity destruction		H ₂ O ₂ 3% in PBS 0.1M		30 minutes
		Rinse	PBS 0.1M		10 minutes
		Rinse	PBS 0.1M		10 minutes
	Non specific binding sites blockade		PBST + serum 2%		60 minutes
		Rinse	PBS 0.1M		10 minutes
		Rinse	PBS 0.1M		10 minutes
	Incubation with primary antibody	Ab-I in PBST + BSA 0.25%	48 hours		4°C
Day 3	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes	room temperature	
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
	Rinse	PBS 0.1M	10 minutes		
	Incubation with secondary antibody		Ab-II in PBST + BSA 0.25%		60 minutes
			Avidine 1/250 Biotine 1/250 in PBST		prepare at least 30 minutes before use
	Avidin-biotin-peroxidase complex preparation		PBST		10 minutes
		Rinse	PBST		10 minutes
		Rinse	PBST		10 minutes
	Incubation with avidin-biotin-peroxidase complex				60 minutes
		Rinse	PBST		10 minutes
		Rinse	PBST		10 minutes
	revelation		Tris-buffer		10 minutes
			Tris-buffer		10 minutes
			DAB 0.02% - Ni 0.04% - H202 0.01% in Tris-Buffer		5 - 15 minutes
	revelation		PBS 0.1M		10 minutes
Rinse		PBS 0.1M	10 minutes		
Rinse		PBS 0.1M	10 minutes		
Storage in freedge	PBS 0.1M		4°C		

Ab-I, primary antibody; Ab-II, secondary antibody; BSA, Bovine Serum Albumine; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Ni, nickel ammonium sulphate; PBS 0.1M, 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4); PBST, 0.1 M Phosphate-buffered saline supplemented with 0.3% Triton X-100; Serum, serum from species used for secondary antibody production

Table 1. Immunohistological Procedure. Chronological steps of the c-FOS procedure. Ab-I, primary antibody; Ab-II, secondary antibody; BSA, Bovine Serum Albumin; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Ni, nickel ammonium sulphate; PBS 0.1 M, 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4); PBST, 0.1 M Phosphate-buffered saline supplemented with 0.3% Triton X-100; Serum, serum from species used for secondary antibody production. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

C-fos is an immediate early gene, and the detection of its product, the c-FOS protein, is classically used to identify neuronal populations involved in specific respiratory responses *in vivo*^{11,13,25,28} and *ex vivo*^{16-18,27,32,33}.

Critical Steps Within the Protocol

Be careful during the perfusion step. The 4% PFA solution must be well prepared and the fixation and post-fixation steps must be long enough to obtain optimal slicing and staining. Furthermore, the revelation is the most important step of the procedure; the intensity of the staining should be controlled to avoid background noise.

Advantages of the Technique and Significance with Respect to Existing Methods

Although some neurons do not seem to express the *c-fos* gene⁵, this method has been proved to be useful to determine neural pathways activated, for example in respiratory rhythm adaptation during chemical challenges. Compared to other immediate early genes, *c-fos* has a low expression in the absence of stimulation, allowing easier quantification of neuronal activity under a test situation⁶.

The c-FOS detection is a cellular technique that indicates global changes in activity in order to analyze neuronal populations involved in response to several stimuli. Compared with neuronal activity analysis using an electrophysiological approach, which most of the time concerns only a small number of cells in a defined brain area, c-FOS detection permits one to appreciate changes of activity in a large number of cells and therefore to define active areas in the whole CNS. C-FOS detection is easily compatible with unrestrained and awake animals, which is not the case during neuronal activity recording by electrophysiology. This is an advantage because it avoids stress and interference of anesthetics with the obtained results.

Ex vivo, we used a 30 min period of stimulation. It was previously shown that this stimulation is sufficient to induce changes in *c-fos* expression at the neuronal level³⁴⁻³⁶. Five min of stimulation are sufficient to induce changes in *c-fos* expression, which are observed after a latent period of 15 to 20 min³⁷. The related increases in *c-fos* expression are related to changes in activity taking place during the first 10 min of stimulation.

Limitations of the Technique

Following stimulation, a delay is required before the accumulation of c-FOS in the nucleus. This delay of about 30 min corresponds to mRNA and protein synthesis. This item is opposed to the immediacy of the results that may be obtained by recording the activity of neurons with electrophysiology. This can cause a loss of information about rapid changes in neuronal activity after a specific and transient stimulus.

As c-FOS protein may have a half-life of 90 to 100 min⁴, its expression could be affected by the surgical procedures or stress associated with the manipulation of the animal, its constraint, or changes in its environment. Thus, it is necessary to minimize manipulations that could induce changes in neuronal activity not related to the studied stimulus and to perform tissue sampling immediately after the end of the physiological stimulus.

Modifications and Troubleshooting of the Technique

In this protocol, the revelation step used a solution that contained 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, nickel ammonium sulphate, and hydrogen peroxide, but the commercial kits for peroxidase could also be used for this step.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The University Paris 13 supported this work. ASPT was supported by a University Paris 13 fellowship and the "Association Française pour le Syndrome d'Ondine". FJ was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The GR-Ex (ref ANR-11-LABX-0051) is funded by the program "Investissement d'avenir" of the French National Research agency (ref ANR-11-IDEX-0005-02).

References

1. Curran, T., & Teich, N. M. Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology*. **116**, 221-235 (1982).
2. Curran, T., MacConnell, W. P., van Straaten, F., & Verma, I. M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the *v-fos* gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol*. **3**, 914-921 (1983).
3. Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L., & Verma, I. M. Viral and cellular *fos* proteins: a comparative analysis. *Cell*. **36**, 259-268 (1984).
4. Herdegen, T., & Leah, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*. **28**, 370-490 (1998).
5. Dragunow, M., & Faull, R. The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. **29**, 261-265 (1989).
6. Bullitt, E. Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. **296**, 517-530 (1990).
7. Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature*. **311**, 433-438 (1984).
8. Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem*. **260**, 14101-14110 (1985).
9. Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., & Curran, T. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*. **312**, 716-720 (1984).
10. Teppema, L. J., Berkenbosch, A., Veening, J. G., & Olievier, C. N. Hypercapnia induces *c-fos* expression in neurons of retrotrapezoid nucleus in cats. *Brain Res*. **635**, 353-356 (1994).
11. Teppema, L. J. *et al.* Expression of *c-fos* in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol*. **388**, 169-190 (1997).
12. Larnicol, N., Wallois, F., Berquin, P., Gros, F., & Rose, D. *c-fos*-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *J Physiol Paris*. **88**, 81-88 (1994).
13. Bodineau, L., & Larnicol, N. Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience*. **108**, 643-653 (2001).
14. Erickson, J. T., & Millhorn, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol*. **348**, 161-182 (1994).
15. Bodineau, L. *et al.* Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pediatr Res*. **53**, 266-273 (2003).
16. Voituron, N., Frugiere, A., Gros, F., Macron, J. M., & Bodineau, L. Diencephalic and mesencephalic influences on ponto-medullary respiratory control in normoxic and hypoxic conditions: an *in vitro* study on central nervous system preparations from newborn rat. *Neuroscience*. **132**, 843-854 (2005).
17. Voituron, N., Frugiere, A., Champagnat, J., & Bodineau, L. Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface *in vitro*. *J Physiol*. **577**, 55-68 (2006).
18. Voituron, N. *et al.* The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience*. **194**, 95-111 (2011).
19. Suzue, T. Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol*. **354**, 173-183 (1984).
20. Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. (2012).

21. Rousseau, J. P., & C., C. Electrophysiology on isolated brainstem-spinal cord preparations from newborn rodents allows neural respiratory network output recording. *Journal of Visualized Experiments*. **In press** (2015).
22. Start, R. D., Layton, C. M., Cross, S. S., & Smith, J. H. Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol*. **45**, 1120-1121 (1992).
23. Paxinos, G., & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th edition edn, CA: Academic Press, (1998).
24. Paxinos, G., & Franklin, K. B. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition edn, CA: Academic Press, (2001).
25. Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., & Larnicol, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res*. **857**, 30-40 (2000).
26. Berquin, P., Cayetanot, F., Gros, F., & Larnicol, N. Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res*. **877**, 149-159 (2000).
27. Bodineau, L., Cayetanot, F., & Frugiere, A. Fos study of ponto-medullary areas involved in the *in vitro* hypoxic respiratory depression. *Neuroreport*. **12**, 3913-3916 (2001).
28. Takakura, A. C. *et al.* Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol*. **572**, 503-523 (2006).
29. Mulkey, D. K. *et al.* Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci*. **7**, 1360-1369 (2004).
30. Finley, J. C., & Katz, D. M. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res*. **572**, 108-116 (1992).
31. Bodineau, L. *et al.* Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology*. **152**, 3492-3503 (2011).
32. Okada, Y., Chen, Z., Jiang, W., Kuwana, S., & Eldridge, F. L. Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *J Appl Physiol* (1985). **93**, 427-439 (2002).
33. Saadani-Makki, F., Frugiere, A., Gros, F., Gaytan, S., & Bodineau, L. Involvement of adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Neuroscience*. **127**, 505-518 (2004).
34. Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. **237**, 192-197 (1987).
35. Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. **240**, 1328-1331 (1988).
36. Herdegen, T., Kovary, K., Leah, J., & Bravo, R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol*. **313**, 178-191 (1991).
37. Marina, N., Morales, T., Diaz, N., & Mena, F. Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments. *Brain Res*. **954**, 100-114 (2002).

RÉSULTATS GÉNÉRAUX

Les résultats obtenus au cours de ce doctorat sont articulés en trois parties dénommées « Modulation de la ventilation en normocapnie par l'étonogestrel » (partie 1), « Implication de l'érythropoïétine dans la ventilation en hypercapnie » (partie 2), enfin « Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie » (partie 3). La première partie traitera de l'implication de l'étonogestrel sur le CCR en normocapnie, la seconde et la troisième aborderont le rôle respectif de l'érythropoïétine et de la leptine sur la CCR en condition basale et son adaptation aux variations de CO_2/H^+ .

Partie 1: Modulation de la ventilation en normocapnie par l'étonogestrel

Un des objectifs de ce doctorat était de caractériser l'effet de l'ETO sur la CCR en normocapnie et de déterminer en partie ses mécanismes d'action. Pour cela, nous avons examiné l'effet de l'ETO sur :

- les variables ventilatoires de base chez les patientes CCHS qui ont présenté une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ (Straus et al., 2010) avant, pendant et après l'exposition au progestatif ;
- l'activité rythmique (CCR) de base des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris nouveau-nées ;
- l'activité neuronale des structures neuronales bulbaires en conditions basales issues des préparations *ex vivo*.

Les résultats obtenus ont donné lieu à deux articles qui vous seront présentés ci-dessous et dont les principaux éléments seront résumés en amont.

I. **Article publié : *Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems***

Certains travaux de la partie 1 des résultats ont donné lieu à :

- 1 article de recherche publié en 2016 dans *Neuropharmacology*

Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems

Joubert F, **Perrin-Terrin AS**, Verkaeren E, Cardot P, Fiamma MN, Frugiere A, Rivals I, Similowski T, Straus C, Bodineau L

Neuropharmacology, 2016,107, p.339-350

1. Résumé

Le désogestrel améliore la ventilation chez des patients CCHS : données animales impliquant les systèmes sérotoninergiques

Objectif

Déterminer l'effet d'un progestatif, le désogestrel sur la ventilation basale. Pour cela nous avons dans un premier temps analysé de manière rétrospective les variables respiratoires de base de deux patientes atteintes du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénital (CCHS) pour lesquelles une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ a été observée sous progestatif (Straus et al., 2010). Dans un second temps, nous avons déterminé chez l'animal les mécanismes impliqués dans l'effet de ce progestatif au niveau du bulbe rachidien, région encéphalique contenant les structures qui génèrent et modulent la CCR, en enregistrant l'activité rythmique assimilée à la commande centrale respiratoire au niveau de la racine cervicale ventrale C4 de préparations *ex vivo* de SNC isolé de souris nouveau-nées de façon à étudier la fréquence (f_R) et l'amplitude des bouffées inspiratoires (IntC4) dans les différentes conditions expérimentales testées (normocapnie avec ou sans application ou co-application pharmacologique).

Contexte scientifique

Le CCHS est une maladie neuro-respiratoire caractérisée par une diminution importante ou une abolition de la chémosensibilité au CO_2/H^+ se traduisant par une hypoventilation profonde pendant le sommeil (Amiel et al., 2003). Ce syndrome est dû à une mutation du gène *PHOX2B* (Amiel et al., 2003). Cette pathologie nécessite une assistance ventilatoire mécanique au moins pendant le sommeil pérenne et aujourd'hui, aucun traitement pharmacologique n'est connu.

Chez deux patientes CCHS adultes, une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ a été observée de manière fortuite au sein de notre laboratoire (Straus et al., 2010). Ces deux patientes avaient commencé à prendre du désogestrel dans le cadre de leur contraception (Straus et al., 2010). En prenant en considération les effets connus de la progestérone sur la CCR (Behan et al., 2003), l'hypothèse d'une implication du désogestrel dans cette récupération de la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ a été émise (Straus et al., 2010). Cependant, chez une autre patiente CCHS qui a reçu volontairement du désogestrel (Li et al., 2013a), cette récupération n'a pas été observée. Ces effets contradictoires pourraient être dus à la complexité d'action du progestatif et/ou aux variations inter-individuelles (e.g. âge, mutation).

Le désogestrel, dont le principal métabolite actif est l'étonogestrel (ETO), est un progestatif de synthèse dérivé de la testostérone appartenant à la famille des gonanes (Schumacher et al., 2007, Sitruk-Ware, 2008). Son mécanisme d'action pourrait impliquer de

multiples voies. Des études menées chez l'animal ont révélé que l'effet de la progestérone et des progestatifs 1) dépendait de mécanismes localisés au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral (Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990, Pascual *et al.*, 2002) et 2) pouvait être lié à des effets génomiques (Schumacher et al., 2007) et non génomiques (Pascual et al., 2002, Belelli & Lambert, 2005, Ren & Greer, 2006b, Pang et al., 2013). La compréhension des mécanismes d'action du désogestrel et de l'ETO sur la CCR est fondamentale pour évaluer les conditions à partir desquelles les patients souffrant de syndromes d'hypoventilation (CHS) tel que le CCHS pourraient recevoir ces progestatifs dans le cadre de leur traitement.

Résultats et discussion

- **Le désogestrel augmente la f_R de base et réduit la $P_{ET}CO_2$ chez les deux patientes CCHS**

Ces deux patientes présentaient un profil respiratoire similaire pendant l'exposition au désogestrel *i.e.* une augmentation de la f_R accompagnée d'une diminution de la $P_{ET}CO_2$ (pression télé-expiratoire en CO_2 correspondant à la valeur de $PaCO_2$ à la fin de l'expiration). Les données de la littérature suggèrent que la progestérone et certains progestatifs de la famille des pregnanes augmentent la f_R chez des sujets sains (Skatrud et al., 1978a, Behan et al., 2003, Jensen et al., 2008) mais pas chez les patients CCHS (Sritippayawan et al., 2002). Nos observations suggèrent que le désogestrel, et plus largement les progestatifs de la famille des gonanes, pourraient interférer avec le contrôle de la ventilation via des mécanismes distincts de ceux impliqués dans l'effet des pregnanes.

- **Des mécanismes bulbaires sont impliqués dans l'effet facilitateur de l'ETO sur la f_R**

La f_R de base des préparations *ex vivo* était significativement augmentée après exposition à l'ETO, de manière dose dépendante, alors que l'intégration de l'amplitude des bouffées inspiratoires ($IntC_4$) n'était pas modifiée. Ces résultats sont en accord avec nos observations sur les deux patientes CCHS qui montrent une augmentation de la f_R sans modification du V_T , suggérant que l'augmentation de la f_R observée chez ces deux patientes dépendrait, au moins en partie, de mécanismes bulbaires. L'approche histologique a mis en évidence des modifications de l'expression de *c-fos* au niveau de la VLM, région qui contient le PréBötC (Feldman et al., 2013), des noyaux du RPa et du ROb et du NTSc/m ainsi qu'une implication des neurones catécholaminergiques A_1/C_1 au niveau de la VLM.

- **Le récepteur $GABA_A$ est impliqué dans la modulation de la f_R par l'ETO**

Le blocage des récepteurs $GABA_A$ supprime soit totalement soit partiellement l'effet de l'ETO suivant la concentration testée. Ces résultats suggèrent 1) qu'au moins une partie de l'effet de l'ETO sur la f_R dépend d'une interaction avec les récepteurs $GABA_A$ et 2) que cette interaction soit dose-dépendante. Des études réalisées sur des progestatifs de la famille des

pregnanes ont montré qu'en fonction de la concentration du progestatif, différentes sous-unités des récepteurs GABA_A pouvaient être modulées. Les récepteurs contenant les sous-unités α_1 et α_3 sont modulés par de faibles concentrations alors que la modulation de récepteurs qui contiennent les sous-unités α_2 , α_4 , α_5 ou α_6 nécessite des concentrations 3 à 10 fois plus élevées (Belelli et al., 2002). Notre hypothèse est que l'effet dose dépendant de l'ETO dépend d'une interaction avec différentes isoformes de la sous-unité α du récepteur GABA_A (Belelli & Lambert, 2005).

De plus, l'ETO potentialise l'effet du muscimol sur la f_R . Ce résultat suggère que le progestatif est un modulateur positif du récepteur GABA_A. Cette hypothèse est corroborée par le fait d'une part que la testostérone, molécule à partir de laquelle le progestatif dérive, est un modulateur positif de GABA_A (Park-Chung et al., 1999) et que d'autre part les modulateurs négatifs de GABA_A sont caractérisés par une charge négative au niveau du carbone C3 (Park-Chung et al., 1999), ce qui n'est pas le cas de l'ETO qui y présente un groupe cétone Grandi (Grandi et al., 2014).

- **Le récepteur NMDA est impliqué dans la modulation de la f_R par l'ETO**

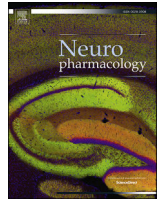
Les résultats de co-application pharmacologique montrent 1) que l'effet facilitateur induit par l'ETO est supprimé après le blocage des récepteurs NMDA et 2) que l'ETO à 0,05 μ M potentialise l'effet du NMDA sur le récepteur NMDA. Les résultats d'immunohistochimie montrent quant à eux une augmentation de l'expression de *c-fos* au niveau du NTSc/m uniquement à 0,05 μ M d'ETO. En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, notre hypothèse est qu'à cette concentration, l'ETO module les récepteurs NMDA localisés au niveau de neurones du NTSc/m (Lin *et al.*, 2008). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la modulation par certains stéroïdes des neurones du NTSc/m a été démontrée (Xue & Hay, 2003).

- **Une voie nerveuse impliquant les systèmes sérotoninergiques est impliquée dans la modulation de la f_R par l'ETO**

Le blocage des systèmes sérotoninergiques supprime l'effet facilitateur de l'ETO sur la f_R , suggérant l'implication d'une signalisation sérotoninergique dans cet effet. De plus, les résultats immunohistochimiques montrent une activation des neurones sérotoninergiques au niveau du RPa et du ROb. Les données de la littérature relatent une implication des neurones sérotoninergiques dans l'influence facilitatrice de la progestérone (Farmer *et al.*, 1996, Behan et al., 2003) qui dépend de structures pontiques (Robichaud & Debonnel, 2004) ou hypothalamiques (Farmer et al., 1996). Ainsi, nos résultats suggèrent une interaction de l'ETO avec les systèmes sérotoninergiques au niveau bulbaire, impliquant une nouvelle voie d'interaction entre les systèmes progestéronergiques et sérotoninergiques qui pourrait être spécifique des progestatifs de la famille des gonanes.

Conclusion

Des résultats émanant des patientes CCHS ont montré que le désogestrel était associé à une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ (Straus et al., 2010). De même, l'ETO, son principal métabolite actif, a montré une amélioration de la chémosensibilité au CO_2/H^+ via des mécanismes supra-bulbaires chez le rat nouveau-né (Loiseau et al., 2014). Combinées aux résultats précités, ces observations suggèrent l'implication de deux voies distinctes dans les effets du progestatif sur la ventilation *i.e.* une voie bulbaire dans la modulation des variables respiratoires de base et une voie supra-bulbaire dans la chémosensibilité au CO_2/H^+ . Des mécanismes bulbaires et supra-bulbaires pourraient donc coexister chez les patients CCHS. Les données animales, qui sont en faveur de la participation d'une voie sérotoninergique bulbaire dans l'effet stimulant de l'ETO sur la f_R , conduisent à proposer des perspectives cliniques basées sur la combinaison de ces progestatifs avec un traitement sérotoninergique en vue d'améliorer les effets du désogestrel sur la ventilation de patients CCHS.



Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems



Fanny Joubert^a, Anne-Sophie Perrin-Terrin^{a,b}, Emilienne Verkaeren^a, Philippe Cardot^a, Marie-Noëlle Fiamma^a, Alain Frugière^a, Isabelle Rivals^{a,c}, Thomas Similowski^{a,d,e,1}, Christian Straus^{a,e,f,1}, Laurence Bodineau^{a,*}

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie respiratoire expérimentale et clinique, F-75013, Paris, France

^b University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratory "Hypoxia & Lung" EA2363, 74 rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny, France

^c Équipe de Statistique Appliquée, ESPCI ParisTech, PSL Research University, F-75005, Paris, France

^d AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale (Département "R3S"), F-75013, Paris, France

^e AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Branche "Adultes" du Centre de Référence du Syndrome d'Ondine, F-75013, Paris, France

^f 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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2015

Received in revised form

25 February 2016

Accepted 24 March 2016

Available online 1 April 2016

Keywords:

Central congenital hypoventilation syndrome

Etonogestrel

Ex vivo medullary-spinal cord preparations

In vivo

Progesterin

Mice

ABSTRACT

Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is a neurorespiratory disease characterized by life-threatening sleep-related hypoventilation involving an alteration of CO₂/H⁺ chemosensitivity. Incidental findings have suggested that desogestrel may allow recovery of the ventilatory response to CO₂. The effects of desogestrel on resting ventilation have not been reported. This study was designed to test the hypothesis that desogestrel strengthens baseline ventilation by analyzing the ventilation of CCHS patients. Rodent models were used in order to determine the mechanisms involved. Ventilation in CCHS patients was measured with a pneumotachometer. In mice, ventilatory neural activity was recorded from *ex vivo* medullary-spinal cord preparations, ventilation was measured by plethysmography and *c-fos* expression was studied in medullary respiratory nuclei. Desogestrel increased baseline respiratory frequency of CCHS patients leading to a decrease in their PET_{CO2}. In medullary spinal-cord preparations or *in vivo* mice, the metabolite of desogestrel, etonogestrel, induced an increase in respiratory frequency that necessitated the functioning of serotonergic systems, and modulated GABA_A and NMDA ventilatory regulations. c-FOS analysis showed the involvement of medullary respiratory groups of cell including serotonergic neurons of the *raphe pallidus* and *raphe obscurus* nuclei that seem to play a key role. Thus, desogestrel may improve resting ventilation in CCHS patients by a stimulant effect on baseline respiratory frequency. Our data open up clinical perspectives based on the combination of this progestin with serotonergic drugs to enhance ventilation in CCHS patients.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; CCHS, congenital central hypoventilation syndrome; CVD, central ventilatory drive; DMSO, dimethylsulfoxide; DSG, desogestrel; ETO, etonogestrel; *f_R*, respiratory frequency; IntC4, integrated C4 burst activity; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NTS, nucleus tractus solitarius; PET_{CO2}, end-tidal carbon dioxide partial pressure; PBS, phosphate-buffered saline; preBotC, pre-Botzinger complex; RMg, raphe magnus; Rob, raphe obscurus; RPa, raphe pallidus; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group; *V_E*, minute ventilation; VLM, ventrolateral medullary reticular nucleus; *V_T*, tidal volume; 5-HT, serotonin.

* Corresponding author.

E-mail address: laurence.bodineau@upmc.fr (L. Bodineau).

¹ These authors have contributed equally to this work.

1. Introduction

Breathing depends on a rhythmic command originating in a brainstem neuronal network that is finely tuned to variations of O₂, CO₂ and pH (Feldman et al., 2013). Significant disruptions in the neuronal respiratory network or its regulatory processes are associated with various pathological conditions including central hypoventilation syndromes (Carroll et al., 2010; Ramanantsoa and Gallego, 2013). These disorders can be life-threatening and may require mechanical ventilatory assistance. They expose patients to neural damage (Harper et al., 2014) and impair their quality of life. No pharmacological treatment is available for central

hypoventilation syndromes.

Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) is a neurorespiratory disease characterized by sleep-related hypoventilation and the absence or reduction in CO_2/H^+ chemosensitivity (Amiel et al., 2003; Weese-Mayer et al., 2010) due to mutations of the *PHOX2B* gene (Amiel et al., 2003). Recovery of CO_2/H^+ chemosensitivity was incidentally observed in two adult CCHS women using desogestrel (DSG) for contraceptive purposes (Straus et al., 2010). In view of the known effects of progesterone on central ventilatory drive (CVD) and despite the absence of known effects of progesterone in CCHS (Behan et al., 2003; Sritippayawan et al., 2002), it was hypothesized that DSG was responsible for restoring the ventilatory response to CO_2 (Straus et al., 2010). Deliberately administering DSG to another patient did not induce any recovery of CO_2/H^+ chemosensitivity (Li et al., 2013). These contradictory findings may be due to the complex nature of the actions of progestins on breathing control, idiosyncrasies or both. The action of DSG (Straus et al., 2010), or rather its metabolite 3-ketodesogestrel (etonogestrel; ETO), a synthetic progestin derived from testosterone and belonging to the gonane family (Schumacher et al., 2007; Sitruk-Ware, 2008), may involve multiple pathways, as animal studies have revealed that the ventilatory action of progesterone and progestins depends on hypothalamus and brainstem mechanisms (Bayliss et al., 1990; Pascual et al., 2002) related to both genomic (Schumacher et al., 2007) and non-genomic effects (Belelli and Lambert, 2005; Pang et al., 2013; Pascual et al., 2002; Ren and Greer, 2006). A better understanding of the mechanisms of action of DSG and ETO on breathing command and regulation is fundamental to evaluate the conditions under which these progestins could be used to treat patients with central hypoventilation. In this context, we recently showed, in rodents, that ETO enhances the ventilatory response to metabolic acidosis by a mechanism involving supramedullary structures (Loiseau et al., 2014). Whether or not DSG and ETO interfere with generation of the respiratory rhythm (namely resting ventilation) is currently unknown.

The present study examined the effect of DSG on resting ventilation in CCHS women and the actions of its metabolite, ETO, on CVD at the medulla oblongata, the anatomical region where essential respiratory neural structures are located (Feldman et al., 2013). The *ex vivo* mouse medullary-spinal cord preparation was used to identify the medullary effects of ETO (Voituron et al., 2011). Combined co-applications of ETO and GABA_Aergic, glutamatergic and serotonergic agonists or antagonists and c-FOS analysis were used to identify the mechanisms involved. Some of the results of these studies have been previously reported in the form of abstracts (Joubert et al., 2014; Perrin-Terrin et al., 2015).

2. Materials and methods

2.1. Humans

The study in humans was carried out on the ventilatory signal recorded by Straus et al (Straus et al., 2010) at the time of the first description of recovery of chemosensitivity in two CCHS patients taking DSG 75 μg daily for contraception. The previous publication (Straus et al., 2010) reported the ventilatory response of patients to hypercapnia. In the present study, we analyzed the baseline ventilation recorded before exposure to hypercapnia.

The two patients were regularly assessed in the adult branch of the French reference Center for CCHS (Straus et al., 2010; Trang et al., 2005), according to current guidelines (Weese-Mayer et al., 2010). Both patients gave their written consent to scientific publication of the results obtained from their data (Straus et al., 2010).

Briefly, the first patient was a 19-year-old woman, who harbored a 5-alanine expansion mutation of the *PHOX2B* gene. At

the time of the study, she was dependent on mechanical ventilation only during sleep and presented normal ventilation during wakefulness at rest.

The second patient was a 30-year-old woman, who harbored a 6-alanine expansion mutation of the *PHOX2B* gene. At the time of the study, she was still tracheotomized and dependent on mechanical ventilation, but only during sleep. However, hypoventilation was present during wakefulness at rest ($\text{P}_a\text{O}_2 \approx 75$ mmHg; $\text{P}_a\text{CO}_2 \approx 55$ mmHg).

The two patients breathed through a pneumotachometer and their tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), minute ventilation (\dot{V}_E), and end-tidal carbon dioxide partial pressure (PET_{CO_2}) were recorded (Hyp'Air Compact+, Medisoft, Sorinnes-Dinant, Belgium) at different times during 5 respiratory cycles, *i.e.* before, during and after DSG exposure.

2.2. Animals

Experiments were performed on both male and female newborn (0–3 days old; $2.1 \pm 0.1\text{g}$) wild-type mice (*Mus musculus*, OF1 strain; Charles River laboratories, L'Arbresle, France (<http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/of1-mouse>)). All experiments 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 kept on a 12 h light-dark cycle with free access to food and water.

2.2.1. Pharmacological agents

Drugs obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), were prepared in either saline or dimethylsulfoxide (DMSO) and were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for *ex vivo* preparations and in oil for *in vivo* experimentations (Garcia-Pelaez et al., 2007; Ren and Greer, 2006). Bicuculline, MK-801, methysergide, N-methyl-D-aspartate (NMDA), muscimol and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) were prepared in saline. ETO, like other steroids, was dissolved in DMSO or oil.

2.2.2. Whole body plethysmography

Animals were placed in an experimental chamber (20 mL) in which they could freely move. The chamber was maintained at 33 °C, the thermoneutral zone (Gordon, 1993), with an external heat source. During the experimental period, the chamber was continuously flushed at 0.6 L min^{-1} for the continuous delivery of air and removal of expired CO_2 . Using an adaptation of the barometric method previously described (Bartlett and Tenney, 1970), the pressure change induced by the respiratory flow was recorded with a differential pressure transducer (Valyline MP 45, Northridge, CA, USA). The pressure signal was digitized through a Lab-Chart data analysis system (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Measurements were made on 15 s, at intervals of 5 min.

2.2.3. Medullary-spinal cord preparations

Newborn mice were placed under deep cold anesthesia and medullary-spinal cord preparations were dissected out as previously described. The rostral section was made at the level of the eighth cranial nerve exit point. The caudal section was made between the seventh and eighth cervical spinal roots. Preparations were placed in a recording chamber with the ventral surface facing upward. They were continuously superfused at a rate of 10 ml/min, at 26 °C, with dioxygenated aCSF (129.0 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.26 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.15 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.58 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 21.0 mM NaHCO_3 , 30.0 mM D-glucose) saturated with O_2 and adjusted to pH 7.4 by bubbling with 95% O_2 and 5% CO_2 (normal pH-

aCSF).

CVD was analyzed by measuring the electrical activity of a fourth cervical ventral nerve root (C4) recorded using a suction electrode, filtered (10–3000 Hz), amplified ($\times 5000$), integrated (time constant 100 ms) and digitized by a Spike 2 data analysis system (CED, Cambridge, UK), at a sampling frequency of 2500 Hz. As previously reported, f_R was commonly defined as the burst frequency recorded from C4 over 1 min. The integrated C4 burst activity (IntC4) was also used as an index of inspiratory activity (Voituron et al., 2006).

2.2.4. Pharmacological applications

2.2.4.1. Analysis of the effect of ETO on in vivo newborn mice. Newborn mice received *per os* either ETO (10^{-3} mg/kg) dissolved in oil, or oil alone.

2.2.4.2. Analysis of the effect of ETO on ex vivo preparations. After completion of the surgical procedure, *ex vivo* preparations were maintained in normal pH-aCSF superfusion for 30 min to stabilize CVD; baseline values were defined as the mean value over the last 5 min of this period. The effect of ETO was determined under normal pH at 0.05, 0.5, 1 and 2 μ M (final concentration of DMSO used to dissolve ETO was 0.01%). After stabilization, ETO or DMSO alone was added to normal pH-aCSF for 30 min. f_R and IntC4 were then averaged over successive 5-min intervals and expressed as a percentage of baseline values. Preparations were then either returned to normal pH-aCSF superfusion for 30 min or fixed by incubation in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4).

2.2.4.3. Analysis of interactions of ETO with GABA_A receptors on ex vivo preparations. In a first step, we investigated possible interactions between GABA_A receptors and ETO by evaluating changes in the effect of ETO under conditions of GABA_A receptor blockade. After stabilization, preparations were successively superfused with normal pH-aCSF containing bicuculline for 10 min followed by normal pH-aCSF containing bicuculline and supplemented with ETO or DMSO for 30 min; f_R , the only respiratory variable affected by ETO, was expressed as a percentage of bicuculline values (values obtained during the last 5 min of bicuculline exposure). Preparations were subsequently returned to normal pH-aCSF for 10 min.

In a second set of experiments, we tried to characterize the action of ETO on the GABA_A receptor effects on f_R *i.e.* facilitation or moderation. We compared the effect of muscimol on f_R in both the presence and the absence of ETO. According to data of the literature, the IC₅₀ of muscimol was first determined by examining its effect on f_R at several concentrations (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.25 μ M) for 4 min. Preparations were exposed to normal pH-aCSF containing either ETO or DMSO and then to normal pH-aCSF containing ETO or DMSO with muscimol at IC₅₀ for 4 min; f_R was expressed as a percentage of pre-muscimol values (values obtained during the 5 min preceding muscimol exposure). Preparations were subsequently returned to normal pH-aCSF for 10 min.

2.2.4.4. Analysis of interactions of ETO with NMDA receptors on ex vivo preparations. According to data of the literature, the EC₅₀ of the effect of NMDA on f_R was determined by examining its effect at several concentrations (8.0, 8.5, 9.0, 9.5 and 10 μ M) for 10 min.

First, we evaluated changes in the effect of ETO under conditions of NMDA receptor blockade. We determined the lowest concentration of MK-801 that totally antagonized the NMDA effect on f_R . Preparations were successively exposed to several concentrations of MK-801 (2.5, 5 and 10 μ M) for 10 min followed by NMDA at EC₅₀ for 10 min; the lowest concentration of MK-801 that totally

antagonized NMDA receptors was found to be 2.5 μ M. Then, after a stabilization period, preparations were superfused with normal pH-aCSF containing MK-801 (2.5 μ M) for 10 min followed by normal pH-aCSF containing MK-801 supplemented with ETO for 30 min; f_R was expressed as a percentage of MK-801 values. Preparations were subsequently returned to normal pH-aCSF for 10 min.

Second, to investigate possible modulation of the effects of NMDA receptors on f_R by ETO, we compared the effect of NMDA in both the presence and the absence of ETO. Preparations were exposed to NMDA at EC₅₀ for 10 min after 30 min of exposure to normal pH-aCSF containing either ETO or DMSO; f_R was expressed as a percentage of pre-NMDA values (values obtained during the 5 min preceding NMDA exposure). Preparations were subsequently returned to normal pH-aCSF for 10 min.

2.2.4.5. Analysis of interactions of ETO with serotonergic systems on ex vivo preparations. To study the implication of serotonergic systems on modulation of central respiratory drive by ETO, we evaluated the effect of ETO in the presence of blockade of 5-HT_{1/2/7} receptors, which are the main 5-HT receptors involved in respiratory modulation (Hilaire and Duron, 1999).

We determined the effect of 5-HT (25 μ M) for 10 min on f_R . We then determined the lowest concentration of methysergide that totally antagonized the respiratory effects of 5-HT. Preparations were successively exposed to several concentrations (1, 2.5, 5 and 10 μ M) of methysergide for 10 min followed by 5-HT (25 μ M) for 10 min; the lowest concentration of methysergide that totally antagonized the effects of 5-HT on f_R was determined to be 5 μ M.

After a stabilization period, preparations were successively superfused with normal pH-aCSF containing methysergide (5 μ M) followed by a normal pH-aCSF containing methysergide supplemented with ETO for 30 min; f_R was expressed as a percentage of baseline values minus the effect of methysergide alone.

2.2.5. Immunohistochemistry

To identify ETO-induced changes in cell activity, immunohistochemical analysis for c-FOS was carried out in *ex vivo* medullary-spinal cord preparations exposed to either ETO or DMSO for 30 min ($n = 32$). At the end, preparations were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 48 h at 4 °C. Preparations were then cryoprotected for 48 h in 30% sucrose in 0.1 M PBS and stored at –20 °C for subsequent use. Standard immunohistochemical procedures were used to locate c-FOS on 40 μ m-thick coronal free-floating sections obtained using a cryostat (Leica CM 1510S) (Voituron et al., 2011). Briefly, sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-52; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:2000) in 1% BSA 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) and then with an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Novostain Super ABC kit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK; 1:250) for 1 h. Peroxidase activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

To characterize the cells displaying changes in activity revealed by c-FOS analysis, dual detections were performed *i.e.* c-FOS and tyrosine hydroxylase (TH) and c-FOS and 5-HT. Sections were first incubated with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-253 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:8000; 48 h; 4 °C), then with a biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories, Burlington, Canada; 1:500; 2 h) and ABC (1:250). Peroxidase activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.04% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris buffer (pH 7.6). Secondly, sections were 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) for 48 h at 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), respectively, and then 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).

In all cases, control sections were processed in parallel, but with the omission of primary or secondary antibodies. No labeling 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).

Sections were examined under a light microscope (Leica DM 2000; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). The distribution of c-FOS, c-FOS/TH and c-FOS/5-HT immunolabeled cells was plotted onto drawings with the aid of a drawing tube attached to the microscope (magnification $\times 10$). c-FOS and double-labeled cells were visually counted under the microscope at high magnification ($\times 400$) in medullary structures involved in central respiratory drive using standard landmarks (Paxinos et al., 2007; Paxinos and Franklin, 2001). Immunolabeled cells were photographed with a digital camera (Leica DFC450C, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). c-FOS-positive cells were analyzed in the ventrolateral medullary reticular nucleus (VLM), nucleus tractus solitarius (NTS), medullary raphe nuclei (raphe magnus (RMg), obscurus (ROb) and pallidus (RPa)), retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG), parapyramidal area (PP),

hypoglossal and facial nucleus. The VLM is a neuronal column ventral to the nucleus ambiguus including the pre-Botzinger complex (preBotC) and A1C1 group of neurons and extending from the pyramidal decussation to the caudal edge of the facial nucleus. Using standard landmarks (Paxinos et al., 2007; Paxinos and Franklin, 2001), a distinction was made between the caudal part of the RPa and ROB (from the pyramidal decussation to the rostral edge of the inferior olives) and their rostral part (from the rostral edge of the inferior olives to the rostral edge of the facial nucleus). Several subdivisions of the NTS were analyzed, *i.e.* the commissural, median and ventrolateral and the commissural and median subdivisions were grouped in a single entity referred to as the commissural/median NTS (c/mNTS).

2.2.6. Statistics

Data were expressed as mean (\pm SEM) and analyzed with GraphPad (GraphPad Prism5 San Diego California USA) or Matlab (MATLAB Version: 8.5.0.197613 (R2015a)).

For human data, the significance of the effects on the responses (f_R , V_T , \dot{V}_E PETCO₂) of the fixed effect time factor (before, during or after DSG treatment) and of the random effect patient factor (two modalities, first or second patient) were tested using a hierarchical two-way ANOVA, homoscedasticity being assessed by Bartlett's test, and normality by Lilliefors' variant of Kolmogorov-Smirnov's test. The *p*-values of the two-by-two comparisons between different times for each patient were adjusted for multiple testing using Sidak's correction. For animal data, a single dose of each tested drug was applied for each animal or preparation. Depending on normality and homoscedasticity, two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* least squares differences (PLSD) correction or

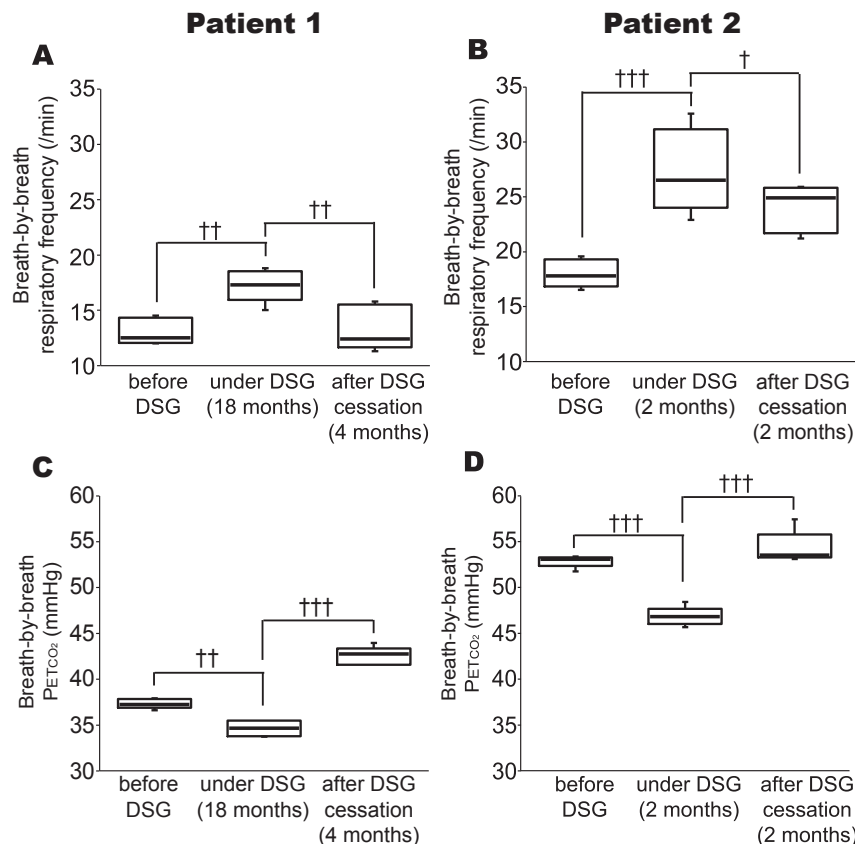


Fig. 1. DSG increases baseline f_R in two CCHS patients. (A–D) Boxplot showing the median breath-by-breath f_R (A and B) and median breath-by-breath PETCO₂ (C and D) in two CCHS patients. † indicates a significant difference between before or after DSG treatment and during DSG exposure. ANOVA 1 way – Bonferroni post test. †† *p* < 0.01, ††† *p* < 0.001; desogestrel (DSG).

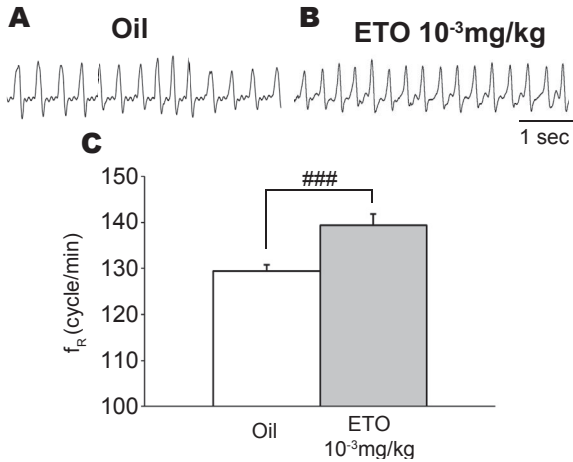


Fig. 2. ETO increases baseline f_R in vivo on newborn mice. (A–B) Traces illustrate baseline f_R of newborn mice after 2 h of oil (A) or ETO (B) exposure. (C) Histogram showing mean value of f_R of oil (white bar) or ETO (gray bar) exposure. Data are expressed as mean \pm SEM. # indicates a significant difference between oil and ETO values. Student *t*-test; ### $p < 0.001$.

Kruskal-Wallis test followed by Dunn's PLSD were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of DSG on baseline ventilatory variables of two CCHS patients

Before DSG exposure, the first CCHS patient displayed a \dot{V}_E of 8.33 ± 0.36 L/min resulting from a f_R of 13.06 ± 0.54 /min and a V_T of 0.64 ± 0.03 L. Her PET_{CO_2} was 37.33 ± 0.23 mmHg. Eighteen months after starting DSG (Straus et al., 2010), baseline f_R increased (17.26 ± 0.66 /min, +32%; $p < 0.01$; Fig. 1A), PET_{CO_2} decreased (34.63 ± 0.37 mmHg, -7%; $p < 0.01$; Fig. 1C), but V_T remained unchanged (0.66 ± 0.02 L), resulting in an increase in \dot{V}_E (11.42 ± 0.25 L/min, +37%; $p < 0.001$). Four months after stopping DSG, f_R and \dot{V}_E returned to baseline levels (13.34 ± 0.90 /min,

8.98 ± 0.29 L/min; $p < 0.01$; Fig. 1A) and PET_{CO_2} increased to 42.53 ± 0.45 mmHg ($p < 0.001$; Fig. 1C).

The second patient presented a similar response profile. Her baseline ventilatory variables were 18.02 ± 0.57 /min, 0.60 ± 0.03 L and 10.69 ± 0.49 L/min for f_R , V_T and \dot{V}_E , respectively. Her PET_{CO_2} was 52.90 ± 0.30 mmHg. Two months after starting DSG, f_R increased (27.36 ± 1.71 /min, +52%; $p < 0.001$; Fig. 1B), but V_T remained unchanged (0.61 ± 0.04 L), resulting in an increase in \dot{V}_E (16.53 ± 0.64 L/min, +55%; $p < 0.001$), while PET_{CO_2} decreased (46.86 ± 0.45 mmHg, -11%; $p < 0.001$; Fig. 1D). Two months after stopping DSG, f_R significantly decreased (24.00 ± 0.97 /min; $p < 0.05$; Fig. 1B) and \dot{V}_E was slightly lower than on DSG (16.45 ± 0.61 L/min) but still increased. PET_{CO_2} increased to 54.36 ± 0.79 mmHg ($p < 0.001$; Fig. 1D).

3.2. Effect of ETO on baseline respiratory frequency on in vivo newborn mice

After exposure to 10^{-3} mg/kg ETO, the baseline f_R was 196.6 ± 12.1 cycles/min (Fig. 2B,C; $n = 11$). This f_R was significantly increased compared to control mice (oil exposure; 146.8 ± 7.2 cycles/min, $p < 0.001$; Fig. 2A,C; $n = 16$).

3.3. Effect of ETO on ex vivo preparations

Baseline f_R was 8.5 ± 0.2 bursts/min with no significant differences between groups.

3.3.1. Effect of ETO on CVD

f_R was significantly increased after 25 min of exposure to 0.05, 0.5, 1 and 2 μ M ETO ($129.7 \pm 5.7\%$, $p < 0.001$, $n = 16$; $129.7 \pm 8.6\%$, $p < 0.001$, $n = 14$; $123.2 \pm 3.2\%$, $p < 0.001$, $n = 24$ and $147.1 \pm 5.8\%$, $p < 0.001$, $n = 14$, respectively; Fig. 3C–K), while in control, DMSO exposure, did not induce any significant changes ($111.0 \pm 3.7\%$, $n = 18$; Fig. 3A,B,K). f_R was significantly higher at all ETO concentrations than with DMSO (0.5 and 1 μ M $p < 0.01$; 0.05 and 2 μ M, $p < 0.001$; Fig. 3K). In addition, the increase in f_R induced by 2 μ M ETO was significantly greater than that observed with lower concentrations ($p < 0.01$, Fig. 3K). After removing the ETO by returning to normal-pH-aCSF, f_R returned to baseline values for 0.05 and

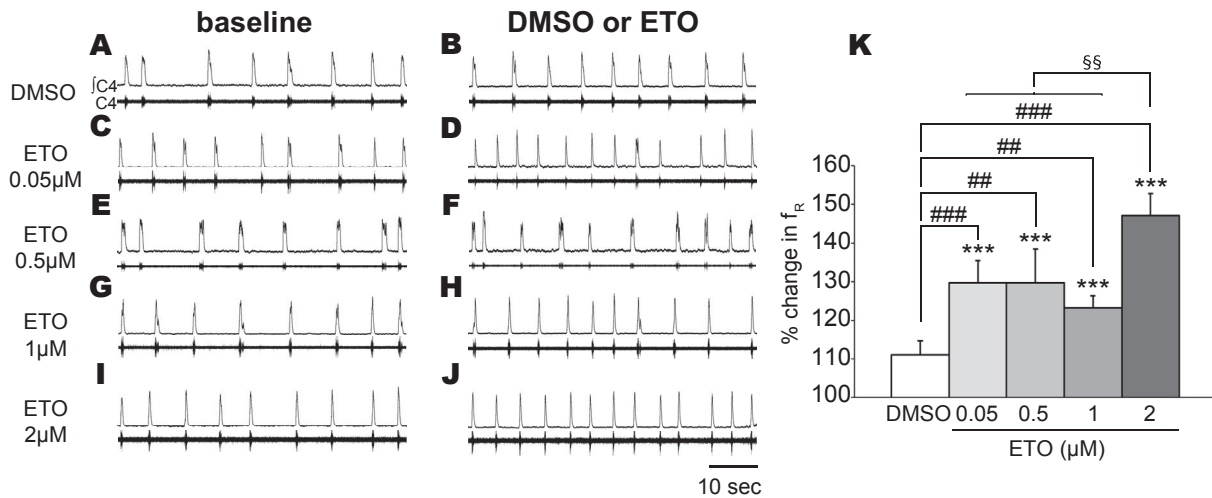


Fig. 3. ETO increases baseline f_R on ex vivo medullary-spinal cord preparations. (A–J) Traces illustrate ventilatory C4 activity recorded the last 5 min before (A, C, E, G and I) and during the DMSO (B) or ETO exposure (D, F, H and J). (K) Histogram showing mean value of f_R during DMSO (white bar) or ETO (gray bars) exposure. Data are expressed as mean \pm SEM * indicates a significant increase in mean f_R compared to baseline values. # indicates a significant difference between ETO 2 μ M and lower ETO concentrations. ANOVA 2 way – Bonferroni post test. Integrated activity of C4 ventral nerve root (C4); *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, §§ $p < 0.01$; etonogestrel (ETO).

0.5 μM ETO, but not for 1 and 2 μM ETO ($153.1 \pm 1.2\%$ and $154.3 \pm 14.3\%$, $p < 0.05$, respectively).

In contrast, the burst amplitude (IntC4) was not modified by ETO ($100.9 \pm 4.9\%$; $100.4 \pm 1.5\%$; $98.1 \pm 2.7\%$; $94.2 \pm 3.3\%$ for 0.05, 0.5, 1 and 2 μM ETO and $99.7 \pm 2.2\%$, for DMSO; Fig. 3A–J).

3.3.2. Interaction of ETO with the GABA_A receptor

After 10 min of exposure, bicuculline (GABA_A receptor antagonist) induced a significant increase in f_R ($137.7 \pm 8.0\%$, $p < 0.001$; Fig. 4A,C,E).

Under bicuculline, 0.05 μM ETO still induced a significant increase in f_R ($115.7 \pm 2.8\%$, $p < 0.05$, $n = 8$; Fig. 4C,D,G) that was significantly different from that observed with DMSO ($107.6 \pm 3.3\%$,

$p < 0.05$, $n = 10$; Fig. 4A,B), but significantly lower (50%) than the f_R increase induced by ETO without bicuculline ($p < 0.05$; Fig. 4G). After removing the ETO, f_R returned to bicuculline values ($97.0 \pm 1.8\%$). In contrast, under bicuculline, 2 μM ETO failed to induce any increase in f_R ($107.6 \pm 1.1\%$, $p < 0.001$, $n = 9$; Fig. 4E,F,G).

f_R was dose-dependently decreased by application of muscimol (GABA_A receptor agonist; $\text{IC}_{50} = 0.14 \mu\text{M}$, $n = 28$; Fig. 4H). The decrease in f_R induced by muscimol (IC_{50}) was greater with ETO ($39.6 \pm 7.1\%$, $p < 0.001$, $n = 14$ and $36.7 \pm 7.0\%$, $p < 0.001$, $n = 14$ for 0.05 and 2 μM , respectively, Fig. 4K–O) than with DMSO ($66.6 \pm 11.0\%$, $p < 0.01$, $n = 9$; Fig. 4I,J,O). After return to normal-pH-aCSF, f_R returned to pre-muscimol values ($102.8 \pm 2.6\%$ for DMSO and $100.6 \pm 3.8\%$ and $112.0 \pm 4.0\%$ for 0.05 and 2 μM ETO, respectively).

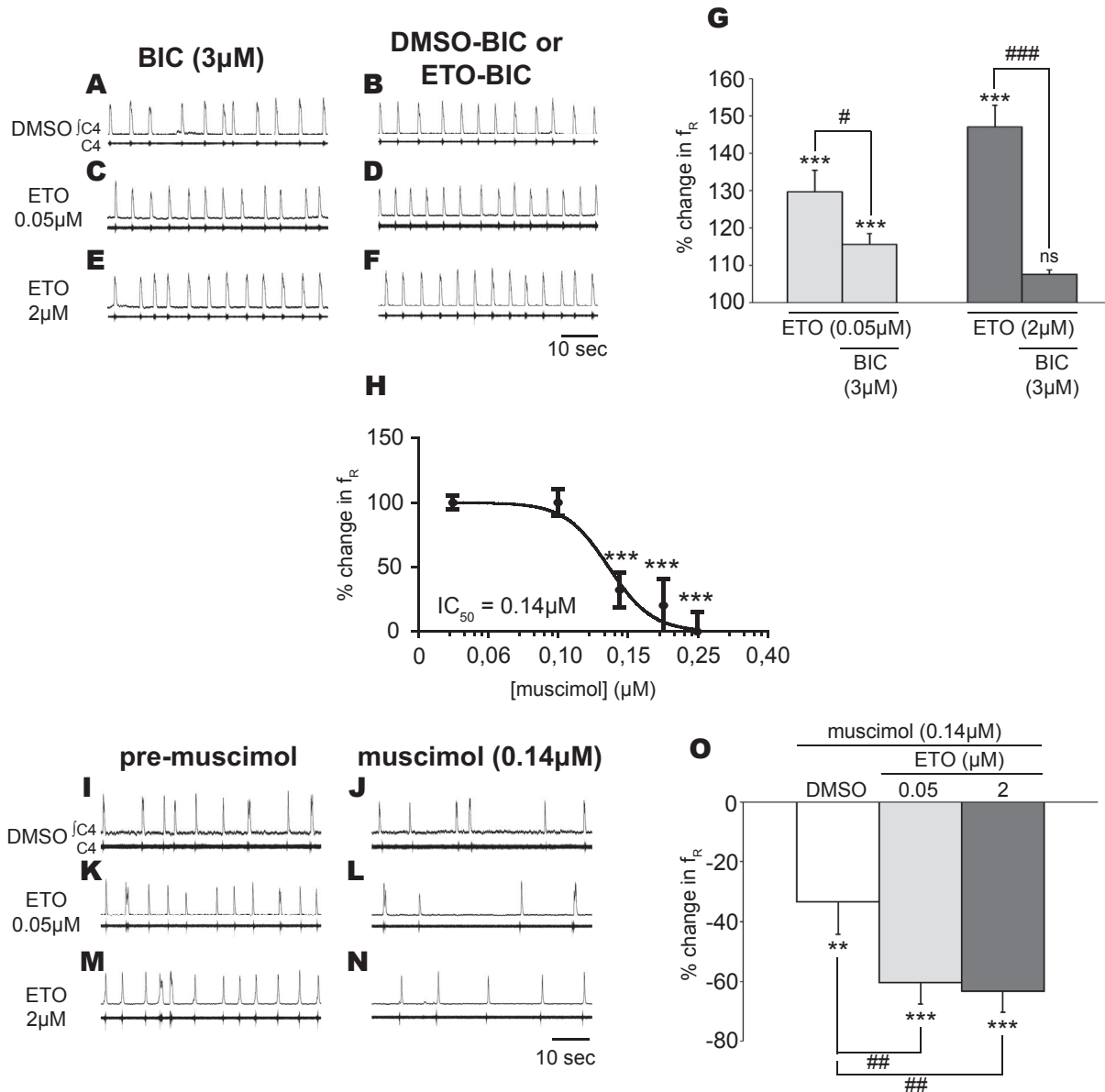


Fig. 4. ETO regulates the efficiency of GABA_A modulation of f_R . (A–F) Ventilatory C4 activity under bicuculline exposure over the last 5 min preceding (A, C and E) and during (B, D and F) DMSO or ETO exposure. (G) Histogram showing mean value of f_R during ETO exposure in the absence and in the presence of bicuculline. (H) Dose-response curve of changes in mean f_R in response to exposure to muscimol. (I–N) Traces illustrate the ventilatory C4 activity under DMSO and ETO exposure over the last 5 min before (I, K and M) and during (J, L and N) muscimol application. (O) Histogram showing mean value of f_R observed under muscimol and DMSO (white bar) or ETO (gray bars) application. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates a significant change in mean f_R compared to baseline or bicuculline or pre-muscimol values. # indicates a significant difference between ETO and ETO-BIC or DMSO exposures. ANOVA 2 way – Bonferroni post test. Integrated activity of the C4 ventral nerve root (J/C4); electrical activity of the C4 ventral nerve root (C4); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$; etonogestrel (ETO); bicuculline (BIC).

3.3.3. Interaction of ETO with the NMDA receptor

f_R was dose-dependently increased by NMDA ($EC_{50} = 9.28 \mu M$, $n = 20$; Fig. 5A). The optimal concentration of dizocilpine (MK-801, a NMDA receptor antagonist) was $2.5 \mu M$. At this concentration, f_R was not significantly altered ($103.3 \pm 6.1\%$) and the EC_{50} of NMDA did not modify f_R ($113.5 \pm 7.8\%$, $n = 5$). Under $2.5 \mu M$ MK-801, the increase in f_R induced by $0.05 \mu M$ ETO was no longer observed ($97.6 \pm 9.1\%$, $n = 4$; Fig. 5B–D), this was significantly different from that observed without MK-801 ($p < 0.01$, Fig. 5D).

Exposure to the EC_{50} of NMDA together with DMSO or ETO (0.05 and $2 \mu M$) significantly increased f_R ($130.4 \pm 12.2\%$, $p < 0.05$, $n = 10$; $153.3 \pm 8.8\%$, $p < 0.001$, $n = 11$; and $140.5 \pm 10.2\%$, $p < 0.01$, $n = 8$, respectively; Fig. 5E–K). The increase in f_R observed with $0.05 \mu M$ ETO was significantly greater ($p < 0.05$, Fig. 5K) than that observed with DMSO. After return to normal-pH-aCSF, f_R returned to pre-NMDA values for $2 \mu M$ ETO ($91.7 \pm 8.8\%$), but not for DMSO or $0.05 \mu M$ ETO ($80.2 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$; $60.8 \pm 7.5\%$, $p < 0.001$;

respectively).

3.3.4. Interaction of ETO with serotonergic systems

5-HT ($25 \mu M$) increased f_R ($146.8 \pm 16.4\%$, $p < 0.01$, $n = 5$; Fig. 6A–C). After exposure to $5 \mu M$ methysergide (a $5-HT_{1/2/7}$ receptor antagonist), mean f_R was not significantly modified by 5-HT ($90.7 \pm 22.8\%$, $n = 3$; Fig. 6C).

Under $5 \mu M$ methysergide, the increase in f_R induced by both 0.05 and $2 \mu M$ ETO was no longer observed ($97.3 \pm 2.8\%$, $n = 5$, and $92.3 \pm 3.2\%$, $n = 5$, respectively, $p < 0.001$; Fig. 6D).

3.3.5. Effect of ETO on the number of c-FOS-positive cells - identification of serotonergic and catecholaminergic features

$0.05 \mu M$ ETO induced an increase in the number of c-FOS-positive cells in the commissural and median parts of the NTS (c/mNTS; $+221 \pm 75\%$, $n = 12$; Table 1; Fig. 7A,E), but not in the ventrolateral part (vlNTS; $n = 12$; Table 1; Fig. 7A,E). Only a very

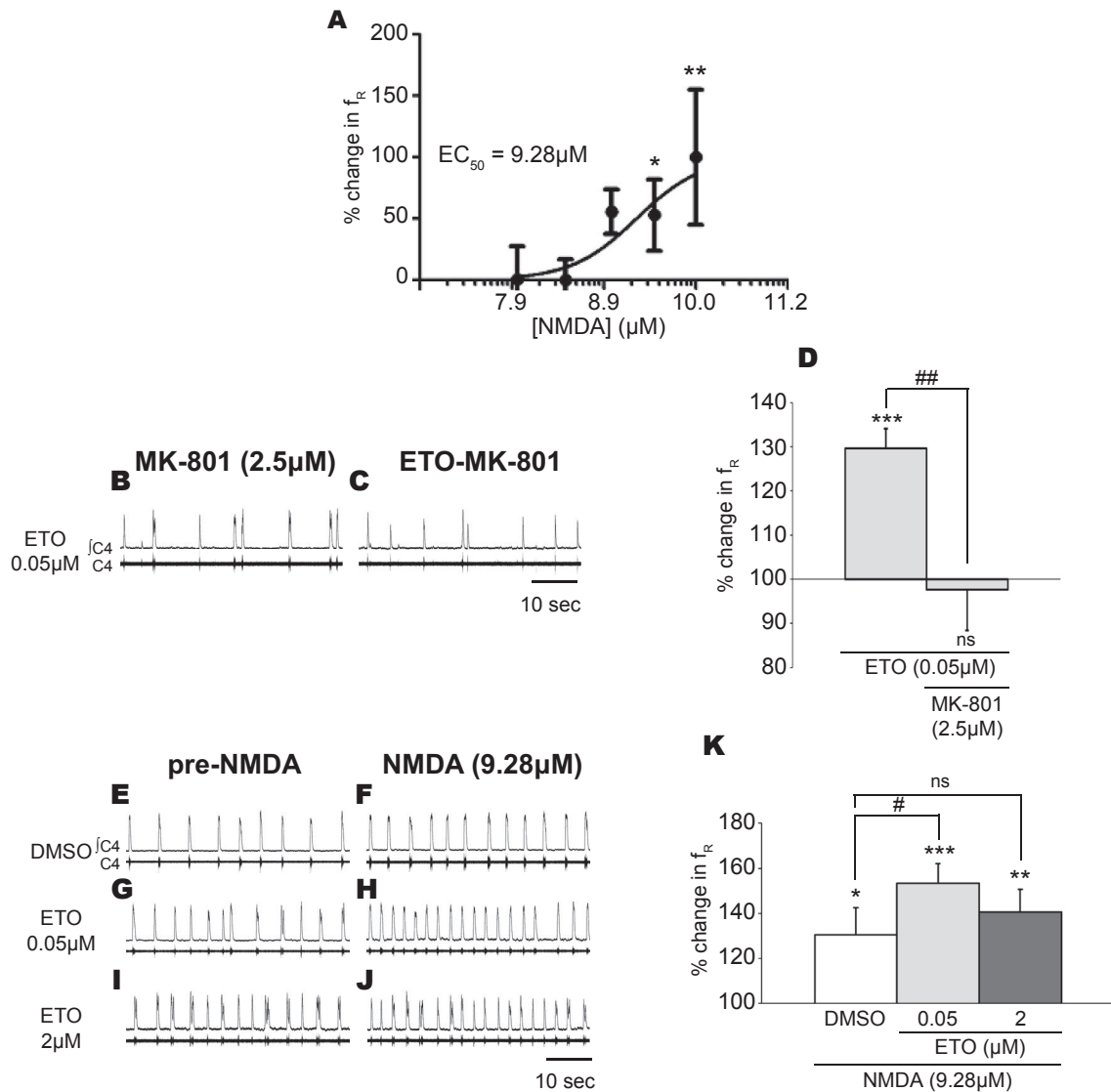


Fig. 5. ETO regulates the efficiency of NMDA modulation of f_R . (A) Dose-response curve of changes in mean f_R in response to exposure to NMDA receptor agonist NMDA. (B–C) Traces illustrate ventilatory C4 activity under MK-801 exposure over the last 5 min before (B) and during (C) ETO exposure. (D) Histogram showing mean value of f_R observed during ETO exposure in the absence and in the presence of MK-801. (E–J) Traces illustrate ventilatory C4 activity under DMSO and ETO exposure during the last 5 min before (E, G and I) and during (F, H and J) NMDA application. (K) Histogram showing mean value of f_R observed under NMDA and DMSO (white bar) or ETO (gray bars) application. All values are expressed as mean \pm SEM. * indicates a significant increase in mean f_R compared to baseline or pre-NMDA values. # indicates a significant difference between ETO and DMSO or ETO and ETO-MK 801 exposure. ANOVA 2way – Bonferroni post test. Integrated activity of C4 ventral nerve root (Jc4); electrical activity of C4 ventral nerve root (C4); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; etonogestrel (ETO).

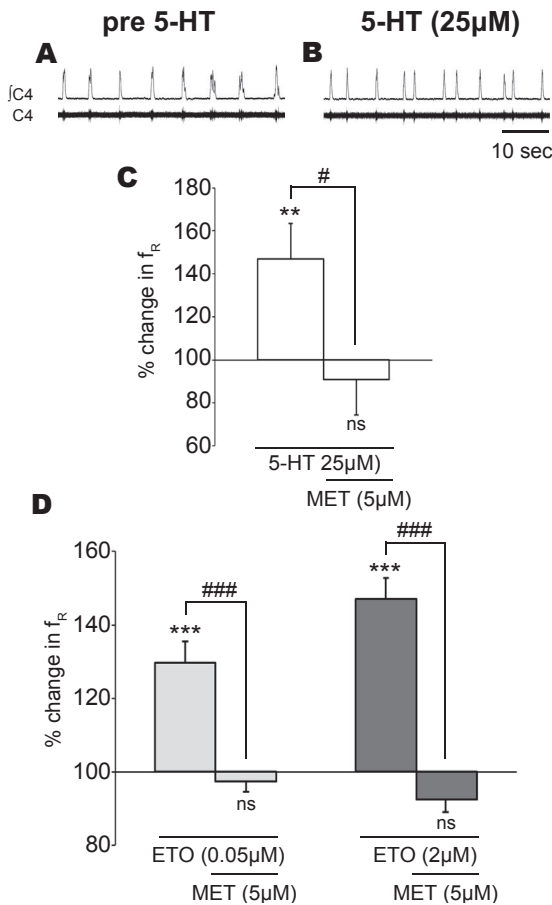


Fig. 6. Medullary serotonergic systems are involved in ETO ventilatory effect. (A–B) Traces illustrate ventilatory C4 activity over the last 5 min before (A) and during (B) the 5-HT exposure. (C) Histogram showing mean value of f_R observed under 5-HT exposure in the absence and in the presence of methysergide (5 μ M). (D) Histogram showing mean value of f_R during ETO exposure in the absence and in the presence of methysergide. All values are expressed as mean \pm SEM. * indicates a significant increase in mean f_R compared to pre-5-HT or baseline values. # indicates a significant difference between presence or absence of methysergide. Kruskal-Wallis – Dunn post test. Integrated activity of C4 ventral nerve root (f_{C4}); electrical activity of C4 ventral nerve root (C4); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$; etonogestrel (ETO); serotonin (5-HT); methysergide (MET).

small proportion of cells was also immunoreactive for TH ($3.5 \pm 2.5\%$; Fig. 8A–C). 2 μ M ETO did not induce any change in c-FOS-positive cells in any of the subdivisions of NTS analyzed ($n = 14$; Table 1; Fig. 7A,I).

Both concentrations of ETO induced a significant increase in c-FOS-positive cells in the VLM ($+181 \pm 55\%$ for 0.05 μ M and $+150 \pm 49\%$ for 2 μ M; Table 1; Fig. 7B,F,J) and a large proportion of these cells was also immunoreactive for TH ($42.3 \pm 13.5\%$ and $30.7 \pm 6.9\%$ at 0.05 and 2 μ M, respectively; Fig. 8D–F).

ETO induced a significant increase in c-fos expression in RPa (Table 1, Fig. 7D,H,L) and ROB (Table 1, Fig. 7C,G,K), but not in RMg (Table 1). This increase was more marked in the caudal part (from the pyramidal decussation to the rostral edge of the inferior olives) than in the rostral part (from the rostral edge of the inferior olives to the rostral edge of the facial nucleus) of the ROB ($208 \pm 34\%$ vs $1176 \pm 261\%$ and $344 \pm 83\%$ vs $+834 \pm 200\%$ for 0.05 and 2 μ M ETO, respectively; Table 1, Fig. 7C,G,K), but not in the RPa ($+59 \pm 18\%$ vs $+113 \pm 35\%$ and $+92 \pm 26$ vs $+74 \pm 20\%$ for 0.05 and 2 μ M ETO, respectively; Table 1, Fig. 7D,H,L). A large proportion of c-FOS-positive cells in the caudal parts of RPa and ROB was also immunoreactive for 5-HT ($38.4 \pm 5.2\%$ and $41.0 \pm 9.1\%$ at 0.05 μ M and

Table 1
c-fos expression in medullary structures of ex vivo preparations.

	DMSO	ETO	
	$n = 8$	0.05 μ M $n = 12$	2 μ M $n = 12$
c/mNTS	37.6 \pm 11.7	120.7 \pm 28.0*	28.1 \pm 6.8###
vINTS	6.7 \pm 2.6	4.5 \pm 0.8	3.8 \pm 1.0
VLM	90.3 \pm 21.1	253.5 \pm 49.5*	225.3 \pm 44.0*
cRPa	35.6 \pm 8.3	56.5 \pm 6.3	68.5 \pm 9.1*
rRPa	14.0 \pm 1.8	29.8 \pm 4.9*	24.3 \pm 2.8
cROb	43.9 \pm 16.6	135.1 \pm 14.9*	194.7 \pm 36.6***
rROB	3.8 \pm 1.7	48.5 \pm 9.9***	35.5 \pm 7.6**
RMg	9.4 \pm 1.7	11.8 \pm 2.8	9.2 \pm 2.3
XII	19.3 \pm 3.3	140.2 \pm 35.7**	96.6 \pm 19.8**
7N	134.0 \pm 7.6	181.1 \pm 10.8*	213.5 \pm 18.5**
RTN/pFRG	6.3 \pm 0.9	7.3 \pm 1.4	8.5 \pm 1.3
PP	8.8 \pm 2.8	10.5 \pm 1.7	13.5 \pm 2.5

Values are expressed as total number of c-FOS positive cells per structure \pm SEM. * indicates a significant increase in total number of c-FOS positive cells per structure compared to DMSO values. # indicates a significant difference between 0.05 and 2 μ M of ETO. Kruskal-Wallis – Dunn post test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$. Nucleus of the tractus solitarius, commissural and median parts (c/mNTS), ventrolateral part (vINTS); ventrolateral medullary reticular nucleus (VLM); pallidus raphe nucleus, caudal part (cRPa) and rostral part (rRPa); obscurus raphe nucleus, caudal part (cROB) and rostral part (rROB); magnus raphe nucleus (RMg); hypoglossal nucleus (XII); facial nucleus (7N); retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG); parapyramidal area (PP).

$43.6 \pm 6.8\%$ and $56.1 \pm 6.5\%$ at 2 μ M, Fig. 9A–F). In contrast, only a few cells in the rostral parts of RPa and ROB were also 5-HT-positive ($5.4 \pm 0.9\%$ and $23.6 \pm 3.8\%$ at 0.05 μ M and $9.7 \pm 3.8\%$ and $15.0 \pm 2.2\%$ at 2 μ M).

ETO exposure also induced a significant increase in c-fos expression in facial ($+35 \pm 8\%$ and $+59 \pm 14\%$ for 0.05 and 2 μ M ETO, respectively; Table 1) and hypoglossal ($+626 \pm 185\%$ and $+400 \pm 103\%$ for 0.05 and 2 μ M ETO, respectively; Table 1) nuclei.

On the ventral medullary surface, at the level of the RTN/pFRG and PP (cells located at the lateral edge of the pyramidal tract (Paxinos et al., 2007; Paxinos and Franklin, 2001)), c-fos expression was not modified by ETO exposure (Table 1).

4. Discussion

This study was conducted on the basis of clinical observations showing that exposure to a progestin of the gonane family increases f_R in CCHS patients and shows that such molecules can experimentally increase respiratory frequency in newborn mice *in vivo* and in isolated brainstem. Our data demonstrate medullary mechanisms, indicating that serotonergic neurons within the medullary raphe nuclei are involved.

4.1. DSG accelerates f_R and reduces PET_{CO_2} in CCHS patients

The first description of the ventilatory effects of DSG in CCHS patients (Straus et al., 2010) focused on chemosensitivity and recovery of a perceptual and ventilatory response to CO_2 , mostly because this finding constituted a major surprise. The first patient did not know at all that she was taking a potentially effective drug, but the second patient was aware of the observation made with the first patient and of the hypothesis concerning her own ventilatory response to hypercapnia. Since the observations were not part of a blinded study, but fortuitously observed in a clinical setting, the patients were aware of the drug withdrawal. The effects of DSG on baseline ventilation were not examined in detail. Review of the data collected dynamically (before, during and after

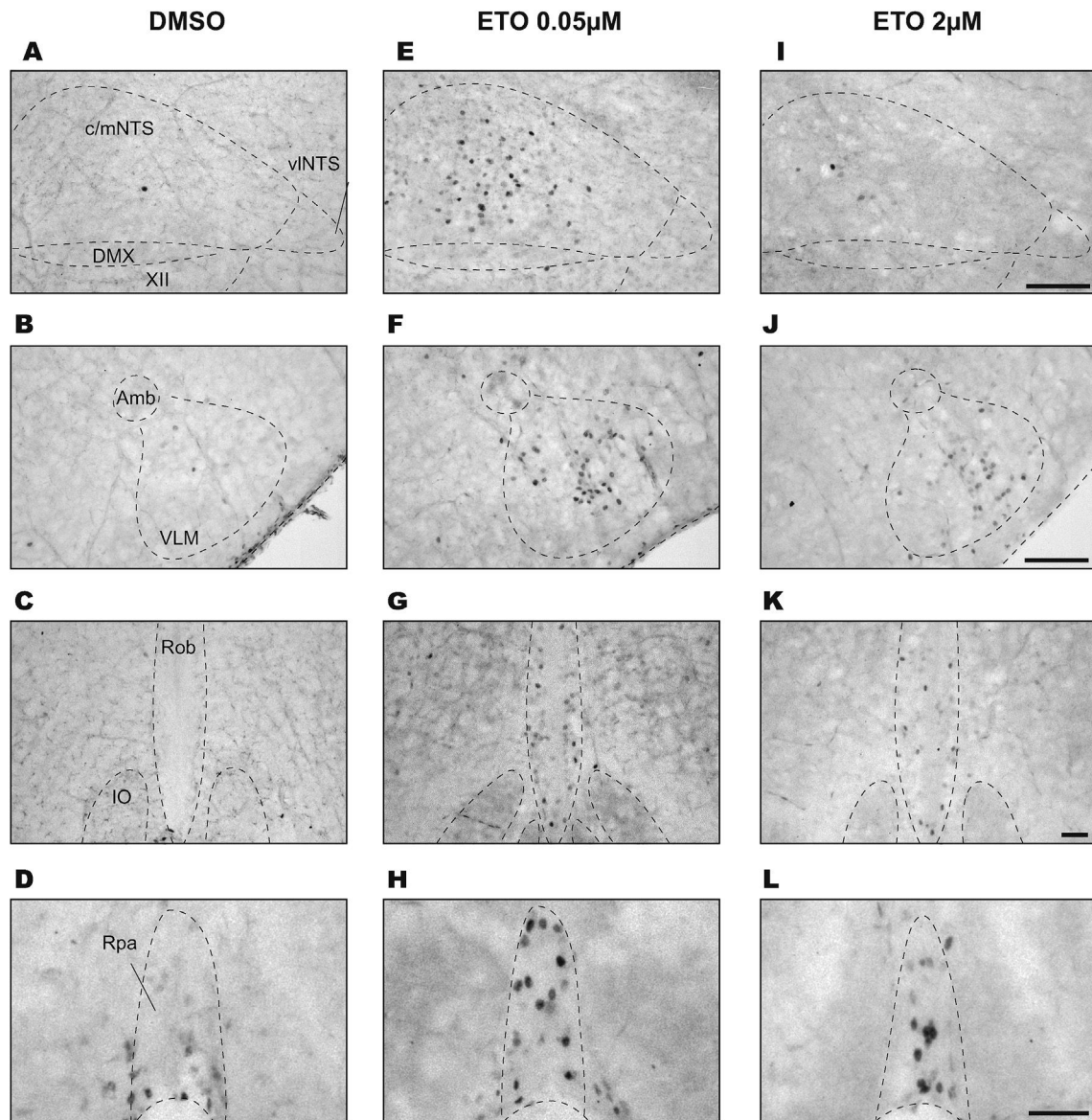


Fig. 7. ETO increased the *c-fos* expression in medullary respiratory areas. Photomicrographs illustrating the *c-FOS* immunoreactivity after DMSO (A–D) and ETO (E–L) exposure in the *c/mNTS* (A, E and I), the *VLM* (B, F and J), the *obscurus* (C, G and K) and *pallidus* (D, H and L) raphe nuclei. Scale bar = 100 μm . Nucleus of the tractus solitarius, commissural and median parts (*c/mNTS*) and ventrolateral part (*vINTS*); dorsal motor nucleus of vagus (*DMX*); hypoglossal nucleus (*XII*); ambiguus nucleus (*Amb*); ventrolateral medullary reticular nucleus (*VLM*); *obscurus* (*Rob*) and *pallidus* (*Rpa*) raphe nuclei; etonogestrel (ETO).

DSG exposure) from the same two patients showed that f_R was higher and PET_{CO_2} was lower in the presence of DSG compared to the absence of DSG (Fig. 1). This evidence is undoubtedly fragile (only two patients, retrospective analysis, absence of control of DSG administration due to the serendipitous nature of the observations). The present re-analysis suggests that the ventilatory effect of DSG could extend beyond chemosensitivity, as DSG may increase f_R and lower PET_{CO_2} during resting breathing in certain CCHS patients despite the defective respiratory rhythmogenesis characteristic of this disease. Because progesterone and pregnane progestins increase f_R in healthy humans (Behan et al., 2003; Jensen et al., 2008; Skatrud et al., 1978), but not in CCHS patients (Sritippayawan et al., 2002), our observations suggest that DSG and more generally gonane progestins could interfere with breathing control via distinct mechanisms from those involved in the action of pregnanes.

4.2. ETO, the metabolite of DSG, increased the f_R on in vivo newborn mice

In vivo, considering the bioavailability of the DSG, the administration of 10^{-3} mg/kg of ETO is the nearest concentration of the human exposure (Timmer et al., 1999). At this concentration, in newborn mice ETO induced an increase of baseline f_R compared to control (Fig. 2). Although the developmental stage was different, this increase is similar to what we observed in adult CCHS patients (Fig. 1).

4.3. ETO, the metabolite of DSG, enhances f_R via medullary mechanisms

On *ex vivo* preparations containing only the medullary regions of the brainstem, acute exposure to ETO induced a dose-

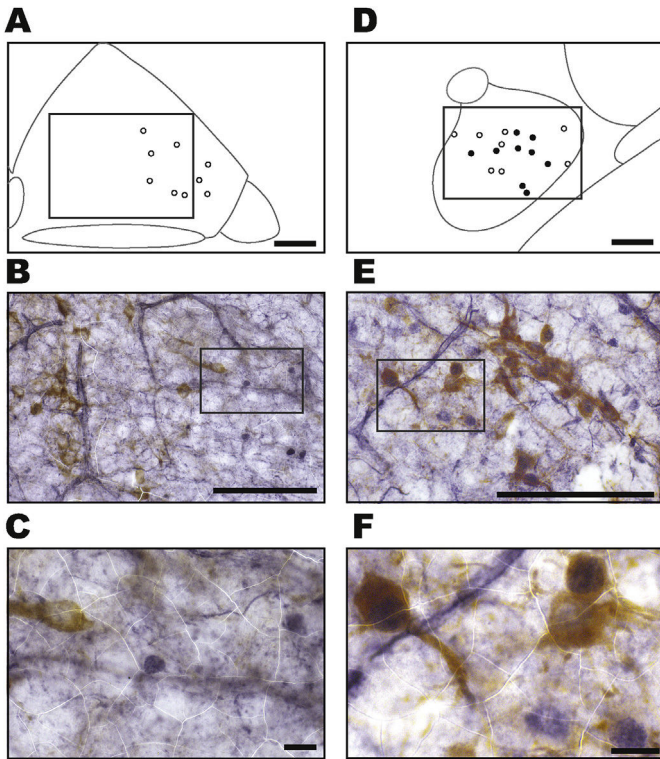


Fig. 8. Catecholaminergic character of c-FOS-positive cells under ETO. (A and D) Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS alone and for both c-FOS and TH in the c/mNTS (A) and VLM (D) after ETO exposure (0.05 μ M); Scale bar = 100 μ m; white and black point represent respectively c-FOS-positive neurons and c-FOS-positive neurons also immunoreactive for TH. (B and E) Photomicrographs of sections double-immunolabelled for c-FOS and TH in c/mNTS (B) and VLM (E); Scale bar = 100 μ m; (C and F) Photomicrographs representing an enlargement of B and E; Scale bar = 10 μ m. Nucleus of the tractus solitarius, caudal and median parts (c/mNTS); ventrolateral medullary reticular nucleus (VLM); tyrosine hydroxylase (TH); ETO (etonogestrel).

dependent increase in f_R (Fig. 3) with no change in IntC4. This finding resembles our observations in CCHS patients (increased f_R with no V_T changes). The f_R increase in CCHS patients receiving DSG and in *in vivo* newborn mice receiving 10^{-3} mg/kg of ETO (Figs. 1 and 2) may therefore be mediated by medullary mechanisms.

c-FOS labeling revealed increased cellular activity in the VLM, with 30–40% of c-FOS-positive catecholaminergic cells (Fig. 8), suggesting that catecholaminergic cells are involved in the ETO effects. Numerous data have implicated the A1C1 catecholaminergic cell group in the control of breathing (Erickson and Millhorn, 1994; Johnson et al., 2005; Viemari, 2008). However, at least 60% of VLM c-FOS-positive cells are not catecholaminergic. Of note, the preBotC, one of the two medullary respiratory oscillators (Feldman et al., 2013; Smith et al., 1991), is located in the VLM and does not contain catecholaminergic cells (Wang et al., 2001). Therefore, part of the non-catecholaminergic c-FOS-positive cells could be neurons of the preBotC. Further experiments are needed to confirm this hypothesis. As we did not observe any change in the number of c-FOS-positive cells in the RTN/pFRG, the second medullary respiratory oscillator (Feldman et al., 2013; Onimaru and Homma, 2003), is unlikely to be involved in the progestin effect. Of note, this structure is missing in transgenic mice harboring the same *Phox2b* mutation as CCHS patients (Dubreuil et al., 2008) and is therefore also probably missing in CCHS patients. Nevertheless, their baseline ventilation increased with DSG, which is consistent with the absence of involvement of the RTN/pFRG in the effects of ETO.

4.4. ETO regulates the efficiency of GABA_A- and NMDA-mediated modulation of f_R

Under conditions of bicuculline-induced GABA_A receptor blockade, ETO facilitation was diminished or abolished (Fig. 4). This result suggests that part of the ETO effect on f_R depends on an interaction with GABA_A receptors, which would be consistent with data of literature reporting that steroids, including progesterone and progestins, interact with GABA_A (Belelli and Lambert, 2005; Park-Chung et al., 1999). Steroids are known to be either negative, positive or both allosteric modulators of GABA_A (Park-Chung et al., 1999; Ren and Greer, 2006). No data are available concerning the interaction of ETO with GABA_A. Our experiments show that the decrease in f_R induced by the GABA_A agonist muscimol was markedly enhanced by ETO exposure, suggesting that ETO exerts a positive modulation of GABA_A. Two elements support this hypothesis. First, testosterone, from which ETO is derived, is a positive modulator of GABA_A (Park-Chung et al., 1999). Second, steroids that are negative modulators of GABA_A are characterized by a negative charge at C-3 (Park-Chung et al., 1999). This is not the case of ETO that displays a keto-group at this site (Grandi et al., 2014). It is possible that part of the ventilatory effect of ETO depends on positive modulation of GABA_A receptors that contribute to CVD. The differential effects of bicuculline on the ventilatory action of ETO (total or partial blockade) may be due to an ETO concentration-dependent effect on several types of GABA_A receptors, as it has been shown that for some neurosteroids the GABA_A-evoked responses mediated by receptors containing $\alpha_{1/3}$ subunits are enhanced by relatively low steroid concentrations. In contrast, equivalent receptors that incorporate $\alpha_{2/4/5/6}$ subunits require higher steroid concentrations (Belelli and Lambert, 2005). According to this hypothesis, differences in the effects of bicuculline on the ventilatory action of ETO may be due to a global efficiency of various types of GABA_A receptors, particularly $\alpha_{1/3}$ GABA_A or $\alpha_{2/4}$ GABA_A that have been either located in medullary respiratory areas or shown to play a role in CVD (Liu and Wong-Riley, 2006; Loria et al., 2013).

Bicuculline-induced GABA_A receptor blockade did not completely abolish the facilitation induced by low ETO concentration (Fig. 4). We therefore hypothesized that other receptors were involved. We focused on NMDA receptors because they are both involved in CVD and are modulated by steroids (Funk et al., 1997; Greer et al., 1991; Korinek et al., 2011). Our experiments showed that NMDA blockade totally abolished the facilitatory influence of ETO on f_R (Fig. 5), suggesting that either ETO modulates NMDA regulation of f_R , or that all pathways by which ETO increased f_R require functional glutamate/NMDA neurotransmission, or both. Our results showing that ETO potentiated the NMDA-induced increase in f_R only at low progestin concentrations support the hypothesis of modulation of NMDA regulation of f_R by ETO. c-FOS labeling suggested that ETO modulation of f_R regulation by NMDA depends on the c/mNTS, which was the only area displaying an increase in c-FOS-positive cells, at low but not at high ETO concentrations. This hypothesis is supported by data indicating that NMDA receptors are present on c/mNTS neurons (Lin et al., 2008) and that the excitatory response of NTS neurons to application of NMDA is modulated by steroids (Xue and Hay, 2003). As the c-FOS-positive neurons of the c/mNTS were not catecholaminergic, ETO is likely to influence another cell population.

4.5. ETO increases f_R via a pathway involving medullary serotonergic systems

Because blockade of serotonergic regulation of f_R abolished the facilitatory effect of ETO, we hypothesized that this effect

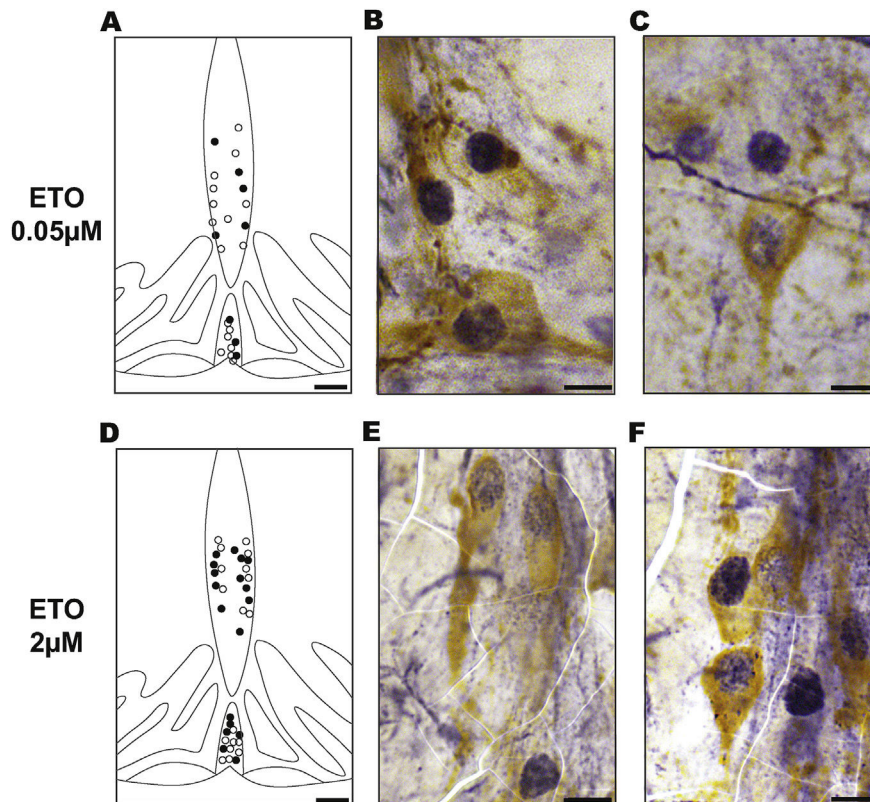


Fig. 9. Serotonergic character of c-FOS-positive cells under ETO. (A and D) Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS alone and for both c-FOS and 5-HT in the pallidus and obscure raphe nuclei; Scale bar = 100 μ m; white and black points represent respectively c-FOS-positive neurons and c-FOS-positive neurons also immunoreactive for 5-HT. Photomicrographs of sections double-immunolabelled for c-FOS and 5-HT in the pallidus (B and E) and obscure (C and F) raphe nuclei after 0.05 μ M (B and C) or 2 μ M (E and F) ETO; Scale bar = 10 μ m; etonogestrel (ETO); serotonin (5-HT).

involved serotonergic signaling, which is in line with published data showing that serotonergic neurons are involved in the facilitatory influence of progesterone (Behan et al., 2003; Farmer et al., 1996). The effect of steroids on the release of 5-HT depends on supramedullary regions, such as pons (Robichaud and Debonnel, 2004) or hypothalamus (Farmer et al., 1996). Our experiments suggest that ETO interfered with serotonergic systems via a direct medullary action, revealing a new pathway of interaction between progesterone and serotonergic systems. More specifically, our c-FOS data suggest that ETO exerted its facilitatory action by activating serotonergic neurons located in the caudal parts of RPa and ROB, two areas known to be implicated in ventilatory control (Cao et al., 2006; Cerpa et al., 2015; Depuy et al., 2011). This progestin-serotonin interaction affecting modulation of CVD would be specific to the gonane family. This putative pathway forms a relevant basis for dedicated investigations designed to elaborate personalized approaches to treat CCHS patients with gonane progestins. Otherwise, serotonergic and non serotonergic neurons of the medullary raphe nuclei and particularly those of the rRPa are involved in the processes of thermogenesis and heat conservation (McGlashon et al., 2015; Nakamura and Morrison, 2007). Thus, *in vivo*, it is quite conceivable that these neurons stimulated by ETO could increase the CVD not only by a direct action on the central respiratory pattern generators but also indirectly by inducing an hyperthermia.

5. Conclusion

To conclude, DSG has been associated with chemosensitivity recovery in CCHS patients (Straus et al., 2010). Its metabolite, ETO,

has been shown to enhance chemosensitivity in newborn rats via supramedullary mechanisms (Loiseau et al., 2014). Combined with the present data, these observations suggest that two distinct pathways are involved in the ventilatory effects of these gonane progestins. The medullary pathway described here could be relevant to resting breathing CVD, whereas the supramedullary pathway previously described could be relevant to chemosensitivity. Medullary and supramedullary mechanisms could coexist in CCHS. Their effect on resting breathing are particularly pertinent to the issue of ventilatory support. The present animal data, indicating a medullary serotonergic determinant of the stimulant effect of ETO, provide a rationale for clinical trials combining DSG and serotonergic drugs to improve ventilation in CCHS patients.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

F Joubert was supported by the “Fonds de dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire 2012”. E Verkaeren was supported by the “Fonds de dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire 2014”. The present work was supported by a grant from the “Association Française pour le Syndrome d’Ondine”, by a “Legs Poix” grant from the “Chancellerie de l’Université de Paris”, by a grant from the French National Agency for Research (ProgestVentil; ANR-15-CE17) and by the French government - Institut Hospitalo-Universitaire - A - Institut du cerveau et de la Moelle épinière

(IHU-A-ICM) "Investissement d'avenir" ANR-10-IAIHU-06 program. We thank Anthony Saul for the English style.

References

- 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., 2003. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat. Genet.* 33, 459–461.
- Bartlett Jr., D., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384–395.
- Bayliss, D.A., Cidlowski, J.A., Millhorn, D.E., 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.
- Behan, M., Zabka, A.G., Thomas, C.F., Mitchell, G.S., 2003. Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 136, 249–263.
- Belelli, D., Lambert, J.J., 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565–575.
- 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, M.S., Patwari, P.P., Weese-Mayer, D.E., 2010. Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *J. Appl. Physiol.* 108, 979–988.
- Cerpa, V.J., Aylwin, M.L., Beltran-Castillo, S., Bravo, E.U., Llona, I.R., Richerson, G.B., Eugenin, J.L., 2015. Prenatal-perinatal nicotine alters neonatal raphe neurons: meaning for sudden infant death syndrome. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Depuy, S.D., Kanbar, R., Coates, M.B., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G., 2011. Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J. Neurosci.* 31, 1981–1990.
- Dubreuil, V., Ramanantsoa, N., Trochet, D., Vaubourg, V., Amiel, J., Gallego, J., Brunet, J.F., Goridis, C., 2008. A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1067–1072.
- Erickson, J.T., Millhorn, D.E., 1994. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J. Comp. Neurol.* 348, 161–182.
- Farmer, C.J., Isakson, T.R., Coy, D.J., Renner, K.J., 1996. 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.* 711, 84–92.
- Feldman, J.L., Del Negro, C.A., Gray, P.A., 2013. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 423–452.
- Funk, G.D., Johnson, S.M., Smith, J.C., Dong, X.W., Lai, J., Feldman, J.L., 1997. Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. *J. Neurophysiol.* 78, 1414–1420.
- Garcia-Pelaez, B., Vila, R., Remesar, X., 2007. The administration of oleoyl-estrone to lactating dams induces selective changes in the normal growth pattern of their pups. *Horm. Metab. Res.* 39, 582–588.
- Gordon, C., 1993. Metabolism. In: *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*, pp. 47–72.
- Grandi, G., Cagnacci, A., Volpe, A., 2014. Pharmacokinetic evaluation of desogestrel as a female contraceptive. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 10, 1–10.
- Greer, J.J., Smith, J.C., Feldman, J.L., 1991. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol.* 437, 727–749.
- Harper, R.M., Kumar, R., Macey, P.M., Woo, M.A., Ogren, J.A., 2014. Affective brain areas and sleep-disordered breathing. *Prog. Brain Res.* 209, 275–293.
- Hilaire, G., Duron, B., 1999. Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol. Rev.* 79, 325–360.
- Jensen, D., Duffin, J., Lam, Y.M., Webb, K.A., Simpson, J.A., Davies, G.A., Wolfe, L.A., O'Donnell, D.E., 2008. Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 161, 76–86.
- Johnson, P.L., Hollis, J.H., Moratalla, R., Lightman, S.L., Lowry, C.A., 2005. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J. Psychopharmacol.* 19, 327–341.
- Joubert, F., Straus, C., Similowski, T., Bodineau, L., 2014. Effect of an acute exposure to etonogestrel, a progestin, on the central respiratory drive in mouse. *Invol. Medullary Areas* 12.
- Korinek, M., Kapras, V., Vyklicky, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vales, K., Stuchlik, A., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky Jr., L., 2011. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* 76, 1409–1418.
- Li, D., Chin, C., Kato, R., Ward, S., Keens, T.G., 2013. Does Desogestrel Improve Ventilatory Control in Congenital Central Hypoventilation Syndrome?, p. A5194.
- Lin, L.H., Taktakishvili, O.M., Talman, W.T., 2008. Colocalization of neurokinin-1, N-methyl-D-aspartate, and AMPA receptors on neurons of the rat nucleus tractus solitarius. *Neuroscience* 154, 690–700.
- Liu, Q., Wong-Riley, M.T., 2006. Developmental changes in the expression of GABA receptor subunits alpha1, alpha2, and alpha3 in brain stem nuclei of rats. *Brain Res.* 1098, 129–138.
- 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. *Neurosci. Lett.* 567, 63–67.
- Loria, C.J., Stevens, A.M., Crummy, E., Casadesus, G., Jacono, F.J., Dick, T.E., Siegel, R.E., 2013. Respiratory and behavioral dysfunction following loss of the GABAA receptor alpha4 subunit. *Brain Behav.* 3, 104–113.
- McGlashan, J.M., Gorecki, M.C., Kozlowski, A.E., Thirnbeck, C.K., Markan, K.R., Leslie, K.L., Kotas, M.E., Potthoff, M.J., Richerson, G.B., Gillum, M.P., 2015. Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. *Cell Metab.* 21, 692–705.
- Nakamura, K., Morrison, S.F., 2007. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R127–R136.
- Onimaru, H., Homma, I., 2003. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J. Neurosci.* 23, 1478–1486.
- 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.
- Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R.H., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 1999. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res.* 830, 72–87.
- Pascual, O., Morin-Surun, M.P., Barna, B., avit-Saubie, M., Pequignot, J.M., Champagnat, J., 2002. Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J. Physiol.* 544, 511–520.
- Paxinos, G., Franklin, K.B., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Paxinos, G., Halliday, G., Watson, C., Koutcherov, Y., Wang, H., 2007. *Atlas of the Developing Mouse Brain*. Academic Press.
- Perrin-Terrin, A.S., Joubert, F., Fiamma, M.N., Cardot, P., Frugiere, A., Straus, C., Bodineau, L., 2015. Facilitation of the respiratory rhythm in mice by acute exposure to a progestin, the Etonogestrel. *Invol. Medullary Areas* 81–82.
- Ramanantsoa, N., Gallego, J., 2013. Congenital central hypoventilation syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189, 272–279.
- Ren, J., Greer, J.J., 2006. Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J. Neurosci.* 26, 3721–3730.
- Robichaud, M., Debonnel, G., 2004. Modulation of the firing activity of female dorsal raphe nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids. *J. Endocrinol.* 182, 11–21.
- Schumacher, M., Guennoun, R., Ghoumari, A., Massaad, C., Robert, F., El-Etr, M., Akwa, Y., Rajkowski, K., Baulieu, E.E., 2007. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr. Rev.* 28, 387–439.
- Sitruk-Ware, R., 2008. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 61, 151–157.
- Skatrud, J.B., Dempsey, J.A., Kaiser, D.G., 1978. Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 44, 939–944.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., Feldman, J.L., 1991. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726–729.
- Sritippayawan, S., Hamutcu, R., Kun, S.S., Ner, Z., Ponce, M., Keens, T.G., 2002. Mother-daughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 367–369.
- Straus, C., Trang, H., Becquemin, M.H., Touraine, P., Similowski, T., 2010. Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 171, 171–174.
- Timmer, C.J., Srivastava, N., Dieben, T.O., Cohen, A.F., 1999. Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: cerazette and Liseta. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 24, 335–343.
- Trang, H., Dehan, M., Beauflis, F., Zaccaria, I., Amiel, J., Gaultier, C., 2005. The French congenital central hypoventilation syndrome registry: general data, phenotype, and genotype. *Chest* 127, 72–79.
- Viemari, J.C., 2008. Noradrenergic modulation of the respiratory neural network. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 123–130.
- 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., Mc Kay, L.C., 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* 194, 95–111.
- Wang, H., Stornetta, R.L., Rosin, D.L., Guyenet, P.G., 2001. Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 128–146.
- Weese-Mayer, D.E., Berry-Kravis, E.M., Ceccherini, I., Keens, T.G., Loghmanee, D.A., Trang, H., 2010. An official ATS clinical policy statement: congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 626–644.
- Xue, B., Hay, M., 2003. 17beta-estradiol inhibits excitatory amino acid-induced activity of neurons of the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 976, 41–52.

II. Article publié : *Current perspectives for the use of gonane progesteronergic drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes*

Certains travaux de la partie 1 des résultats généraux ont donné lieu à :

- 1 revue publiée en 2017 dans *Current Neuropharmacology*

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

Loiseau C, Cayetanot F, Joubert F, **Perrin-Terrin AS**, Cardot P, Fiamma MN, Frugière A, Straus C, Bodineau L

Current Neuropharmacology, 2017, doi: 10.2174/1570159X15666170719104605

1. Résumé

Utilisation des progestatifs de la famille des gonanes pour le traitement des syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale

– Revue de la littérature et perspectives –

Objectif

Mise en exergue de l'intérêt des recherches portant sur l'utilisation des progestatifs de la famille des gonanes ainsi que des mécanismes d'action associés pouvant permettre le traitement de patients atteints de syndromes d'hypoventilation centrale (CHS).

Contexte scientifique

Les CHS sont des maladies neuro-respiratoires résultant d'un trouble neurologique congénital ou acquis affectant la commande centrale respiratoire (CCR) et conduisant *in fine* à une hypoventilation. Ils regroupent différentes pathologies comme le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS pour Congenital Central Hypoventilation Syndrome). L'hypercapnie, l'acidose et l'hypoxémie causées par l'hypoventilation ont des incidences sur les fonctions physiologiques et peuvent engager le pronostic vital. En raison de l'absence de traitement pharmacologique disponible, les patients atteints de CHS ont besoin d'une assistance ventilatoire mécanique à vie, au moins pendant le sommeil. Cependant, de récentes observations cliniques suggèrent qu'une famille spécifique de progestatifs, les gonanes, aurait un effet bénéfique chez certains patients CCHS. Ces observations incitent à la mise en œuvre de travaux expérimentaux afin de dégager de nouvelles pistes thérapeutiques visant à instaurer un traitement pharmacologique symptomatique. Nous avons donc réalisé une revue de la littérature afin de rendre compte des perspectives offertes par les gonanes dans le traitement des CHS. L'objet de cette revue de littérature a d'abord consisté à présenter le mode d'action de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs synthétiques sur le système nerveux central (SNC), puis à réunir les données existantes concernant l'action des médicaments progestéronergiques sur la CCR.

Revue de littérature

1. Effets de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs de synthèse sur le SNC

- Effets génomiques

L'action génomique de la progestérone, de ses dérivés et des progestatifs de synthèse est médiée par les récepteurs nucléaires à la progestérone (nPRs). Le complexe ligand-récepteur formé dans le cytoplasme se dimérise avant d'être transloqué dans le noyau où il va alors interagir avec les séquences PRE (pour Progesterone Responsive Element) des gènes dont il va réguler la transcription (Leonhardt et al., 2003, Brinton et al., 2008). Les nPRs sont présents au niveau de différentes régions du tronc cérébral impliquées dans le contrôle central de la respiration (Lauber et al., 1991, Kato et al., 1994, Haywood et al., 1999, Kastrup et al., 1999, Guerra-Araiza et al., 2001, Behan & Thomas, 2005, Helena et al., 2009, Furuta et al., 2010). Cependant, il ne s'agit pas des seuls récepteurs nucléaires pouvant interagir avec la progestérone, ses dérivés ou avec les progestatifs de synthèse. Les récepteurs nucléaires appartenant à d'autres stéroïdes actifs ou neurostéroïdes sont également concernés, comme les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes (Schindler et al., 2003).

- Effets non génomiques

Il est aussi admis que la progestérone, ses dérivés et par extension les progestatifs exercent des effets non-génomiques (Blackmore et al., 1991, Liu & Patino, 1993, Filardo et al., 2000). Cette action dépend de diverses familles de récepteurs membranaires à la progestérone, notamment les récepteurs membranaires à la progestérone couplés aux protéines G (mPRs), 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). D'autres part, ces molécules peuvent agir via des récepteurs membranaires spécifiques à d'autres messagers chimiques i.e. le récepteur GABA_A, le récepteur NMDA, le récepteur à la glycine, le récepteur nicotinique à l'acétylcholine, le récepteur sérotoninergique 5-HT₃ et le récepteur à l'ocytocine (Wu et al., 1990, Wu et al., 1991, Bertrand 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). Ces récepteurs sont tous localisés au sein de différentes structures du tronc cérébral et du diencephale impliquées dans l'élaboration de la CCR ou dans sa régulation (Deutch et al., 1987, Conti et al., 1997, Bloom & Morales, 1998, Bleakman, 1999, Alonso et al., 2000, Kitaichi et al., 2000, Mellon & Griffin, 2002, Loftis & Janowsky, 2003, Lynch, 2004, Maurice, 2004, Betz & Laube, 2006, Nashmi & Lester, 2006, Webb & Lynch, 2007, Low & Wee, 2010, Intlekofer & Petersen, 2011, Jin & Smith, 2011, Tan et al., 2012, Pang et al., 2013, Boukari et al., 2015, Grinevich et al., 2016, Dumais & Veenema, 2016). Cependant, les mécanismes d'action par lesquels ces molécules agissent sur ces récepteurs demeurent pour la plupart à élucider. On sait par exemple que certains stéroïdes exercent une modulation allostérique sur le récepteur GABA_A qui se traduit par une modification du temps d'ouverture du canal. En fonction de certaines caractéristiques structurales, les stéroïdes sont des modulateurs allostériques positifs ou négatifs, en ce sens

qu'ils accentuent ou diminuent l'effet de GABA sur GABA_A (Harrison & Simmonds, 1984, Lambert et al., 1995, Park-Chung et al., 1999, Lambert et al., 2001, Belelli et al., 2002).

2. Action facilitatrice de la progestérone sur la CCR en situation non-pathologique

- Recueil de données

Au vu de l'état actuel des connaissances, comme nous l'avons développé dans l'introduction de ce manuscrit, il apparaît qu'un effet facilitateur serait exercé par la progestérone, certains de ses dérivés et différents progestatifs sur la CCR en normocapnie. Dès 1900, Hasselbach et collaborateurs sont les premiers auteurs à avoir suggéré l'existence d'un rôle facilitateur de la progestérone sur la ventilation en observant une diminution de la PCO₂ au cours de la grossesse, une situation physiologique caractérisée entre autres par des taux de progestérone plasmatique particulièrement élevés (Hasselbach, 1912, Hasselbach & Gammeltoft, 1915). Ces observations furent par la suite confirmées avec la mise en évidence d'une ventilation plus élevée et d'une PCO₂ plus basse chez la femme pendant la phase lutéale en comparaison des valeurs observées pendant la phase folliculaire (Griffith et al., 1929, Griffiths & Lovick, 2005, Slatkowska et al., 2006, Luthi *et al.*, 2008, Preston *et al.*, 2009, Macnutt et al., 2012). Par ailleurs, l'administration de progestatifs synthétiques à des hommes sains avait également causé une augmentation de ventilation et une baisse de PaCO₂ (Zwillich et al., 1978, Skatrud et al., 1978b, Mikami *et al.*, 1989). Dans un contexte de challenge hypoxique ou hypercapnique, les données rencontrées étaient parfois contradictoires même si l'influence de ces molécules a également été soulignée. En effet, bien qu'une réponse augmentée à l'hypoxie ait été observée durant la phase lutéale chez la femme, aucune différence n'avait été observée en réponse à l'hypercapnie à différents stades du cycle menstruel. Cependant, une augmentation du chémoréflexe au CO₂ avait été observée chez la femme enceinte soumise à un mélange gazeux hyperoxique et enrichi en CO₂. Aussi, les taux plasmatiques de progestérone étaient corrélés positivement à une augmentation de la chémosensibilité au CO₂ (Jensen et al., 2005).

- Mécanismes d'action

D'un point de vue mécanistique, de nombreuses 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 et/ou du diencéphale. De façon plus spécifique, le NTS et l'hypothalamus caudal ont été mis en évidence comme des régions encéphaliques jouant un rôle déterminant sur l'effet ventilatoire de la progestérone (Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990). Cet effet ventilatoire facilitateur de la progestérone dépend d'action génomique ou non génomique car il a pu être supprimé par l'application d'antagoniste des nPRs ou en diminuant la traduction des ARNm codants les mPRs (Bayliss et al., 1987, Bayliss et al., 1990, Pascual et al., 2002, Boukari et al., 2015, Boukari et al., 2016). Par ailleurs, il semblait qu'au moins une

partie de l'action facilitatrice de la progestérone était due à une régulation des systèmes sérotoninergiques (Behan et al., 2003).

3. Les gonanes amélioreraient la ventilation chez les patients CCHS

- Données humaines

Le CCHS est caractérisé par la perte de la chémosensibilité au CO_2/H^+ . C'est une pathologie à transmission autosomique dominante, causée par une mutation du gène *PHOX2B* (Amiel et al., 2003, Weese-Mayer et al., 2005, Amiel et al., 2009). Chez deux patientes atteintes de CCHS, l'utilisation d'un contraceptif, le désogestrel, a révélé une restauration de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Straus et al., 2010). Cette découverte fortuite est la première à suggérer l'existence d'un lien entre un traitement contraceptif et l'amélioration des troubles ventilatoires observés lors de CCHS. En effet, tous les autres stimulants respiratoires analysés, et en particulier la médroxyprogestérone, n'avaient pas montré d'amélioration de la ventilation chez les patients CCHS (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, Weese-Mayer et al., 2010). Cependant ce résultat fortuit a été nuancé puisqu'une autre patiente souffrant de CCHS traitée avec du désogestrel, ne présentait pas de récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ (Li et al., 2013a). Ces résultats contradictoires mettent en exergue la complexité du mode d'action des gonanes sur la CCR. Ainsi l'action des gonanes pourrait être intrinsèquement liée à de nombreux facteurs e.g. la diversité des récepteurs impliqués, les variations inter-individuelles entre les patients CCHS comme le sexe, l'âge, la diversité des mutations du gène *PHOX2B* responsable de la différence observée dans l'intégrité des structures encéphaliques et des populations neuronales impliquées dans la CCR.

- Données animales

A la suite de ces observations cliniques, l'hypothèse formulée au sein de notre unité de recherche était que le désogestrel et par extension son métabolite actif, l'étonogestrel (ETO), activerait ou sur-activerait des structures centrales impliquées dans la chémosensibilité au CO_2/H^+ . Dans la mesure où cet effet a pu être observé chez deux patientes atteintes de CCHS pour lesquelles les neurones *PHOX2B*-positifs du RTN/pFRG n'étaient pas fonctionnels selon l'hypothèse communément admise aujourd'hui, l'effet du désogestrel ne dépendrait donc pas de ces neurones mais d'autres populations neuronales. Ainsi, une analyse approfondie de l'effet du désogestrel et de son métabolite actif l'ETO a été menée en normocapnie et en hypercapnie au sein du laboratoire (Loiseau et al., 2014, Joubert et al., 2016). Dans ce contexte, une première étude menée sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé de rats nouveau-nés entre de 0 à 4 jours, a permis de mettre en évidence que l'ETO augmentait la réponse respiratoire au CO_2/H^+ par un ou plusieurs mécanismes dépendant des structures supra-bulbaires (Loiseau et al., 2014). Les régions encéphaliques et populations neuronales impliquées restaient encore à déterminer. Par ailleurs, les travaux d'une deuxième étude menés sur des souris *in vivo* ainsi que sur des

préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolé de souris nouveau-nées entre de 0 à 4 jours, ont pu mettre en évidence que l'ETO exerçait aussi un effet stimulant bulbaire sur la CCR en normocapnie. Cet effet avait été également observé chez les deux patientes CCHS précitées (Straus et al., 2010). D'un point de vue mécanistique, l'action stimulante de l'ETO en normocapnie pourrait dépendre d'une stimulation des systèmes sérotoninergiques bulbaires. En effet, l'ETO induisait une augmentation du nombre des neurones c-FOS/5-HT co-positifs, au sein des noyaux des raphés bulbaires Pallidus et Obscurus. De plus, l'antagonisation sérotoninergique annulait l'effet stimulant de l'ETO en normocapnie sur les préparations *ex vivo* de souris nouveau-nées. Aussi, les données obtenues sur ces préparations *ex vivo* suggéraient qu'au moins une partie de l'effet stimulant de l'ETO en normocapnie dépendait de son action sur les récepteurs GABA_A et NMDA.

Conclusion

Finalement, l'ensemble des données présentées dans cette revue soulignent des perspectives de recherche clinique intéressantes et prometteuses afin d'établir un traitement pharmacologique des CHS permettant le sevrage de la ventilation mécanique et ainsi l'amélioration de la qualité de vie des patients. A cet égard, une des pistes prometteuses serait d'associer le désogestrel, progestatif de la famille des gonanes, avec des agents sérotoninergiques.

REVIEW ARTICLE

Current Perspectives for the use of Gonane Progestronergic Drugs in the Treatment of Central Hypoventilation Syndromes

Camille Loiseau¹, Florence Cayetanot², Fanny Joubert^{1,3}, Anne-Sophie Perrin-Terrin^{1,4}, Philippe Cardot¹, Marie-Noëlle Fiamma¹, Alain Frugiere¹, Christian Straus^{1,5,6} and Laurence Bodineau^{1,*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie respiratoire expérimentale et clinique, F-75013, Paris, France; ²Institut de Neurosciences de la Timone, Aix Marseille Université, CNRS, UMR 7289, F-13385, Marseille, France; ³Sorbonne Universités, UPMC, Paris 06, UM 80, Institut de la Vision, INSERM, U968, CNRS, UMR 7210, F-75012, Paris, France; ⁴Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire "Hypoxia & Lung" EA2363, 74 rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny, France; ⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Branche "Adultes" du Centre de Référence du Syndrome d'Ondine, F-75013, Paris, France; ⁶AP-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

Abstract: 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 CO₂ 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 modulating the GABA_A and NMDA signaling in the respiratory network, medullary serotonergic 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.

Keywords: 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 [1-3].

Within this neuronal network, two groups of medullary neurons play an important role, the pre-Botzinger complex, which drives inspiration [1, 2, 4], and the parafacial respiratory group (pFRG), which controls pre-inspiratory and expiratory activities [1, 2, 5]. 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 en-

*Address correspondence to this author at the 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

environmental and behavioral conditions [7-12]. In particular, the central respiratory drive is finely regulated to be adjusted to blood variations of O₂, CO₂, and pH, detected primarily by carotid body peripheral and ventral medullary surface central chemoreceptors [13]. Ventral medullary surface chemoreceptors for CO₂/H⁺ are included in an entity called the retrotrapezoid nucleus that overlaps with the pFRG and expresses the *paired-like homeobox 2B* (*PHOX2B*) [5, 14]. They are considered to be the principal CO₂/H⁺ chemosensory cells [14-16]. Neurons from other central structures have also been shown to be CO₂/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 coeruleus in the pons, and raphe nuclei of the medulla oblongata [17-24].

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 [25]. Insufficient ventilation in CHS leads to an increase in PaCO₂ and a decrease in PaO₂, 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 PaCO₂ > 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 CO₂, *iii*) and the absence of primary lung, neuromuscular, or cardiac disease [26, 27]. 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 [28-33]. 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 [34-43]. 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 [44-48]. 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 [49]. These diseases present a true handicap for patients and a decrease in the quality of life [32, 33]. 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 [50]. This first observation has led to experimentation in rodents to characterize the modes of action of these molecules on ventilatory control [51, 52].

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 progesterone-ergic 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 [53, 54] 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 [55, 56]. 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 (17-hydroxyprogesterone and 19-norprogesterone derivatives) (Fig. 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 norpregnane classes belong to the 17-hydroxyprogesterone and 19-norprogesterone derivatives, respectively [57]. 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 [58]. 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 [59]. Upon ligand binding, the subsequent conformational changes of the receptors lead to chaperone protein dissociation [60, 61]. The ligand/receptor complex then dimerizes before being translocated into the nucleus, where it interacts with the PRE sequence of the target promoters [62, 63]. Within the CNS, natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins bind to the pre-

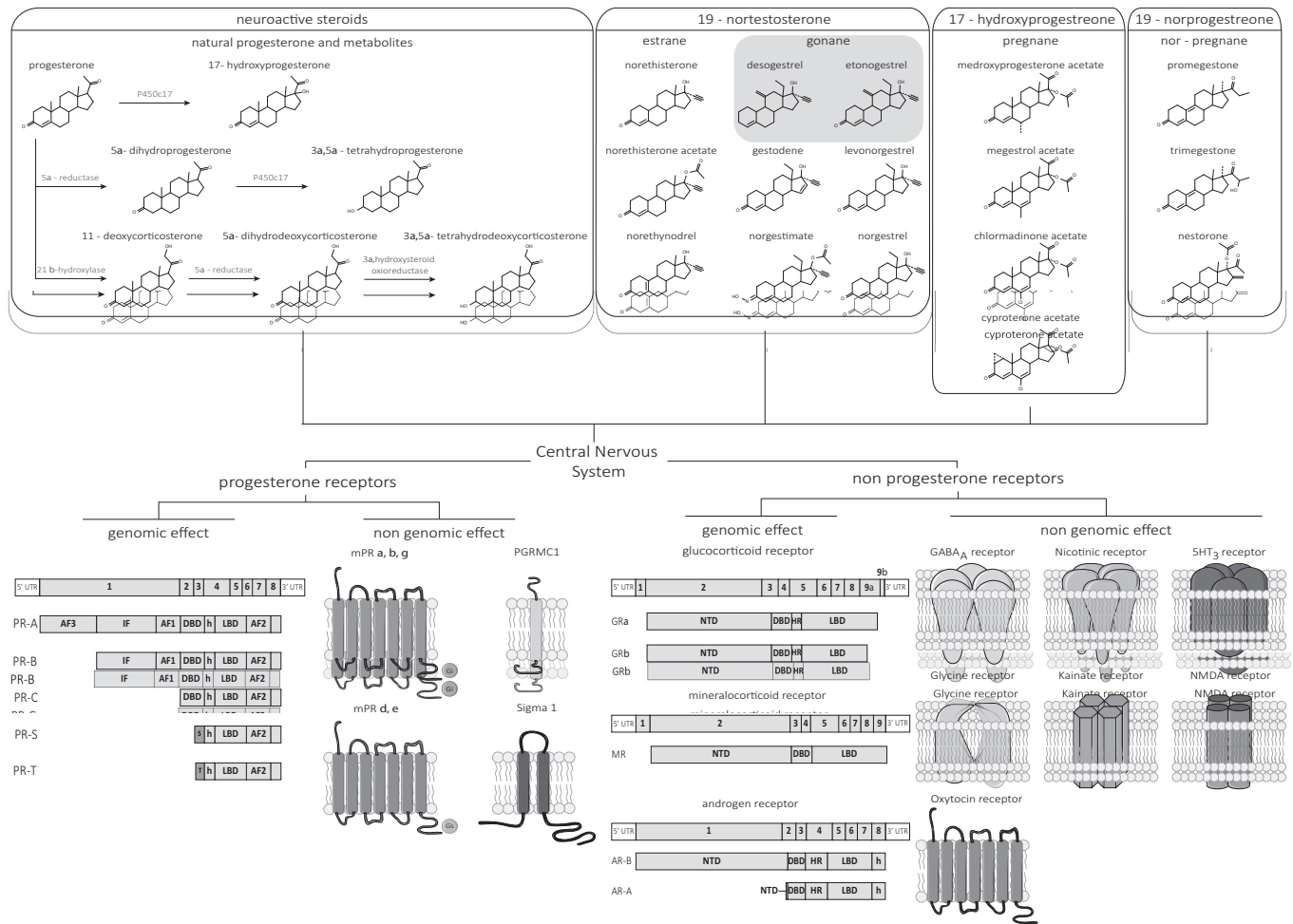


Fig. (1). Natural progesterone, progesterone derivatives, and families of synthetic progestin and their genomic and non-genomic modes of action within the CNS. The upper part of the figure shows the chemical structures of natural progesterone, its derivatives, and synthetic progestins. The enzymes required 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 intronic-exons not represented in the canonical mature mRNA. Abbreviations: steroid 17- α -hydroxylase/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).

dominant isoforms PR-A and PR-B obtained using alternative promoters. In addition, PR-C, PR-S, and PR-T isoforms have also been identified (Fig. 1) [59, 64]. Each isoform has distinct transcriptional activities of which the mechanisms have not been fully elucidated [59, 64]. PRs are found in brainstem structures involved in the central respiratory drive: the ventrolateral region of the medulla oblongata [65], nucleus of the solitary tract [66], hypoglossal nucleus [65, 67], locus coeruleus [68], and parabrachial nucleus [65]; in the diencephalon [69-72], and in the telencephalon [71, 72].

Natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins can also act through nuclear receptors other than the PR: the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors (Fig. 1) [58]. 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 [58].

In addition to the relatively well known interactions of natural progesterone, its derivatives and synthetic progestins with nuclear receptors, these steroid drugs may act by other ways.

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 [73-75]. It is therefore unlikely that these effects 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 [76-78]. The mPR family is composed of 11 members subdivided into three classes [79]. Only class II mPR, which has five members, are sensitive to progesterone [80]. mPR α , mPR β , and mPR γ are coupled to an inhibitory G protein [81-83], whereas mPR δ and mPR ϵ , which have a higher affinity for progesterone, [80, 81, 84, 85] are coupled to a stimulatory G protein (Fig. 1) [84]. The biological effects which result from the binding of progesterone to these receptors are yet to be determined [86]. Several studies have described the distribution of proteins and mRNAs encoding various isoforms within the CNS [84, 87, 88]. These receptors, expressed preferentially in neurons [88], are present in the spinal cord, brainstem, cerebellum, hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex [84, 87-90]. mPR δ is, to date, the only member identified to be specific to the CNS [84].

Binding of natural progesterone to progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) is rapid, selective, and reversible [91, 92]. The functional relevance of this interaction has only just started to be elucidated and includes the activation of extracellular signal-related kinase pathways [86, 93]. 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 [94], the nucleus of the solitary tract, periaqueducal gray matter, and the caudal hypothalamus [85, 94].

The sigma type 1 receptor, initially misnamed as "opioid" receptor [95, 96], is located in the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane and translocates to the plasma membrane upon fixation of agonists or stressors [97]. Two subtypes have been described called the sigma 1 and sigma 2 receptors [98]. The sigma 1 receptor has been clones, whereas the sigma 2 receptor has not [99]. Moreover, it has been suggested that the sigma 2 receptor is the previously described PGRMC1; further studies are required to clarify its final identification [100]. Interactions have been experimentally demonstrated between the sigma 1 receptor and dopamine and muscarinic acetylcholine receptors [97, 101], as well as many endogenous ligands [96, 97, 102]; among them, natural progesterone is one of the most

potent antagonists described [96, 101, 103, 104]. Natural progesterone binds competitively at the orthosteric site and is therefore considered to be an endogenous ligand [96, 101, 104]. 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 [102, 105, 106]. The physiological significance of these interactions are still unknown and require further studies [86].

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 $_A$, nicotinic acetylcholine, glycine, and 5HT $_3$ receptors, as well as the glutamatergic ion channel receptors, the NMDA and kainate receptors (Fig. 1). These receptors are all distributed throughout the CNS from the telencephalon to the spinal cord [54, 107-117].

The modulation of GABA $_A$ receptor activity by natural progesterone, its metabolites, and synthetic progestins is well documented. The neuroactive steroid binding site, responsible for the modulation of GABA $_A$ receptor, is located at the highly conserved transmembrane domain of the α subunit [118]. Natural progesterone, its metabolites and synthetic progestins have a variety of effects on GABA $_A$ receptors that have been linked to their chemical structure. The structure-activity relationship is highly complex and relies on several chemical characteristics of the steroids including *i*) the α/β -configuration of the constituents [119, 120], *ii*) the trans- or cis-configuration in the backbone structure [121], *iii*) the presence of donor or acceptor hydrogen-bond at specific position [122-124], even if it does not appear to be systematically required [125, 126] and *iv*) the substitution or addition of groups in certain positions of the steroid molecules [127-129]. For instance, dehydroepiandrosterone, is a negative allosteric modulator of GABA $_A$ receptors whereas 3 α 5 α tetrahydroprogesterone (allopregnanolone), 5 β -pregnan-3 α -ol-20-one (pregnanolone) and natural progesterone are positive allosteric modulators of GABA $_A$ receptor [130]. Furthermore, some data of the literature suggest that GABA $_A$ receptors modulation by neurosteroid may be influenced by the subunit composition of GABA $_A$ receptors [54, 131, 132]. GABA $_A$ receptor presents a large panel of structural organization because of its heteropentameric combination. To date, at least 19 GABA $_A$ receptor subunit genes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , and $\rho_{1,3}$) have been identified by sequencing the Human genome [133, 134]. However, only a few dozen combinations seem to exist *in vivo* suggesting a selecting process in the GABA $_A$ receptor assembling [133]. Although not fully understood to date, heterologous expression systems suggest that the presence of δ subunit confers to the GABA $_A$ receptor an increased sensitivity to pregnanolone [135], allopregnanolone [136], and 3 α 5 α tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) [137, 138]. Additionally, the modulation of GABA $_A$ receptors activity by neurosteroid may also depend on the phosphorylation state of GABA $_A$ receptors [139] and on the neurosteroid concentration according to the law of mass action [130, 136, 140]. Finally, expression of GABA $_A$

receptors is ubiquitous in the CNS, whereas the expression of steroidogenic enzymes is region specific, suggesting that neurosteroid/GABA_A receptor interactions are highly selective and that neurosteroids may specifically interact with distinct pools of GABA_A receptors [54, 132].

The established link between the chemical structure of neurosteroids and their effect on GABA_A receptor 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 [141-145], as well as A-ring reduced metabolites of progesterone 5 α -dihydroprogesterone and allopregnanolone [143, 146]. In contrast to GABA_A receptor, 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 [143, 145]. 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 [142, 145].

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 [147]. 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 receptors.

Other studies have shown that neuroactive steroids can modulate cation flux through the ionotropic channel 5-HT₃ [148-150]. Natural progesterone [148-150], its metabolites allopregnanolone [148] and THDOC [150], and the synthetic progestin cyproterone acetate [150], a member of pregnane family, can all exert negative allosteric modulation of the 5HT₃ receptor. The interaction between natural progesterone and the 5HT₃ 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-HT₃ receptor [148].

Many studies have examined the effect of pregnenolone sulfate and its analog pregnanolone sulfate on the glutamatergic ionotropic receptors, the NMDA and kainate receptors [151-155]. Pregnenolone sulfate appears to positively and negatively modulate the NMDA and kainate receptor, respectively [151-155] and pregnanolone sulfate negatively modulates both receptors [154]. Only a few studies have shown an effect of neuroactive steroids derived from natural progesterone on NMDA and kainate receptors. Allopreg-

nanolone weakly modulates NMDA currents [156] and induces increased release of neurotransmitters, which is blocked by specific NMDA antagonists [157]. Natural progesterone also rapidly and reversibly potentiates the kainate-induced current in a dose-dependent manner *via* interaction with an extracellular binding site [158]. 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

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 [159, 160]. 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 [161]. 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 β -dihydroprogesterone, which does not alter the binding capacity of rat oxytocin, negatively modulated the activity of the human oxytocin receptor [161]. 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 [162-164]. 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 [162, 163]. These regulatory mechanisms of progesterone shown in peripheral tissues probably occur in the CNS, where the oxytocin receptor is expressed [165, 166].

All the genomic and non-genomic actions of natural progesterone, its metabolites and synthetic progestins constitute a panel of action mechanisms as a base of their effects on the central respiratory drive.

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

Studies in both human and animal models 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, in this last case, the literature on humans is somewhat contradictory. In this section, we present the main essential elements which have already been extensively reviewed [37, 46, 167, 168].

3.1. In Human, the Progesterone 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 PaCO₂ during pregnancy, a physiological state in which plasma levels of progesterone are high [169, 170]. Later studies confirmed both the increase in baseline ventilation due to an effect on respiratory frequency [171] and hyperventilation and lower PaCO₂ during the luteal phase, when progesterone levels are higher than during the follicular phase [41, 172-174]. Similarly, breathing changes related to reduced synthesis of female sexual hormones during menopause confirmed their stimulatory effect, as ventilation is lower and PaCO₂ higher in postmenopausal than premenopausal women [36, 175]. In addition, administration of synthetic progestin to healthy men leads to increased ventilation and decreased PaCO₂ [34, 38, 176].

The influence of natural progesterone on O₂ and CO₂/H⁺ chemoreception in human remains under debate. Indeed, in women, studies are in favor of a potentiation of the hypercapnic ventilatory response by the progesterone systems but others studies do not have this conclusion. First, an enhancement of the hypercapnic ventilatory response during luteal phase in comparison with follicular phase has been reported [177, 178]. Second, the analysis of breathing during a hyperoxic CO₂ rebreathing procedure in pregnant women revealed a correlation between pregnancy and an increased chemoreflex to CO₂. Indeed, plasma progesterone levels negatively correlated with a decrease of the central chemoreflex ventilatory recruitment threshold for CO₂, and tended to be positively correlated with increased sensitivity of the chemoreflex to CO₂ [171]. At the opposite, works reported that while women have been described to have an increased response to hypoxia during the luteal phase in comparison with follicular phase, no significant difference has been observed in response to hypercapnia between phases of the menstrual cycle [41, 179]. In addition, comparison of observations made on women and men suggest a gender effect for the respiratory response to chemoreflex challenge in humans because men have been described having a greater response to hypoxia or hypercapnia than women [171, 179]. Nevertheless, this gender difference seems to disappear after corrections for height and body mass index or O₂ consumption and CO₂ production [180, 181], whereas it was maintained in others [180, 181]. This is unexpected because of the recognized stimulatory effect of progesterone that is found in women and minimal in men, and illustrate the complexity of action of the progesterone on ventilation, for which the mechanisms are still poorly understood.

Based on the mechanistic known effects of progesterone systems, research for genomic and non-genomic action mechanisms has been carried out in animal models to explain the respiratory drive modulation by these steroids.

3.2. Progesterone 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, progesterone 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 [37, 46, 167, 168]. In particular, progesterone 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 [182, 183]. 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 [184]. Thus, the influence of mPR on the baseline respiratory drive and its adaptation to gas challenges has been recently evaluated in mice [185]. 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 serotonin-dependent intermittent hypoxia. Indeed, such long-term facilitation is enhanced during the diestrus phase, when the level of progesterone is high [186]. Published studies also suggest that the stimulatory effect of progesterone 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 [182]. 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 [84, 87, 88]. Mechanistically, the action of progesterone may be similar to that of serotonergic systems that are critically involved in the neural control of breathing [46, 187]. Indeed, the serotonergic systems are sexually dimorphic at the level of respiratory motor nuclei, where fluctuating ovarian hormone levels are reflected by serotonin levels [46]. 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 [188], 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 [189].

In conclusion, progesterone systems facilitate breathing in healthy subjects by genomic and non-genomic mechanisms that include the modulation of neurotransmission systems, such as the serotonergic systems. Finally, natural progesterone appears to influence breathing by its actions in the medullary and hypothalamic areas of the brain.

Because of the clinical potential of progesterone systems for inducing an increase in the respiratory drive, the question of their ability to induce beneficial effects in CHS patients was of particular interest.

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" [29]. 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 [190]. CCHS is diagnosed by hypoventilation linked to a severely diminished CO_2/H^+ chemoreflex (increase in central respiratory drive caused by elevation of CO_2 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 [31]. It occurs throughout the world, with an estimated incidence of 1 per 200,000 live births in France [30, 191, 192]. It is related to a heterozygous mutation in the *PHOX2B* gene [193]. 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_2 chemoreception [16, 193-198]. The existence of the RTN/pFRG in humans has not been clearly established. However, based on immunohistochemical studies [199-201], 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 [31].

To date, no available pharmacological treatment exists for CCHS patients, which consequently depend on mechanical ventilation at least during sleep. This underlines the interest in developing pharmacological alternatives.

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_2 Chemosensitivity in CCHS Under Desogestrel Treatment

In the regular clinical follow-up of a CCHS patient from the French cohort [191], we were surprised to observe a respiratory response to CO_2 during a test using the rebreathing method [50, 202]. The patient was a 19-year-old woman carrying the five-alanine expansion mutation of the *PHOX2B* gene. She had been completely unresponsive to such stimulation since birth as illustrated in Fig. (2A), obtained less than three years before the observation of a respiratory response to CO_2 . 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_2 -93% O_2 gas mixture and two days later with the rebreathing method (Fig. 2A). Extensive questioning of the patient allowed the physicians to suggest that the use of a progestin, desogestrel (75 μg 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 six-alanine expansion mutation of the *PHOX2B* gene, to hypercapnia after the initiation of contraceptive treatment with desogestrel (75 μg 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_2 , 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_2 , despite the absence of a known effect of natural progesterone or progestin from other molecular families in CCHS [46, 47]. However, shortly after this first study, another research group presented contradictory results. In this second clinical study, a unique patient, a 23-year-old woman carrying the seven-alanine expansion mutation of the *PHOX2B* gene, was deliberately treated for two weeks with 150 μg desogestrel

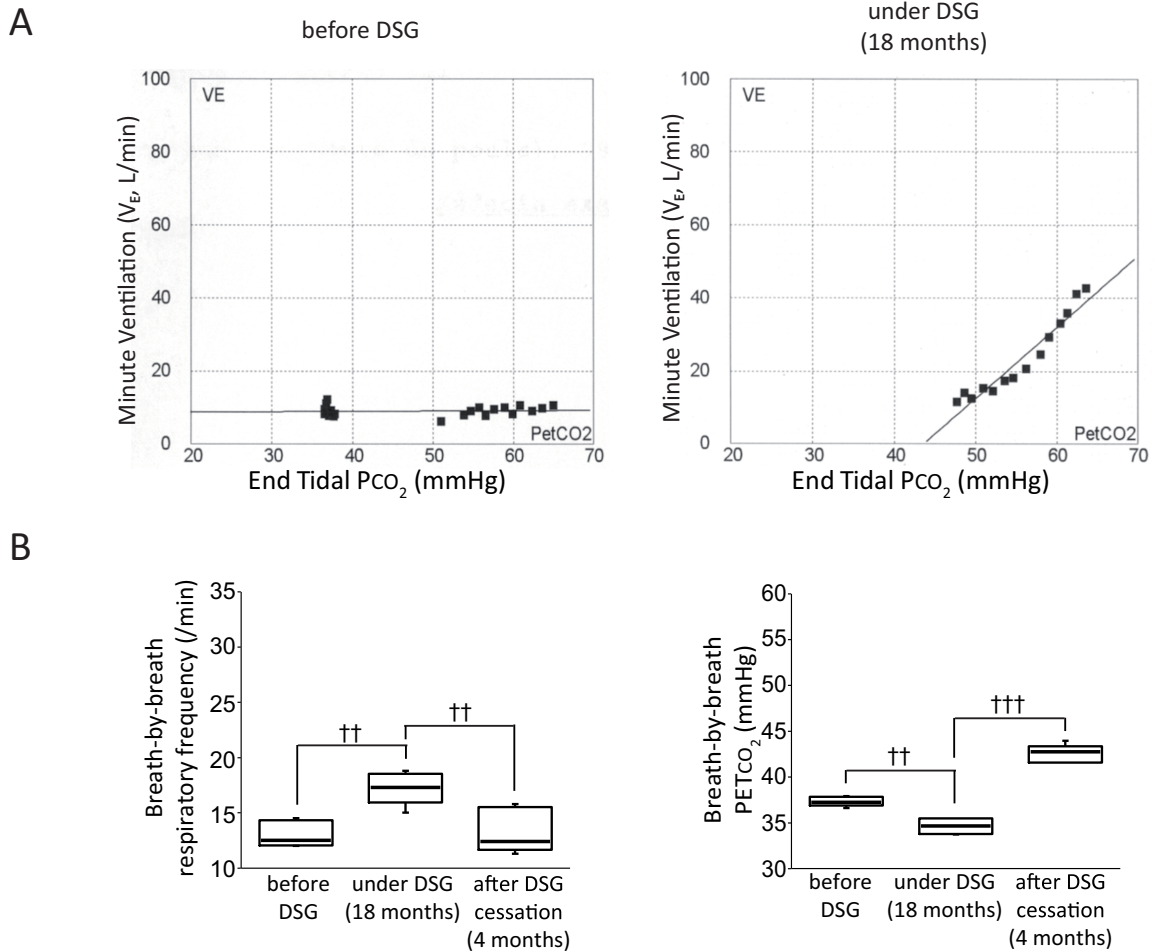


Fig. (2). Consequences of desogestrel exposure on the ventilation of a CCHS patient. (A) Ventilatory response of a CCHS patient during a CO₂ rebreathing test [50]. The left panel shows the change in ventilation (V_E) with the increase in end tidal CO₂ partial pressure assessed before desogestrel exposure. 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 breath-by-breath end tidal CO₂ partial pressure of the CCHS patient at baseline [52]. † indicates a significant difference between before and after desogestrel treatment and during desogestrel exposure. One-way ANOVA – post hoc Bonferroni correction. †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$. 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 serotonergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

and 30 μg ethinyl estradiol daily and did not display a recovery of CO₂ chemosensitivity [203]. 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 (Fig. 1) [103, 145, 147, 150, 161, 204, 205]. 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 [57, 205], may involve multiple pathways. Gonane progestins may exert their ventilatory effect, as natural progesterone and its derivatives (Fig. 1), by acting on the hypothalamus or brainstem [182, 184] through both genomic [205] and non-genomic mecha-

nisms [84, 132, 184, 206]. 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 CO₂/H⁺ chemosensitivity outside of the main chemosensitive central site, the RTN/pFRG, which is dysfunctional in CCHS due to the PHOX2B mutation.

The fortuitous observation of a recovery of CO₂ chemosensitivity in CCHS patients under desogestrel treatment

that does not seem to be systematical underlines the necessity to dissect the action mechanisms of this progestin.

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 CHS 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 [207], 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 (Fig. 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 [4, 5], as well as other groups involved in the modulation of the respiratory rhythm, such as raphe nuclei [24, 208-212]. 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 (Fig. 3) [213]. This has led researchers to use this preparation for many years for both pharmacological and CO₂/O₂ respiratory adaptation studies [207, 214-225]. Using *ex vivo* preparations containing encephalic regions more rostral than the medulla oblongata, diencephalon-brainstem-spinal cord preparations (DBS), permits the study of the influence of these rostral encephalic regions on the central respiratory drive [219, 226]. 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 [51]. Metabolic acidosis is an experimental situation that models hypercapnia [215, 227]. 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 (Fig. 3) [215, 227-229]. 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 CO₂/H⁺-activated cells of supramedullary regions, such as those of the locus coeruleus [17, 230, 231], the periaqueductal gray matter [19, 21], and the caudal hypothalamus [20, 232], all reported to be progesterone-sensitive [233, 234], may be 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.

In addition to the facilitating effect of gonane progestins during a chemoreflex situation, based on the known influence of natural progesterone and its derivatives, the question of an effect of gonane progestins on the baseline ventilation was raised.

4.2.3. The Beneficial Effect of Desogestrel Extends Beyond CO₂/H⁺ Chemosensitivity in Baseline Ventilation

Given the effects of natural progesterone and other progesterone drugs on basal ventilation, it seemed potentially informative to analyze the effects of these gonane progestins outside of a CO₂/H⁺ 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 CO₂ under desogestrel [50]. The review of the dynamically collected data (before, during, and after desogestrel exposure) showed that the respiratory frequency was higher and PETCO₂ lower in the presence than absence of the progestin, whereas the tidal volume did not change (Fig. 2B) [52]. This suggests that the ventilatory effect of desogestrel may extend beyond CO₂/H⁺ 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 [235], 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 [236] (Fig. 4A) [52]. Using mouse *ex vivo* CNS preparations that contained only the medulla oblongata and the spinal cord (MS preparations, Fig. 3), we showed that the medulla oblongata is sufficient for the observed increase in respiratory frequency induced by etonogestrel (Fig. 4B) [52]. 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 tidal volume). 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* gene mutation [193, 196], 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 [52]. This histological observation in rodents is consistent with the increase in respiratory frequency observed in CCHS patient lacking *a priori* a functional RTN/pFRG.

Following the demonstration of the facilitating effect of gonane progestins on the respiratory frequency, the next step was to characterize the underlying mechanisms by searching for etonogestrel modulation of signaling involved in the functioning of the respiratory network.

4.2.4. The Desogestrel Metabolite Influences the Modulation of the Respiratory Drive Through the GABA_A and NMDA Signaling in the Respiratory Network

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 (Fig. 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

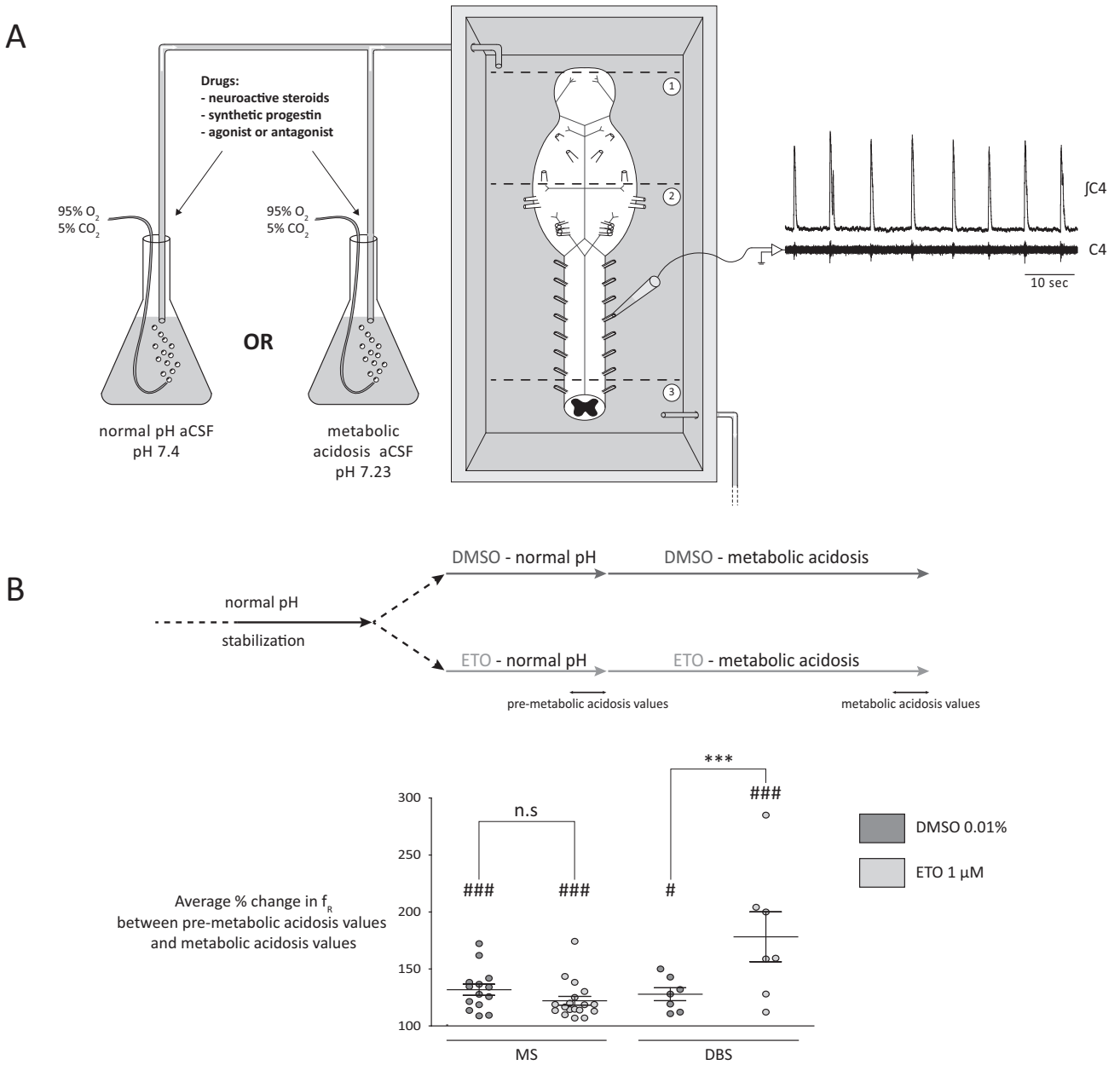


Fig. (3). *Ex vivo* CNS preparations in an electrophysiological recording chamber and the effect of etonogestrel on respiratory frequency under conditions of metabolic acidosis on these preparations. **(A)** Schematic representation of an *ex vivo* preparation of the CNS from a newborn rodent placed 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 CaCl₂ 2H₂O, 1.15 mM MgCl₂ 6H₂O, 0.58 mM NaH₂PO₄ H₂O, 21.0 mM NaHCO₃, 30.0 mM D-glucose) or metabolic acidosis (pH 7.23 aCSF: 129.0 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂ 2H₂O, 1.15 mM MgCl₂ 6H₂O, 0.58 mM NaH₂PO₄ H₂O, 15.0 mM NaHCO₃, 30.0 mM D-glucose), both saturated with O₂ and adjusted to pH by bubbling with 95% O₂ and 5% CO₂. 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 [51]. After a stabilization period (30 min superfused with normal pH aCSF without drug), preparations were pre-incubated 15 min either with etonogestrel (1 μ M) 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. Pre-metabolic acidosis

Fig. (3). contd....

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 dot plot shows the percentage change in respiratory frequency (f_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 \pm 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_R compared to control values; * significant difference between etonogestrel and DMSO exposures. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, n.s.: non-significant. Abbreviations: artificial cerebrospinal fluid (aCSF); integrated activity of the C4 ventral nerve root (jC4); 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 [51]. 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.

ex vivo MS preparations to assess the influence of etonogestrel on the modulation of the respiratory-like frequency through the GABA_A and NMDA signaling in the respiratory network, as both GABA_A and NMDA receptors are involved in the modulation of the central respiratory drive [237-239] and are influenced by steroids [130, 132, 155]. First, blocking the GABA_A receptors with bicuculline reduced the accelerating effect of etonogestrel at a low concentration (0.05 μ M) and suppressed it at higher a concentration (2 μ M; Fig. 4C) suggesting that part of the effect of etonogestrel may depend on the interaction of the progestin with GABA_A receptors. These results are consistent with published data establishing steroid-dependent negative and/or positive allosteric modulation of GABA_A receptor as indicated above [130, 206]. The differential effect of etonogestrel may be due to a concentration-dependent effect on several subunits of GABA_A receptors. Indeed, the GABA_A receptor-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 [132]. The reduction or total suppression of the etonogestrel effect by bicuculline may depend on the overall efficiency of different types of GABA_A receptors as $\alpha_{1/3}$ and $\alpha_{2/4}$ GABA_A receptor subunits are both present in medullary respiratory areas [240, 241]. In addition, in the presence of etonogestrel, a GABA_A receptor agonist, muscimol at IC₅₀, induced a greater decrease in respiratory frequency than in its absence, suggesting that the gonane progestin positively modulates GABA_A receptor (Fig. 4D). This was supported by the fact that gonanes such as etonogestrel are derived from testosterone (Fig. 1), a positive modulator of GABA_A receptor [130]. 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 etonogestrel concentration, whereas the increase in respiratory frequency induced by NMDA was greater in the presence of etonogestrel than in its absence. Both observations suggest that etonogestrel influences the modulation of the respiratory-like frequency by NMDA signaling in the respiratory network.

The raised step was to investigate if the change of GABA_A and NMDA signaling in the respiratory network influence a major central system of respiratory regulation known to be modulated by natural progesterone, the serotonin system.

4.2.5. The Desogestrel Metabolite Increases the Baseline Respiratory Drive by a Medullary Serotonergic 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 serotonergic systems. Indeed, *i*) medullary serotonergic neurons modulate the baseline central respiratory drive [208, 211, 242-245], *ii*) part of the acceleration of the respiratory drive by natural progesterone depends on an interaction with serotonergic systems [39, 246], and *iii*) medullary serotonergic neurons are thought to be influenced by GABA/GABA_A and NMDA signaling [247-252]. 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 [209, 212, 253]. 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 (Fig. 5A), with many of the c-FOS-positive cells also positive for serotonin (Fig. 5A) [52]. In addition, blockade of the serotonergic modulation of the respiratory drive by methysergide, a 5-HT_{1,2,7} receptor antagonist [225, 254-256], completely suppressed the accelerating effect of etonogestrel on the respiratory-like frequency in MS preparations (Fig. 5B) [52]. These convergent results suggest the existence of a new interaction pathway between progesterone and serotonergic systems, as the effects of steroids on the release of serotonin depends on supramedullary regions [246, 257]. The gonane-serotonin medullary interaction that affects the respiratory drive is likely specific to this progestin family.

CONCLUSION

In conclusion, among progesterone 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 CO₂ 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 serotonergic pathway and that the recovery of the CO₂ chemoreflex depends on supramedullary action(s). The mechanisms likely involve the interaction of gonane with GABA_A and NMDA membrane

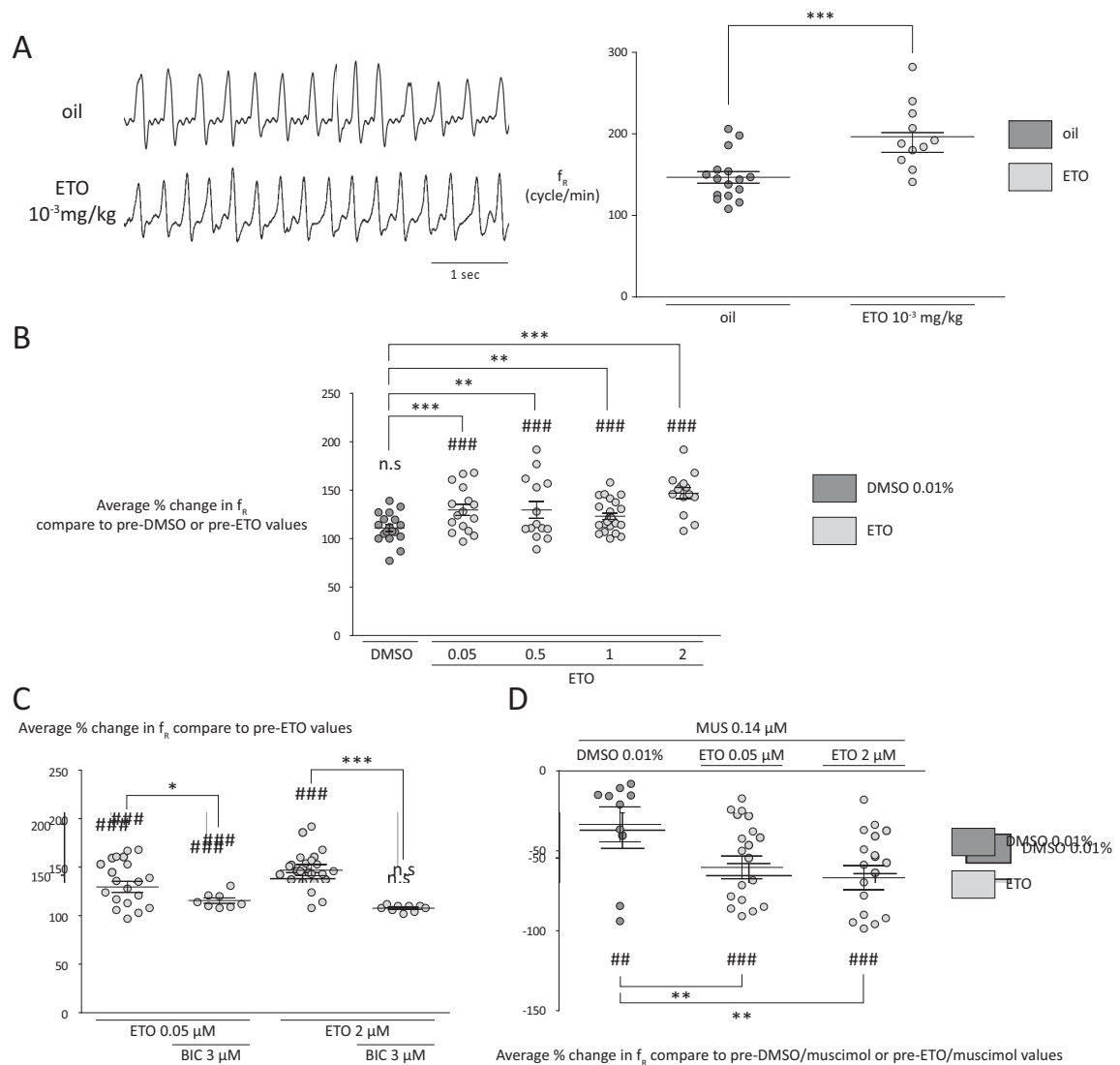


Fig. (4). Effect of etonogestrel on baseline respiratory frequency on *in vivo* newborn mice and *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Implication of GABA_A receptors. (A) Effect of etonogestrel on baseline respiratory frequency (f_R) on *in vivo* newborn mice. Newborn mice received *per os* either etonogestrel (ETO; 10⁻³ mg/kg; concentration equivalent to that of the 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 dot 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 μM) or dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.01%, etonogestrel solvent). The respiratory-like activity was recorded at the level of the fourth cervical ventral root (Fig. 3). The dot 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_A receptor blockade on *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were pre-incubated with bicuculline (GABA_A receptor antagonist) before etonogestrel exposure. The dot plot shows the percentage change of the f_R during etonogestrel exposure (0.05 μM and 2 μM) in the absence and presence of 3 μM bicuculline (a concentration previously shown to be sufficient to block the effect of GABA on GABA_A receptor-mediated regulation of respiration [206]). **(D)** Effect of etonogestrel on GABA_A receptor modulation of *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were first exposed to etonogestrel (0.05 μM and 2 μM) or DMSO (0.01%) and then DMSO/muscimol (0.14 μM; EC₅₀, as determined in [52]) or etonogestrel/muscimol (0.14 μM). The dot plot shows the percentage change of the f_R during DMSO/muscimol (dark gray circles) or etonogestrel/muscimol (light gray circles) exposure. All values are expressed as the mean ± 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_R 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_R); muscimol (MUS). Adapted from [52]. Reprinted from *Neuropharmacology*, 107, F Joubert, A-S Perrin-Terrin, E Verkaeren, P Cardot, M-N Fiamma, A Frugièrè, I Rivals, T Similowski, C Straus, L Bodineau, Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: Animal data involving serotonergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

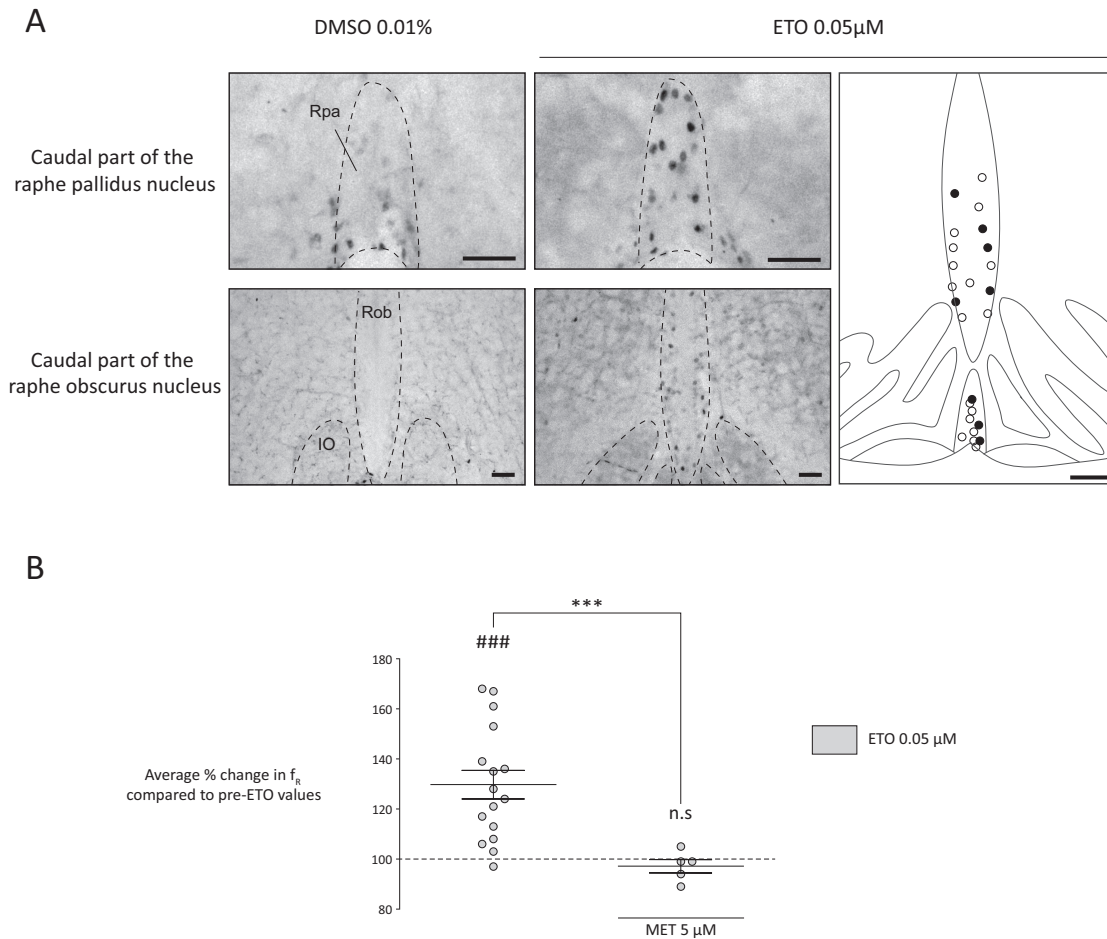


Fig. (5). The effect of etonogestrel on respiration implies the medullary serotonergic systems. **(A)** Effect of etonogestrel on *c-fos* expression in medullary respiratory structures containing serotonergic neurons. On the left, gray photomicrographs illustrate c-FOS immunoreactivity in the caudal parts of the pallidus and obscurus raphe nuclei after dimethyl sulfoxide (DMSO) or etonogestrel exposure. Scale bar: 100 μm. On the right, photomicrographs illustrate the serotonergic character of c-FOS-immunoreactive cells in these two structures. Scale bars: 10 μm. **(B)** Effect of etonogestrel under conditions of blockade of serotonergic respiratory influence on *ex vivo* medullary-spinal cord preparations. Preparations were first exposed to methysergide (a 5-HT_{1/2/7} receptor antagonist; 5 μM, the lowest concentration that completely antagonizes the effect of 5-HT, as determined in [52]) and then etonogestrel (0.05 μM). The scatter plot shows the percentage change of the f_R during etonogestrel exposure in the absence or presence of methysergide. All values are expressed as the mean ± SEM. The Kruskal-Wallis test was performed. Differences were considered to be significant for $p < 0.05$. # significant increase in mean f_R 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_R); methysergide (MET). Adapted from [52]. Reprinted from Neuropharmacology, 107, F Joubert, A-S Perrin-Terrin, E Verkaeren, P Cardot, M-N Fiamma, A Frugièrre, I Rivals, T Similowski, C Straus, L Bodineau, Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems, 339-350, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

receptors leading to a change of the modulation of the respiratory-like frequency through the GABA_A and NMDA signaling in the respiratory network. Further experiments are necessary to completely understand the central actions of these progestins, in particular regarding the complexity of the action of progesterone drugs in the context of patients who respond [50] or not [203] to the gonane.

LIST OF ABBREVIATIONS

5-HT = 5-hydroxytryptamine
aCSF = artificial cerebrospinal fluid

AF = activation function
AR = nuclear androgen receptor
BIC = bicuculline
C4 = electrical activity of the C4 ventral nerve root
CCHS = congenital central alveolar hypoventilation syndrome
CHO = chinese hamster ovary
CHS = central alveolar hypoventilation syndromes

CNS	=	central nervous system
CO ₂	=	carbon dioxide
DBD	=	DNA binding domain
DBS	=	diencephalon-brainstem-spinal cord
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DSG	=	desogestrel
EC ₅₀	=	half maximal effective concentration
ETO	=	etonogestrel
f _R	=	respiratory frequency
GABA _A	=	type A gamma-aminobutyric acid receptor
GPCR	=	G-protein-coupled receptor
GR	=	nuclear glucocorticoid receptor
h	=	nuclear location signal
HEK	=	human embryonic kidney
IF	=	inhibition factor
IO	=	inferior olives
LBD	=	ligand binding domain
MET	=	methysergide
MK-801	=	dizocilpine
mPR	=	membrane progesterone receptor
MR	=	nuclear mineralocorticoid receptor
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
MS	=	medullary-spinal cord
MUS	=	muscimol
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NTD	=	N-terminal domain
O ₂	=	dioxygen
P450c17	=	steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase precursor
PaCO ₂	=	partial pressure of carbon dioxide in arterial blood
PaO ₂	=	partial pressure of dioxygen in arterial blood
PETCO ₂	=	partial pressure of end-tidal carbon dioxide
PHOX2B	=	paired-like homeobox 2B
pFRG	=	parafacial respiratory group
PGRMC1	=	progesterone receptor membrane component 1
PR	=	nuclear progesterone receptor
PRE	=	progesterone responsive element

RTN	=	retrotrapezoid nucleus
RU486	=	mifepristone
∫C4	=	integrated activity of the C4 ventral nerve root
THDOC	=	3α5α tetrahydrodeoxycorticosterone
UTR	=	untranslated region
V _E	=	minute ventilation

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The present work was supported by grants from the French National Agency for Research (ProgestVentil; ANR-15-CE17), Association Française pour le Syndrome d'Ondine and Chancellerie de l'Université de Paris (Legs Poix 1504). Fanny Joubert was supported by the « Fonds de dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire 2012 ».

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank William Hempel (Alex Edelman & associates) for editing the English text.

CL performed animal experiments, analyzed data, discussed the results and their significance, generated figures and wrote part of the manuscript. FC wrote part of the manuscript. FJ performed animal experiments, analyzed data, discussed the results and their significance and generated figures. ASPT performed animal experiments, analyzed data and discussed the results and their significance. PC, MNF and AF discussed part of the presented results and their significance. CS performed clinical observations, analyzed data and discussed the results and their significance. LB designed and supervised all animal experiments, obtained funding, shaped, and interpreted the data, discussed the results and their significance, and wrote the manuscript.

REFERENCES

- [1] Feldman, J.L.; Del Negro, C.A.; Gray, P.A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu. Rev. Physiol*, **2013**, *75*, 423-452.
- [2] 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.
- [3] Richter, D.W.; Smith, J.C. Respiratory rhythm generation *in vivo*. *Physiology. (Bethesda.)*, **2014**, *29*(1), 58-71.
- [4] 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.
- [5] Onimaru, H.; Homma, I. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci*, **2003**, *23*(4), 1478-1486.
- [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] 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.

- [8] Wysocki, M.; Fiamma, M.N.; Straus, C.; Sang, P.C.; Similowski, T. Chaotic dynamics of ventilatory flow in humans. *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc.*, **2005**, *1*, 759-762.
- [9] Fiamma, M.N.; Samara, Z.; Baconnier, P.; Similowski, T.; Straus, C. Respiratory inductive plethysmography to assess respiratory variability and complexity in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **2007**, *156*(2), 234-239.
- [10] Fiamma, M.N.; Straus, C.; Thibault, S.; Wysocki, M.; Baconnier, P.; Similowski, T. 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-R1993.
- [11] Wuyts, R.; Vlemmincx, E.; Bogaerts, K.; Van, D., I.; Van den, B.O. Sigh rate and respiratory variability during normal breathing and the role of negative affectivity. *Int. J. Psychophysiol.*, **2011**, *82*(2), 175-179.
- [12] Ramirez, J.M. The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. *Prog. Brain Res.*, **2014**, *209*, 91-129.
- [13] Feldman, J.L.; Del Negro, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2006**, *7*(3), 232-241.
- [14] Guyenet, P.G.; Bayliss, D.A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron*, **2015**, *87*(5), 946-961.
- [15] 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.
- [16] Guyenet, P.G.; Stornetta, R.L.; Bayliss, D.A.; Mulkey, D.K. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp. Physiol.*, **2005**, *90*(3), 247-253.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Horn, E.M.; Waldrop, T.G. Suprapontine control of respiration. *Respir. Physiol.*, **1998**, *114*(3), 201-211.
- [21] Lopes, L.T.; Patrone, L.G.; Bicego, K.C.; Coimbra, N.C.; Gargaglioni, L.H. Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. *Pflugers Arch.*, **2012**, *464*(2), 155-166.
- [22] 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.
- [23] Richerson, G.B. Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, **1995**, *73*(3), 933-944.
- [24] Hodges, M.R.; Richerson, G.B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* (1985), **2010**, *108*(5), 1425-1432.
- [25] Cielo, C.; Marcus, C.L. Central Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med Clin.*, **2014**, *9*(1), 105-118.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Verkaeren, E.; Brion, A.; Hurbault, A.; Chenivresse, 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 cross-sectional study. *Respir. Res.*, **2015**, *16*, 80.
- [29] Muzumdar, H.; Arens, R. Central Alveolar Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med. Clin.*, **2008**, *3*(4), 601-615.
- [30] Carroll, M.S.; Patwari, P.P.; Weese-Mayer, D.E. Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *J. Appl. Physiol.*, **2010**, *108*(4), 979-988.
- [31] Ramanantsoa, N.; Gallego, J. Congenital central hypoventilation syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **2013**.
- [32] 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**.
- [33] Harper, R.M.; Kumar, R.; Macey, P.M.; Woo, M.A.; Ogren, J.A. Affective brain areas and sleep-disordered breathing. *Prog. Brain Res.*, **2014**, *209*, 275-293.
- [34] Mikami, M.; Tatsumi, K.; Kimura, H.; Honda, Y.; Kuriyama, T. Respiration effect of synthetic progesterin in small doses in normal men. *Chest*, **1989**, *96*(5), 1073-1075.
- [35] 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.
- [36] Preston, M.E.; Jensen, D.; Janssen, I.; Fisher, J.T. Effect of menopause on the chemical control of breathing and its relationship with acid-base status. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2009**, *296*(3), R722-727.
- [37] Joseph, V.; Behan, M.; Kinkead, R. Sex, hormones, and stress: how they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **2013**, *185*(1), 75-86.
- [38] 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.
- [39] Behan, M.; Wenninger, J.M. Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **2008**, *164*(1-2), 213-221.
- [40] Behan, M.; Kinkead, R. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Compr. Physiol.*, **2011**, *1*(4), 2101-2139.
- [41] Slatkowska, 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.
- [42] Penatti, E.M.; Berniker, A.V.; Kereshi, B.; Cafaro, C.; Kelly, M.L.; Niblock, M.M.; Gao, H.G.; Kinney, H.C.; Li, A.; Nattie, E.E. Ventilatory response to hypercapnia and hypoxia after extensive lesion of medullary serotonergic neurons in newborn conscious piglets. *Journal of Applied Physiology*, **2006**, *101*(4), 1177-1188.
- [43] Collop, N.A. Medroxyprogesterone acetate and ethanol-induced exacerbation of obstructive sleep apnea. *Chest*, **1994**, *106*(3), 792-799.
- [44] Haddad, G.G.; Mazza, N.M.; Defendini, R.; Blanc, W.A.; Driscoll, J.M.; Epstein, M.A.; 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.
- [45] Gozal, D. Congenital central hypoventilation syndrome: an update. *Pediatr. Pulmonol.*, **1998**, *26*(4), 273-282.
- [46] 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.
- [47] Sritippayawan, S.; Hamutcu, R.; Kun, S.S.; Ner, Z.; Ponce, M.; Keens, T.G. Mother-daughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2002**, *166*(3), 367-369.
- [48] 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.
- [49] Healy, F.; Marcus, C.L. Congenital central hypoventilation syndrome in children. *Paediatr. Respir. Rev.*, **2011**, *12*(4), 253-263.
- [50] 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.
- [51] Loiseau, C.; Osinski, D.; Joubert, F.; Straus, C.; Similowski, T.; Bodineau, L. The progesterin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a

- mechanism involving supramedullary structures. *Neurosci. Lett*, **2014**, *567*, 63-67.
- [52] Joubert, F.; Perrin-Terrin, A.S.; Verkaeren, E.; Cardot, P.; Fiamma, M.N.; Frugiere, A.; Rivals, I.; Similowski, T.; Straus, C.; Bodineau, L. Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems. *Neuropharmacology*, **2016**, *107*, 339-350.
- [53] Pardridge, W.M.; Mietus, L.J. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest*, **1979**, *64*(1), 145-154.
- [54] Mellon, S.H.; Griffin, L.D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*, **2002**, *13*(1), 35-43.
- [55] Baulieu, E.E. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell*, **1991**, *71*(1-2), 3-10.
- [56] Compagnone, N.A.; Mellon, S.H. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*, **2000**, *21*(1), 1-56.
- [57] Sitruk-Ware, R. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, **2008**, *61*(1-2), 151-157.
- [58] Schindler, A.E.; Campagnoli, C.; Druckmann, R.; Huber, J.; Pasqualini, J.R.; Schweppe, K.W.; Thijssen, J.H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*, **2003**, *46 Suppl 1*, S7-S16.
- [59] Brinton, R.D.; Thompson, R.F.; Foy, M.R.; Baudry, M.; Wang, J.; Finch, C.E.; Morgan, T.E.; Pike, C.J.; Mack, W.J.; Stanczyk, F.Z.; Nilsen, J. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*, **2008**, *29*(2), 313-339.
- [60] Pratt, W.B. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1998**, *217*(4), 420-434.
- [61] Pratt, W.B.; Toft, D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2003**, *228*(2), 111-133.
- [62] 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.
- [63] Leonhardt, S.A.; Boonyaratanakornkit, V.; Edwards, D.P. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*, **2003**, *68*(10-13), 761-770.
- [64] 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.
- [65] Kastrop, Y.; Hallbeck, M.; Amandusson, A.; Hirata, S.; Hermanson, O.; Blomqvist, A. Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci Lett*, **1999**, *275*(2), 85-88.
- [66] Haywood, S.A.; Simonian, S.X.; van der Beek, E.M.; Bicknell, R.J.; Herbison, A.E. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology*, **1999**, *140*(7), 3255-3263.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] Lauber, A.H.; Romano, G.J.; Pfaff, D.W. Sex difference in estradiol regulation of progesterone receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization. *Neuroendocrinology*, **1991**, *53*(6), 608-613.
- [70] Furuta, M.; Fukushima, A.; Chiba, S.; Sano, A.; Akema, T.; Kimura, F.; Funabashi, T. Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. *Neuroreport*, **2010**, *21*(11), 777-781.
- [71] Kato, J.; Hirata, S.; Nozawa, A.; Yamada-Mouri, N. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm. Behav*, **1994**, *28*(4), 454-463.
- [72] Guerra-Araiza, C.; Reyna-Neyra, A.; Salazar, A.M.; Cerbon, M.A.; Morimoto, S.; Camacho-Alarroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression in the prepubertal and adult male rat brain. *Brain Res Bull*, **2001**, *54*(1), 13-17.
- [73] Blackmore, P.F.; Neulen, J.; Lattanzio, F.; Beebe, S.J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem*, **1991**, *266*(28), 18655-18659.
- [74] 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.
- [75] Filardo, E.J.; Quinn, J.A.; Bland, K.I.; Frackelton, A.R., Jr. 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*, **2000**, *14*(10), 1649-1660.
- [76] Thomas, P. Characteristics of membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterone actions. *Front Neuroendocrinol*, **2008**, *29*(2), 292-312.
- [77] 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.
- [78] Thomas, P.; Pang, Y. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*, **2012**, *96*(2), 162-171.
- [79] 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.
- [80] 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 yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*, **2008**, *73*(11), 1160-1173.
- [81] Zhu, Y.; Rice, C.D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterone 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.
- [82] 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 progesterone membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*, **2007**, *148*(2), 705-718.
- [83] Moussatche, P.; Lyons, T.J. Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. *Biochem Soc Trans*, **2012**, *40*(1), 200-204.
- [84] 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.
- [85] Intlekofer, K.A.; Petersen, S.L. Distribution of mRNAs encoding classical progesterone receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterone and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience*, **2011**, *172*, 55-65.
- [86] Singh, M.; Su, C.; Ng, S. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci*, **2013**, *7*, 159.
- [87] 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.
- [88] Meffre, D.; Labombarda, F.; Delespierre, B.; Chastre, A.; De Nicola, A.F.; Stein, D.G.; Schumacher, M.; Guennoun, R. Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience*, **2013**, *231*, 111-124.
- [89] 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.
- [90] Boukari, R.; Marcouiller, F.; Joseph, V. Relative Contribution of Nuclear and Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. *Adv Exp Med Biol*, **2015**, *860*, 261-267.
- [91] Falkenstein, E.; Meyer, C.; Eisen, C.; Scriba, P.C.; Wehling, M. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1996**, *229*(1), 86-89.
- [92] Meyer, C.; Schmid, R.; Scriba, P.C.; Wehling, M. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem*, **1996**, *239*(3), 726-731.
- [93] Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J*, **1998**, *17*(7), 2008-2018.
- [94] 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.
- [95] Su, T.P. Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **1982**, *223*(2), 284-290.
- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] Hellewell, S.B.; Bowen, W.D. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (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.
- [99] Hanner, M.; Moebius, F.F.; Flandorfer, A.; Knaus, H.G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; Glossmann, H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**, *93*(15), 8072-8077.
- [100] 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.
- [101] Johannessen, M.; Fontanilla, D.; Mavlyutov, T.; Ruoho, A.E.; Jackson, M.B. Antagonist action of progesterone at sigma-receptors in the modulation of voltage-gated sodium channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2011**, *300*(2), C328-337.
- [102] Maurice, T. Neurosteroids and sigma receptors, biochemical and behavioral relevance. *Pharmacopsychiatry*, **2004**, *37 Suppl 3*, S171-182.
- [103] Monnet, F.P.; Mahe, V.; Robel, P.; Baulieu, E.E. 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*, **1995**, *92*(9), 3774-3778.
- [104] Ganapathy, M.E.; Prasad, P.D.; Huang, W.; Seth, P.; Leibach, F.H.; Ganapathy, V. 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.
- [105] Alonso, G.; Phan, V.; Guillemain, I.; Saunier, M.; Legrand, A.; Anol, M.; Maurice, T. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, **2000**, *97*(1), 155-170.
- [106] 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.
- [107] Nashmi, R.; Lester, H.A. CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J Mol Neurosci*, **2006**, *30*(1-2), 181-184.
- [108] Deutch, A.Y.; Holliday, J.; Roth, R.H.; Chun, L.L.; Hawrot, E. Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1987**, *84*(23), 8697-8701.
- [109] Bloom, F.E.; Morales, M. The central 5-HT3 receptor in CNS disorders. *Neurochem Res*, **1998**, *23*(5), 653-659.
- [110] Bleakman, D. Kainate receptor pharmacology and physiology. *Cell Mol Life Sci*, **1999**, *56*(7-8), 558-566.
- [111] Jin, X.T.; Smith, Y. Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol*, **2011**, *717*, 27-37.
- [112] Conti, F.; Minelli, A.; DeBiasi, S.; Melone, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol*, **1997**, *14*(1-2), 1-18.
- [113] Low, C.M.; Wee, K.S. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol*, **2010**, *78*(1), 1-11.
- [114] 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.
- [115] Lynch, J.W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*, **2004**, *84*(4), 1051-1095.
- [116] Webb, T.I.; Lynch, J.W. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des*, **2007**, *13*(23), 2350-2367.
- [117] Betz, H.; Laube, B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem*, **2006**, *97*(6), 1600-1610.
- [118] Hosie, A.M.; Wilkins, M.E.; da Silva, H.M.; Smart, T.G. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, **2006**, *444*(7118), 486-489.
- [119] Gee, K.W.; Lan, N.C. Gamma-aminobutyric acidA receptor complexes in rat frontal cortex and spinal cord show differential responses to steroid modulation. *Mol Pharmacol*, **1991**, *40*(6), 995-999.
- [120] Mennerick, S.; He, Y.; Jiang, X.; Manion, B.D.; Wang, M.; Shute, A.; Benz, A.; Evers, A.S.; Covey, D.F.; Zorumski, C.F. Selective antagonism of 5alpha-reduced neurosteroid effects at GABA(A) receptors. *Mol Pharmacol*, **2004**, *65*(5), 1191-1197.
- [121] Morris, K.D.; Moorefield, C.N.; Amin, J. Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol*, **1999**, *56*(4), 752-759.
- [122] Purdy, R.H.; Morrow, A.L.; Blinn, J.R.; Paul, S.M. Synthesis, metabolism, and pharmacological activity of 3 alpha-hydroxy steroids which potentiate GABA-receptor-mediated chloride ion uptake in rat cerebral cortical synaptoneurosomes. *J Med Chem*, **1990**, *33*(6), 1572-1581.
- [123] Zorumski, C.F.; Mennerick, S.; Isenberg, K.E.; Covey, D.F. Potential clinical uses of neuroactive steroids. *Curr Opin Investig Drugs*, **2000**, *1*(3), 360-369.
- [124] Wang, M. Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2011**, *2*, 44.
- [125] Akk, G.; Li, P.; Bracamontes, J.; Reichert, D.E.; Covey, D.F.; Steinbach, J.H. Mutations of the GABA-A receptor alpha1 subunit M1 domain reveal unexpected complexity for modulation by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol*, **2008**, *74*(3), 614-627.
- [126] Li, P.; Bandyopadhyaya, A.K.; Covey, D.F.; Steinbach, J.H.; Akk, G. Hydrogen bonding between the 17beta-substituent of a neurosteroid and the GABA(A) receptor is not obligatory for channel potentiation. *Br J Pharmacol*, **2009**, *158*(5), 1322-1329.
- [127] Burden, P.M.; Ai, T.H.; Lin, H.Q.; Akinci, M.; Costandi, M.; Hambley, T.M.; Johnston, G.A. Chiral derivatives of 2-cyclohexylideneperhydro-4,7-methanoidenes, a novel class of nonsteroidal androgen receptor ligand: synthesis, X-ray analysis, and biological activity. *J Med Chem*, **2000**, *43*(24), 4629-4635.
- [128] Hamilton, N.M. Interaction of steroids with the GABA(A) receptor. *Curr Top Med Chem*, **2002**, *2*(8), 887-902.
- [129] Upasani, R.B.; Yang, K.C.; Acosta-Burrue, M.; Konkoy, C.S.; McLellan, J.A.; Woodward, R.M.; Lan, N.C.; Carter, R.B.; Hawkinson, J.E. 3 alpha-Hydroxy-3 beta-(phenylethynyl)-5 beta-pregnane-20-ones: synthesis and pharmacological activity of neuroactive steroids with high affinity for GABAA receptors. *J Med Chem*, **1997**, *40*(1), 73-84.

- [130] Park-Chung, M.; Malayev, A.; Purdy, R.H.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acid A receptor function through distinct sites. *Brain Res.*, **1999**, 830(1), 72-87.
- [131] Rahman, M.; Lindblad, C.; Johansson, I.M.; Backstrom, T.; Wang, M.D. Neurosteroid modulation of recombinant rat alpha5beta2gamma2L and alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors in *Xenopus* oocyte. *Eur J Pharmacol*, **2006**, 547(1-3), 37-44.
- [132] Belelli, D.; Lambert, J.J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2005**, 6(7), 565-575.
- [133] Chua, H.C.; Chebib, M. GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv Pharmacol*, **2017**, 79, 1-34.
- [134] Whiting, P.J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today*, **2003**, 8(10), 445-450.
- [135] Adkins, C.E.; Pillai, G.V.; Kerby, J.; Bonnert, T.P.; Haldon, C.; McKernan, R.M.; Gonzalez, J.E.; Oades, K.; Whiting, P.J.; Simpson, P.B. alpha4beta3delta GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem*, **2001**, 276(42), 38934-38939.
- [136] Belelli, D.; Casula, A.; Ling, A.; Lambert, J.J. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*, **2002**, 43(4), 651-661.
- [137] Brown, N.; Kerby, J.; Bonnert, T.P.; Whiting, P.J.; Wafford, K.A. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol*, **2002**, 136(7), 965-974.
- [138] Wohlfarth, K.M.; Bianchi, M.T.; Macdonald, R.L. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci*, **2002**, 22(5), 1541-1549.
- [139] Comenencia-Ortiz, E.; Moss, S.J.; Davies, P.A. Phosphorylation of GABAA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions. *Psychopharmacology (Berl)*, **2014**, 231(17), 3453-3465.
- [140] Majewska, M.D.; Harrison, N.L.; Schwartz, R.D.; Barker, J.L.; Paul, S.M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, **1986**, 232(4753), 1004-1007.
- [141] Paradiso, K.; Zhang, J.; Steinbach, J.H. The C terminus of the human nicotinic alpha4beta2 receptor forms a binding site required for potentiation by an estrogenic steroid. *J Neurosci*, **2001**, 21(17), 6561-6568.
- [142] 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.
- [143] Bullock, A.E.; Clark, A.L.; Grady, S.R.; Robinson, S.F.; Slobe, B.S.; Marks, M.J.; Collins, A.C. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem*, **1997**, 68(6), 2412-2423.
- [144] Bertrand, D.; Valera, S.; Bertrand, S.; Ballivet, M.; Rungger, D. Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport*, **1991**, 2(5), 277-280.
- [145] 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.
- [146] Luntz-Leybman, V.; Freund, R.K.; Collins, A.C. 5 alpha-Pregnan-3 alpha-ol-20-one blocks nicotine-induced seizures and enhances paired-pulse inhibition. *Eur J Pharmacol*, **1990**, 185(2-3), 239-242.
- [147] Wu, F.S.; Gibbs, T.T.; Farb, D.H. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol*, **1990**, 37(5), 597-602.
- [148] Wetzell, C.H.; Hermann, B.; Behl, C.; Pestel, E.; Rammes, G.; Zieglansberger, W.; Holsboer, F.; Rupprecht, R. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol*, **1998**, 12(9), 1441-1451.
- [149] Oz, M.; Zhang, L.; Spivak, C.E. Direct noncompetitive inhibition of 5-HT(3) receptor-mediated responses by forskolin and steroids. *Arch Biochem Biophys*, **2002**, 404(2), 293-301.
- [150] Barann, M.; Gothert, M.; Bruss, M.; Bonisch, H. Inhibition by steroids of [14C]-guanidium 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.
- [151] 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.
- [152] Borovska, J.; Vyklicky, V.; Stastna, E.; Kapras, V.; Slavikova, B.; Horak, M.; Chodounska, H.; Vyklicky, L., Jr. Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, **2012**, 166(3), 1069-1083.
- [153] Bowlby, M.R. Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, **1993**, 43(5), 813-819.
- [154] 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.
- [155] 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.
- [156] 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.
- [157] Giuliani, F.A.; Yunes, R.; Mohn, C.E.; Laconi, M.; Rettori, V.; Cabrera, R. Allopregnanolone induces LHRH and glutamate release through NMDA receptor modulation. *Endocrine*, **2011**, 40(1), 21-26.
- [158] 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.
- [159] Bishop, C.V.; Stormshak, F. Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F2alpha secretion in the ovine endometrium. *Endocrinology*, **2006**, 147(2), 937-942.
- [160] Bogacki, M.; Silvia, W.J.; Rekawiecki, R.; Kotwica, J. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F(2alpha) from bovine endometrial tissue. *Biol Reprod*, **2002**, 67(1), 184-188.
- [161] Grazzini, E.; Guillon, G.; Mouillac, B.; Zingg, H.H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, **1998**, 392(6675), 509-512.
- [162] Burger, K.; Fahrenholz, F.; Gimpl, G. Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett*, **1999**, 464(1-2), 25-29.
- [163] Wenz, J.J.; Barrantes, F.J. Steroid structural requirements for stabilizing or disrupting lipid domains. *Biochemistry*, **2003**, 42(48), 14267-14276.
- [164] Gimpl, G.; Wiegand, V.; Burger, K.; Fahrenholz, F. Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function. *Prog Brain Res*, **2002**, 139, 43-55.
- [165] 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.
- [166] Grinevich, V.; Knobloch-Bollmann, H.S.; Eliava, M.; Busnelli, M.; Chini, B. Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. *Biol Psychiatry*, **2016**, 79(3), 155-164.
- [167] Dempsey, J.A.; Olson, E.B.; Skatrud, J.B. Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. *American Physiological Society*, **1986**, *Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Control of Breathing, Part 1, vol. II*, 181/221.
- [168] Saaresranta, T.; Polo, O. Hormones and breathing. *Chest*, **2002**, 122(6), 2165-2182.
- [169] Hasselbach, K.A. Ein Beitrag zur Respirationsphysiologie der Gravität. *Skand. Arch. Physiol.*, **1912**, 27, 1-12.
- [170] Hasselbach, K.A.; Gammeltoft, S.A. Die Neutralität tsregulation des graviden Organismus. *Biochem. Z.*, **1915**, 68, 206-264.
- [171] Jensen, D.; Wolfe, L.A.; Slatkowska, L.; Webb, K.A.; Davies, G.A.; O'Donnell, D.E. Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol*, **2005**, 288(5), R1369-R1375.
- [172] Griffith, F.R.; Pucker, G.W.; Brownell, K.A.; Klein, J.D.; Carmer, M.E. Studies in human physiology, alveolar air and blood gas capacity. *Am. J. Physiol.*, **1929**, 89, 449-470.

- [173] Knobil, E.N., J. D. . *Physiology of Reproduction*. **1994**.
- [174] Macnutt, M.J.; De Souza, M.J.; Tomczak, S.E.; Homer, J.L.; Sheel, A.W. Resting and exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle. *J Appl Physiol (1985)*, **2012**, *112*(5), 737-747.
- [175] Luthi, M.; Roach, D.E.; Beaudin, A.E.; Debert, C.T.; Sheldon, R.S.; Poulin, M.J. Effects of ovarian hormones and aging on respiratory sinus arrhythmia and breathing patterns in women. *Clin Auton Res*, **2008**, *18*(3), 134-144.
- [176] 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.
- [177] Schoene, R.B.; Robertson, H.T.; Pierson, D.J.; Peterson, A.P. Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, **1981**, *50*(6), 1300-1305.
- [178] Dombrov, M.L.; Bonekat, H.W.; Williams, T.J.; Staats, B.A. Exercise performance and ventilatory response in the menstrual cycle. *Med Sci Sports Exerc*, **1987**, *19*(2), 111-117.
- [179] 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.
- [180] 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.
- [181] van Klaveren, R.J.; Demedts, M. Determinants of the hypercapnic and hypoxic response in normal man. *Respir Physiol*, **1998**, *113*(2), 157-165.
- [182] 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.
- [183] 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.
- [184] 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.
- [185] Boukari, R.; Rossignol, O.; Baldy, C.; Marcouiller, F.; Bairam, A.; Joseph, V. 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)*, **2016**, *121*(3), 781-791.
- [186] 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.
- [187] Hilaire, G.; Duron, B. Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol Rev*, **1999**, *79*(2), 325-360.
- [188] Centeno, M.L.; Reddy, A.P.; Smith, L.J.; Sanchez, R.L.; Henderson, J.A.; Sallie, 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 macaques. *Eur J Pharmacol*, **2007**, *555*(1), 67-75.
- [189] Gundlach, C.; Lu, N.Z.; Bethea, C.L. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. *Psychopharmacology (Berl)*, **2002**, *160*(3), 271-282.
- [190] Rand, C.M.; Patwari, P.P.; Rodikova, E.A.; Zhou, L.; Berry-Kravis, E.M.; Wilson, R.J.; Bech-Hansen, T.; Weese-Mayer, D.E. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation: analysis of hypothalamic and autonomic candidate genes. *Pediatr. Res*, **2011**, *70*(4), 375-378.
- [191] 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.
- [192] Gallego, J. Genetic diseases: congenital central hypoventilation, Rett, and Prader-Willi syndromes. *Compr. Physiol*, **2012**, *2*(3), 2255-2279.
- [193] 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.
- [194] 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.
- [195] Nattie, E.E.; Li, A. Retrotrapezoid nucleus lesions decrease phrenic activity and CO₂ sensitivity in rats. *Respir. Physiol*, **1994**, *97*(1), 63-77.
- [196] Dubreuil, V.; Ramanantsoa, N.; Trochet, D.; Vaubourg, V.; Amiel, J.; Gallego, J.; 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.
- [197] Dubreuil, V.; Thoby-Brisson, M.; Rallu, M.; Persson, K.; Pattyn, A.; Birchmeier, C.; 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.
- [198] Ramanantsoa, N.; Matrot, B.; Vardon, G.; Lajard, A.M.; Voituren, N.; Dager, S.; Denjean, A.; Hilaire, G.; Gallego, J. Impaired ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxic stress in newborn phox2b heterozygous knock-out mice. *Front Physiol*, **2011**, *2*, 61.
- [199] Lavezzi, A.M.; Weese-Mayer, D.E.; Yu, M.Y.; Jennings, L.J.; Corna, M.F.; Casale, V.; Oneda, R.; Maturri, L. Developmental alterations of the respiratory human retrotrapezoid nucleus in sudden unexplained fetal and infant death. *Auton Neurosci*, **2012**, *170*(1-2), 12-19.
- [200] Rudzinski, E.; Kapur, R.P. PHOX2B immunolocalization of the candidate human retrotrapezoid nucleus. *Pediatr Dev Pathol*, **2010**, *13*(4), 291-299.
- [201] 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.
- [202] Read, D.J. A clinical method for assessing the ventilatory response to carbon dioxide. *Australas. Ann. Med.*, **1967**, *16*(1), 20-32.
- [203] Li, D.; Chin, C.I.C.; Kato, R.; Ward, S.L.D.; Keens, T.G. Does desogestrel improve ventilatory control in congenital central hypoventilation syndrome? A5194: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013.
- [204] 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.
- [205] Schumacher, M.; Guennoun, R.; Ghoumar, A.; Massaad, C.; Robert, F.; El-Etr, M.; Akwa, Y.; Rajkowski, K.; Baulieu, E.E. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr. Rev*, **2007**, *28*(4), 387-439.
- [206] Ren, J.; Greer, J.J. Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period. *J. Physiol*, **2006**, *574*(Pt 2), 535-546.
- [207] Ballanyi, K. Protective role of neuronal KATP channels in brain hypoxia. *J Exp. Biol*, **2004**, *207*(Pt 18), 3201-3212.
- [208] Lalley, P.M. Responses of phrenic motoneurons of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. *J Physiol*, **1986**, *380*, 349-371.
- [209] Cao, Y.; Matsuyama, K.; Fujito, Y.; Aoki, M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci Res*, **2006**, *56*(3), 322-331.
- [210] 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.
- [211] Ptak, K.; Yamanishi, T.; Aungst, J.; Milescu, L.S.; Zhang, R.; Richerson, G.B.; Smith, J.C. Raphe neurons stimulate respiratory

- circuit activity by multiple mechanisms *via* endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci*, **2009**, *29*(12), 3720-3737.
- [122] 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.
- [123] Suzue, T. Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol*, **1984**, *354*, 173-183.
- [124] Johnson, S.M.; Turner, S.M.; Huxtable, A.G.; Ben-Mabrouk, F. Isolated *in vitro* brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology. *Respir Physiol Neurobiol*, **2012**, *180*(1), 1-7.
- [125] Harada, Y.; Kuno, M.; Wang, Y.Z. Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat *in vitro*. *J Physiol*, **1985**, *368*, 679-693.
- [126] Clarac, F.; Pearlstein, E.; Pflieger, J.F.; Vinay, L. The *in vitro* neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanisms. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **2004**, *190*(5), 343-357.
- [127] Brockhaus, J.; Ballanyi, K.; Smith, J.C.; Richter, D.W. Microenvironment of respiratory neurons in the *in vitro* brainstem-spinal cord of neonatal rats. *J Physiol*, **1993**, *462*, 421-445.
- [128] 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**.
- [129] 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.
- [120] 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.
- [121] Saadani-Makki, F.; Frugiere, A.; Gros, F.; Gaytan, S.; Bodineau, L. Involvement of adenosinergic A1 systems in the occurrence of respiratory perturbations encountered in newborns following an in utero caffeine exposure. a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Neuroscience*, **2004**, *127*(2), 505-518.
- [122] Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Frugiere, A. Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an *in vitro* study in neonatal rat. *Neurosci Lett*, **2000**, *295*(1-2), 67-69.
- [123] Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Frugiere, A. Fos study of ponto-medullary areas involved in the *in vitro* hypoxic respiratory depression. *Neuroreport*, **2001**, *12*(18), 3913-3916.
- [124] Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Sadani-Makki, F.; Bach, V.; Gros, F.; Lebleu, A.; Collin, T.; Frugiere, A. Consequences of in utero caffeine exposure on respiratory output in normoxic and hypoxic conditions and related changes of Fos expression: a study on brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pediatr. Res*, **2003**, *53*(2), 266-273.
- [125] Cayetanot, F.; Bodineau, L.; Frugiere, A. 5-HT acting on 5-HT_{1/2} receptors does not participate in the *in vitro* hypoxic respiratory depression. *Neurosci Res*, **2001**, *41*(1), 71-78.
- [126] 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.
- [127] Gestreau, C.; Heitzmann, D.; Thomas, J.; Dubreuil, V.; Bandulik, S.; Reichold, M.; Bendahhou, S.; Pierson, P.; Sterner, C.; Peyronnet-Roux, J.; Benfriha, C.; Tegmeier, I.; Ehnes, H.; Georgieff, M.; Lesage, F.; Brunet, J.F.; Goridis, C.; Warth, R.; Barhanin, J. Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, *107*(5), 2325-2330.
- [128] Okada, Y.; Muckenhoff, K.; Holtermann, G.; Acker, H.; Scheid, P. Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respiration Physiology*, **1993**, *93*(3), 315-326.
- [129] Harada, Y.; Wang, Y.Z.; Kuno, M. Central chemosensitivity to H⁺ and CO₂ in the rat respiratory center *in vitro*. *Brain Res*, **1985**, *333*(2), 336-339.
- [230] Oyamada, Y.; Ballantyne, D.; Muckenhoff, K.; Scheid, P. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurons in the *in vitro* brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*, **1998**, *513* (Pt 2), 381-398.
- [231] Johnson, S.M.; Haxhiu, M.A.; Richerson, G.B. GFP-expressing locus coeruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J Appl Physiol* (1985), **2008**, *105*(4), 1301-1311.
- [232] Peano, C.A.; Shonis, C.A.; Dillon, G.H.; Waldrop, T.G. Hypothalamic GABAergic mechanism involved in respiratory response to hypercapnia. *Brain Res. Bull.*, **1992**, *28*(1), 107-113.
- [233] Jin, X.; Zhong, W.; Jiang, C. Time-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by allopregnanolone in locus coeruleus neurons of Mecp2-null mice. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **2013**, *305*(11), C1151-C1160.
- [234] 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.
- [235] Bartlett, D.; Tenney, S.M. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol*, **1970**, *10*(3), 384-395.
- [236] 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.
- [237] Funk, G.D.; Johnson, S.M.; Smith, J.C.; Dong, X.W.; Lai, J.; Feldman, J.L. Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. *J Neurophysiol*, **1997**, *78*(3), 1414-1420.
- [238] Greer, J.J.; Smith, J.C.; Feldman, J.L. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J Physiol*, **1991**, *437*, 727-749.
- [239] Haji, A.; Takeda, R.; Okazaki, M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *86*(3), 277-304.
- [240] 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.
- [241] Loria, C.J.; Stevens, A.M.; Crummy, E.; Casadesus, G.; Jacono, F.J.; Dick, T.E.; Siegel, R.E. Respiratory and behavioral dysfunction following loss of the GABA_A receptor alpha4 subunit. *Brain Behav*, **2013**, *3*(2), 104-113.
- [242] Hilaire, G.; Bou, C.; Monteau, R. Serotonergic modulation of central respiratory activity in the neonatal mouse: an *in vitro* study. *Eur. J Pharmacol*, **1997**, *329*(2-3), 115-120.
- [243] Hilaire, G.; Monteau, R.; Gauthier, P.; Rega, P.; Morin, D. Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Neurosci. Lett*, **1990**, *111*(1-2), 133-138.
- [244] Morin, D.; Monteau, R.; Hilaire, G. 5-Hydroxytryptamine modulates central respiratory activity in the newborn rat: an *in vitro* study. *Eur J Pharmacol*, **1991**, *192*(1), 89-95.
- [245] Morin, D.; Monteau, R.; Hilaire, G. Serotonin and cervical respiratory motoneurons: intracellular study in the newborn rat brainstem-spinal cord preparation. *Exp Brain Res*, **1991**, *84*(1), 229-232.
- [246] 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.
- [247] 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.
- [248] Inyushkin, A.N.; Merkulova, N.A.; Orlova, A.O.; Inyushkina, E.M. Local GABAergic modulation of the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus. *Neurosci Behav Physiol*, **2010**, *40*(8), 885-893.
- [249] Lovick, T.A. Involvement of GABA in medullary raphe-evoked modulation of neuronal activity in the periaqueductal grey matter in the rat. *Exp Brain Res*, **2001**, *137*(2), 214-218.
- [250] 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.
- [251] 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.
- [252] Gao, B.; Fritschy, J.M.; Benke, D.; Mohler, H. Neuron-specific expression of GABAA-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience*, **1993**, *54*(4), 881-892.
- [253] Cerpa, V.J.; Aylwin Mde, L.; Beltran-Castillo, S.; Bravo, E.U.; Llona, I.R.; Richerson, 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.
- [254] Morin, D.; Hennequin, S.; Monteau, R.; Hilaire, G. Serotonergic influences on central respiratory activity: an *in vitro* study in the newborn rat. *Brain Res*, **1990**, *535*(2), 281-287.
- [255] 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.
- [256] Bodineau, L.; Cayetanot, F.; Marlot, D.; Collin, T.; Gros, F.; Frugiere, A. Endogenous 5-HT(1/2) systems and the newborn rat respiratory control. A comparative *in vivo* and *in vitro* study. *Respir. Physiol Neurobiol*, **2004**, *141*(1), 47-57.
- [257] Robichaud, M.; Debonnel, G. Modulation of the firing activity of female dorsal raphe nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids. *J Endocrinol*, **2004**, *182*(1), 11-21.

Partie 2: Implication de l'érythropoïétine dans la ventilation en hypercapnie

Un des objectifs de ce doctorat était de caractériser l'effet de l'Epo sur la CCR en hypercapnie et de déterminer ses mécanismes d'action. Pour cela, nous avons cherché à mettre en évidence les effets d'une déficience en Epo sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie à l'aide de souris transgéniques Epo-TAg^h. Afin de mener à bien cette étude, nous avons évalué les effets d'une déficience en Epo sur :

- les variables ventilatoires en hypercapnie *in vivo* de souris adultes Epo-TAg^h ;
- l'activité neuronale au sein de structures encéphaliques connues pour leur rôle dans la régulation de la ventilation sur des encéphales issus d'adultes Epo-TAg^h soumis à une hypercapnie *in vivo* ;
- la CCR en acidose métabolique (modélisation de l'hypercapnie *in vivo*) des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris Epo-TAg^h nouveau-nées.

Dans l'équipe du Dr Jorge Soliz² avec laquelle nous avons collaboré, la CCR a été également évaluée sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris Tg21 nouveau-nées, des animaux sur-exprimant l'Epo au niveau central. La forme soluble du récepteur à l'Epo, un antagoniste naturel de l'Epo ou des inhibiteurs de la voie ERK1/2/Akt, voie de signalisation érythropoïétinergique, ont été ajoutés au LCRA de superfusion de ces préparations.

Les résultats obtenus ont donné lieu à un article et un manuscrit à soumettre prochainement. Ces travaux vous seront présentés ci-dessous et les principaux éléments seront résumés en amont.

² Université Laval, Faculté de Médecine, Centre de Recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Département de Pédiatrie, Québec, QC, Canada.

I. Article publié : Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺ central chemosensitivity in postnatal mice

Certains travaux de la partie 2 des résultats généraux ont donné lieu à :

- 1 article de recherche dans *Respiratory Physiology & Neurobiology*

Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺ central chemosensitivity in postnatal mice

Laouafa S, **Perrin-Terrin AS**, Jeton F, Elliot-Portal E, Tam R, Bodineau L, Voituron N*, Soliz J*; * Co derniers auteurs

Respiratory Physiology & Neurobiology, 2017, 242, p.73-79

1. Résumé

L'altération pharmacologique, mais non génétique, de l'Epo neuronale modifie la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ chez les souris au stade post-natal

Objectif

Étudier l'implication de l'Epo dans l'adaptation de la CCR à un challenge CO₂/H⁺ (modélisant l'hypercapnie *in vivo*) sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolées de souris nouveau-née au 4^e jour post-natal (P4). A ce stade, la CCR en condition basale est stimulée de manière dose-dépendante par l'Epo (Khemiri et al., 2012) et la stimulation des chémorécepteurs centraux sensibles au CO₂/H⁺ est essentielle à la ventilation (Ramanantsoa et al., 2011).

Contexte scientifique

L'Erythropoïétine (Epo) est une cytokine dont les premières fonctions ont été associées à la réponse du système cardiovasculaire à l'hypoxie et à l'ischémie en contrôlant le processus de l'érythropoïèse qui assure la production et la maturation des lignées cellulaires, dérivant de cellules souches hématopoïétiques, qui donnent les érythrocytes (Koury & Bondurant, 1990). Cependant elle exerce également de nombreux autres effets physiologiques et notamment au sein du système nerveux central où elle a une action neuroprotectrice importante par la stimulation de la neurogenèse et de l'angiogenèse cérébrale mais aussi via des effets anti-apoptotique, anti-inflammatoire et anti-cytotoxique (Byts & Siren, 2009, Wang et al., 2014, Blixt *et al.*, 2018).

Récemment, l'Epo a été décrite comme jouant un rôle dans la ventilation en normoxie et dans la modulation de la ventilation en réponse à l'hypoxie, à la fois au stade post-natal et à l'âge adulte chez la souris (Khemiri et al., 2012, Macarlupu et al., 2006, Pichon et al., 2016, Voituron et al., 2014, Soliz et al., 2005, El Hasnaoui-Saadani *et al.*, 2009, Caravagna & Soliz, 2015, Ballot et al., 2015a). En effet, l'Epo et son récepteur Epo-R sont exprimés dans le NTS, les noyaux du raphés ainsi que la surface ventro-latérale du bulbe rachidien comprenant le pré-BötC et le RTN/pFRG (Soliz et al., 2005), des structures médiatrices majeures dans l'adaptation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Teppema *et al.*, 1994, Zanella et al., 2005, Erickson & Millhorn, 1994, Wakai *et al.*, 2015, Richerson, 1995, Depuy et al., 2011, Dias et al., 2007, Bodineau & Larnicol, 2001, Berquin et al., 2000a, Berquin et al., 2000b, Takakura et al., 2006b, Mulkey et al., 2004, Finley & Katz, 1992). Ces structures sont également impliquées dans l'adaptation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, ce qui a amené à penser que l'Epo pourrait aussi intervenir sur la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Les premières études montrent que la surexpression cérébrale d'Epo n'affecte pas la

chémosensibilité centrale CO_2/H^+ chez les souris transgéniques adultes surexprimant l'Epo uniquement dans le cerveau (Tg21) au 10^e jours post-natal (Laouafa et al., 2016) et chez des souris adultes recevant une injection intra-cisternale de l'isoforme soluble de l'Epo-R (sEpo-R), un antagoniste naturel de l'Epo (Ballot et al., 2015b). Cependant la chémosensibilité au CO_2/H^+ dépend chez les mammifères de la maturation du réseau respiratoire et donc de l'âge (Rigatto et al., 1975, Frantz et al., 1976, Abu-Shaweesh *et al.*, 1999, Bissonnette & Knopp, 2004b, Putnam et al., 2005). La stimulation des chémorécepteurs centraux sensibles au CO_2/H^+ est considérée comme essentielle à la respiration à l'âge néonatal (Ramanantsoa et al., 2011). En conséquence, nous avons voulu dans cette étude apprécier si l'Epo module la réponse ventilatoire centrale au CO_2/H^+ chez la souris à des âges antérieurs à P10.

Resultats et discussion

- La sur- ou sous- expression d'Epo cérébrale n'a pas modifié la CCR en réponse à une hypercapnie

Nous avons utilisé des préparations *ex vivo* de SNC isolé de souris nouveau-nées (P4) transgéniques soit surexprimant l'Epo spécifiquement dans l'encéphale (Tg21) (Wiessner et al., 2001), soit sous-exprimant l'Epo plasmatique et cérébrale (Epo-TAg^h) (El Hasnaoui-Saadani et al., 2009). Ces préparations de SNC isolé ont été superfusées en continu avec du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) maintenu à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, dioxygéné par un mélange gazeux (Tg21 : 5% CO_2 ; 21% O_2 ; 74% N_2 et Epo-TAg^h : 95% O_2 ; 5% CO_2). Elles ont été soumises à une acidose induite soit par une augmentation de CO_2 (30% CO_2 ; 21% O_2 ; 49% N_2 ; final pH 7,20) pour les souris Tg21 soit par une élévation des ions H^+ (21nM abaissé à 15mM NaHCO_3 dans le LCRa; final pH 7,23) pour les souris Epo-TAg^h. Ce sont là deux modélisations de l'hypercapnie *in vivo*. Comme les niveaux de CO_2 et le pH sont étroitement corrélés (équation de Henderson-Hasselbalch), nos résultats sont facilement comparables entre eux. Les stimulations d'acidose ont été effectuées sur une période de 30 minutes après une période de stabilisation en normopH modélisant les conditions de normocapnie *in vivo*. L'activité rythmique au niveau de la 4^e racine cervicale ventrale (C4) de ces préparations a été enregistrée de façon à étudier la fréquence (f_R) et l'amplitude des bouffées inspiratoires (IntC4) dans les différentes conditions expérimentales testées. Cette activité électrique enregistrée est classiquement assimilée à la CCR (Suzue, 1984, Ren & Greer, 2006a).

La CCR enregistrée en normocapnie n'était pas différente entre les souris transgéniques et les souris témoins ni entre les deux types de souris transgéniques elles-mêmes. En revanche, pour les deux types de souris transgéniques, une augmentation de la CCR a été observée en condition d'acidose par rapport à la normocapnie mais cette augmentation n'était significativement pas différente de celle observée chez les souris témoins. Cette augmentation résultait d'une augmentation f_R et non d'une augmentation de l'IntC4. L'Epo semble ne pas

intervenir dans la CCR en condition de normopH et d'acidose dans nos conditions expérimentales.

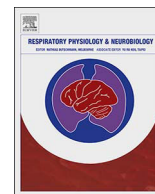
- **L'inhibition pharmacologique centrale de la signalisation érythropoïétinergique diminue la CCR en hypercapnie**

Afin de mieux caractériser l'impact de l'Epo sur l'adaptation de la CCR à l'acidose, la forme soluble du récepteur à l'Epo, un antagoniste naturel de l'Epo ou des inhibiteurs de la voie ERK1/2/Akt, voie de signalisation érythropoïétinergique, ont été ajoutés au LCRA de superfusion des préparations *ex vivo* des souris Tg21.

L'immersion des préparations *ex vivo* de souris Tg21 dans un LCRA contenant du sEpoR ou des inhibiteurs ERK1/2/Akt ne diminuait pas la CCR en normopH, mais diminuait de 50% l'IntC4 en réponse à l'acidose induite par le CO₂, tandis que l'augmentation de la f_R n'était pas altérée.

Conclusions

Nos résultats suggèrent que la sur- ou sous- expression d'Epo ne semble pas moduler la CCR ni en conditions basales ni en réponse à l'augmentation du taux de CO₂ ou la diminution du pH au stade P4. L'absence de changement de phénotype ventilatoire des souris transgéniques Epo-TAg^h et Tg21 par rapport aux témoins pourrait s'expliquer par la mise en place de mécanismes compensatoires impliquant notamment la modulation de l'activité de l'Epo par le sEpo-R, suggérant que plus que la concentration en Epo plasmatique ou cérébrale, c'est le ratio Epo/sEpo-R qui constitue un mécanisme de régulation de la ventilation. Soutenant cette hypothèse, l'antagonisation aiguë de la signalisation Epo par sEpo-R diminue la réponse respiratoire à l'acidose au stade P4. Il est intéressant de noter que cet effet n'était pas observé à des stades plus tardifs (P10 et adulte) (Laouafa et al., 2016). Ces travaux expérimentaux mettent en évidence l'intérêt de la voie érythropoïétinergique dans des pathologies caractérisées par une insensibilité au CO₂ telles que les syndromes d'hypoventilation centrale (CHS). L'ensemble des données suggère que la normalisation du ratio Epo/sEpo-R pourrait constituer un mécanisme potentiel dans le traitement de ces pathologies.



Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺ central chemosensitivity in postnatal mice



Sofien Laouafa^{a,e}, Anne-Sophie Perrin-Terrin^{c,d}, Florine Jeton^c, Elizabeth Elliot-Portal^{a,b}, Rose Tam^a, Laurence Bodineau^d, Nicolas Voituron^{c,1}, Jorge Soliz^{a,b,*,1}

^a Université Laval, Faculté de Médecine, Centre de Recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Département de Pédiatrie, Québec, QC, Canada

^b Molecular biology and Biotechnology Institute, Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia

^c Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Laboratoire "Hypoxie et poumons", EA 2363, 93017 Bobigny, France

^d Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75013, Paris, France

^e LEHNA, UMR CNRS 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université de Lyon, Université Lyon 1, ENTPE, 6 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Newborn mice
Erythropoietin
Soluble erythropoietin receptor
Respiration
Central chemosensitivity
Hypercapnia
ERK/Akt

ABSTRACT

Cerebral erythropoietin (Epo) plays a crucial role for respiratory control in newborn rodents. We showed previously that soluble Epo receptor (sEpoR: an Epo antagonist) reduces basal ventilation and hypoxic hyperventilation at postnatal day 10 (P10) and in adult mice. However, at these ages (P10 and adulthood), Epo had no effect on central chemosensitivity. Nevertheless, it is known that the sensitivity to CO₂/H⁺ during the mammalian respiratory network maturation process is age-dependent. Accordingly, in this study we wanted to test the hypothesis that cerebral Epo is involved in the breathing stimulation induced by the activation of central CO₂/H⁺ chemoreceptors at earlier postnatal ages. To this end, *en bloc* brainstem-spinal cord preparations were obtained from P4 mice and the fictive breathing response to CO₂-induced acidosis or metabolic acidosis was analyzed. This age (P4) was chosen because previous research from our laboratory showed that Epo altered (in a dose- and time-dependent manner) the fictive ventilation elicited in brainstem-spinal cord preparations. Moreover, as it was observed that peripheral chemoreceptors determined the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂, the use of this technique restricts our observations to central modulation. Our results did not show differences between preparations from control and transgenic animals (Tg21: overexpressing cerebral Epo; Epo-TAg^h: cerebral Epo deficient mice). However, when Tg21 brainstem preparations were incubated for 1 h with sEpoR, or with inhibitors of ERK/Akt (thus blocking the activation of the Epo molecular pathway), the fictive breathing response to CO₂-induced acidosis was blunted. Our data suggest that variation of the Epo/sEpoR ratio is central to breathing modulation during CO₂ challenges, and calls attention to clinical perspectives based on the use of Epo drugs at birth in hypoventilation cases.

1. Introduction

It has become clear over the last decade that erythropoietin (Epo) is extensively produced in the brain (by neurons and astrocytes) (Rabie and Marti, 2008). Moreover, the expression of Epo and its receptor (EpoR) in rodent (Knabe et al., 2004) and human (Juul et al., 1998) brains starts during early gestation (1 week and 5 weeks, respectively) and is maintained (albeit with modulated variations) throughout life. Accordingly, we now know that Epo plays a critical role in the development, maintenance, protection and repair of the nervous system

(Chen et al., 2007; Kumral et al., 2011; Silva et al., 1996; Sola et al., 2005; Yu et al., 2002). Research from our laboratories also contributed to this new concept of Epo. By using transgenic mice showing over- or deficient-expression of cerebral Epo, we reported altered modulation of basal ventilation and hypoxic hyperventilation, both at postnatal and adult ages (Ballot et al., 2015a; Caravagna et al., 2015; El Hasnaoui-Saadani et al., 2009; Khemiri et al., 2011; Macarlupu et al., 2006; Pichon et al., 2016b; Soliz et al., 2005; Voituron et al., 2014). Moreover, the basal ventilation and hypoxic ventilatory response were also drastically reduced (by about 50%) when the Epo/sEpoR ratio was

* Corresponding author at: Faculté de Médecine, Université Laval, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725 chemin Ste-Foy, Québec (Québec), G1V 4G5 Canada.

E-mail address: jorge.soliz@criucpq.ulaval.ca (J. Soliz).

¹ Both senior authors contributed equally to this work.

altered by injecting soluble EpoR (sEpoR, the natural competitive antagonist of Epo) in the cisterna magna (intra-cisternal injection) of WT mice (Ballot et al., 2015b). In line with these findings, ubiquitous expression of Epo and EpoR were found in brainstem areas controlling ventilation, including the preBötzinger complex, the nucleus tractus solitarius, and catecholaminergic groups of the brainstem (Soliz et al., 2005).

Taking into account all these results, and keeping in mind that the brainstem is the main structure containing the CO_2/H^+ chemosensors (Guyenet et al., 2010; Guyenet et al., 2008; Nattie, 1999), it was surprising to find that cerebral Epo does not affect central CO_2/H^+ chemosensitivity in mice. Previous studies from our laboratory showed that the hypercapnic ventilatory response was unaffected in postnatal day 10 (P10) and adult mice receiving an intra-cisternal injection of sEpoR (Ballot et al., 2015b). Similarly, the hypercapnic ventilatory response was found to be unaffected in adult transgenic mice over-expressing Epo only in the brain (Tg21) (Laouafa et al., 2016a). It is important to recall, however, that the sensitivity to CO_2/H^+ during maturation of the mammalian respiratory network is age-dependent (Abu-Shaweesh et al., 1985; Bissonnette and Knopp, 2004; Frantz et al., 1976; Putnam et al., 2005; Rigatto et al., 1975). In fact, the stimulation of central CO_2/H^+ chemoreceptors is considered essential for breathing at neonatal ages (Ramanantsoa et al., 2011), and there are diseases such as congenital central hypoventilation syndrome (Weese-Mayer et al., 2010) characterized by a lack of ventilatory response to inhaled CO_2 and elevated PCO_2 . Accordingly, in this study we wanted to investigate in mice whether cerebral Epo modulates the central ventilatory response to CO_2/H^+ at ages earlier than P10. To this aim, we used P4 mice showing over- and deficient-expression of cerebral Epo. This age was chosen because previous research from our laboratory showed that at P4 Epo alters (in a dose- and time-dependent manner) the fictive breathing in mice (Khemiri et al., 2011). Moreover, as it was reported that peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO_2 (hyperadditive effect; (Smith et al., 2015)), experiments were performed on brainstem-spinal cord preparations to restrict observations to the medullary CO_2/H^+ chemoreceptors. After dissection, preparations were exposed to CO_2 -induced acidosis or metabolic acidosis as previously described by our lab (Joubert et al., 2016; Voituron et al., 2010a; Voituron et al., 2010b). Experiments challenging the pharmacological decrease of the Epo availability or the restriction of Epo molecular signaling were also performed on these preparations. Interestingly, our results showed that pharmacological, but not genetic, modulation of Epo altered the postnatal central CO_2/pH chemosensitivity at postnatal day P4, a period during which the respiratory control centers of mice are actively completing development and maturation (Viemari et al., 2003).

2. Material and methods

2.1. Animals

The transgenic Tg21 mouse strain that overexpresses Epo in the brain was obtained by a generous donation from Professor Max Gassmann, University of Zurich, Switzerland. A detailed description of the Tg21 strain was reported previously (Ruschitzka et al., 2000; Wiessner et al., 2001). In brief, Tg21 mice were created from the C57BL/6 mouse line. In our laboratory, Tg21 heterozygous mice were backcrossed with C57BL/6 mice for more than six generations to obtain the corresponding control mice used in this study. For the experimentation only male Tg21 homozygotes were used.

Epo deficient (Epo-TAg^h) mice present a targeted disruption in the 5' untranslated region of the Epo gene that reduces whole body Epo expression (Binley et al., 2002). A detailed description of the Epo-TAg^h strain was reported previously (Pichon et al., 2016a). In brief, the Epo-TAg^h mice showed an Epo concentration of about 50 pg/ml (WT 150 pg/ml) in plasma, and 0.10 pg/mg (WT 0.40 pg/mg) in the brain

(El Hasnaoui-Saadani et al., 2009).

All mice were housed and bred in a room maintained at constant temperature and humidity on a 12-h light cycle (07:30–19:30). Food and tap water were provided ad libitum. Animal experiments with Tg21 mice were approved by the Laval University Animal Ethics Committee (Protocol #10-085-2) and carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU and the Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical journals (URM). Experimental protocols for Epo-TAg^h mice were approved by the Ethics Committee for Animal Experiment Charles Darwin (Ce5/2011/05), done in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and conducted in accordance with the French legislation for animal care.

2.2. In vitro brainstem–spinal cord preparations

Experiments were performed on isolated *en bloc* brainstem–spinal cord preparations obtained from mice at P4 ($n = 10$ –11/group). Newborns were cryoanesthetized by total immersion in ice for 4–5 min (Danneman et al., 1997). As previously described (Smith et al., 1990; Viemari et al., 2003), the brainstem–spinal cord was isolated from the brain, and the pons was subsequently removed from the preparation (Khemiri et al., 2011; Viemari and Hilaire, 2002). Inhibition from the pons region over medullary network activity in mice is strong, making removal of the pons necessary to allow spontaneous activity in the respiratory network (Smith et al., 1990; Viemari et al., 2003) 2003). The preparation was superfused in a recording chamber with artificial cerebrospinal fluid (aCSF: 129 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.26 mM CaCl_2 , 1.15 mM MgCl_2 , 21.0 mM NaHCO_3 , 0.58 mM NaH_2PO_4 , and 30.0 mM glucose; final pH value in gassed aCSF, 7.3–7.4) bubbled with carbogen (95% O_2 , 5% CO_2). Temperature was maintained at 26°C (Temperature Controller TC-324B, Warner Instruments, Hamden, CT).

2.3. Electrophysiological recordings

Electrophysiological recordings were obtained according to a previously described protocol (Belzile et al., 2007; Khemiri et al., 2011; Kinkead et al., 2002). Respiratory-related activity of phrenic motoneuron axons of the C4 ventral root were recorded using a suction electrode (model 573000; A-M Systems, Everett, WA) after a superfusion equilibration period of 20 min, allowing the signal to reach a steady-state. The signal was amplified (gain = 10,000) and filtered (low cut-off, 10 Hz; high cut-off, 5 kHz) using a differential AC amplifier (model 1700; A-M Systems, Everett, WA, in Canada; GRASS P 511G, in France). Raw signals were integrated using a Paynter filter (Moving Averages model MA- 821; CWE, Ardmore, PA in Canada; or a custom-made Channel Integrator, in France), and recorded in a digitized form with a data acquisition system (model DI-720; Dataq Instruments, Akron, OH or CED, Cambridge, UK). The sampling rate for the analog-digital conversion of the raw signal was 2.5 kHz.

2.4. CO_2 -induced acidosis versus metabolic acidosis

Two different forms of acidosis were used in this study: CO_2 -induced and metabolic (see detailed protocol below). The reason for this was that similar studies investigating the impact of cerebral Epo in the neural control of ventilation at P4 were being performed independently (and at the same time) in two different lab teams. Specifically, CO_2 -induced acidosis was used to perform experiments in Tg21 mice (overexpressing Epo in the brain) in Canada, while metabolic acidosis was used to perform experiments in EpoTAg^h mice (showing deficient expression of Epo in the brain), in France. As the results obtained individually in both labs were complementary and arrive at the same conclusion, we decided to report them together in one manuscript.

2.4.1. Experimental protocol for stimulation of the CO_2/H^+ sensing cells

We used two standard approaches for activating the CO_2/H^+ sensing cells *i.e.* elevation of the CO_2 fraction in the gas mixture bubbling the aCSF (Soliz et al., 2016); in Canada) or a decreased pH by enhancement of the $[\text{H}^+]$ (Joubert et al., 2016; Voituron et al., 2010b); in France). As CO_2 levels and pH are closely correlated (Henderson-Hasselbalch equation), our results are easily comparable as classically demonstrated (Okada et al., 1993).

Baseline respiratory values were first determined during 10 mins by perfusing preparations with an aCSF solution equilibrated with carbogen (5% CO_2 , 21% O_2 in N_2). Then, CO_2 -induced acidosis (in Tg21 mice) was achieved by perfusing preparations with an aCSF solution equilibrated with a hypercapnic gas mixture (30% CO_2 , 21% O_2 , in N_2 ; final pH 7.20). Metabolic acidosis (in Epo-TAG^h mice) was achieved by perfusing preparations with an aCSF solution equilibrated with 15.0–21.0 mM of NaHCO_3 (final pH 7.23; (Voituron et al., 2010b)). The signal was recorded for 10 mins under acidosis conditions, and then preparations were returned to baseline conditions for an additional 10 mins.

2.5. Pharmacological treatment of brainstem-spinal cord preparations

The brainstem-spinal cord preparations of Tg21 mice were incubated for 60 mins either with sEpoR (Sigma, Oakville, ON, Canada) or ERK1/2/Akt inhibitors (UO-126 and LY294002 respectively; Sigma, Oakville, ON, Canada). Subsequently, the experimental protocol for CO_2 -induced acidosis/hypercapnia was applied (as described above).

2.6. Statistical analysis

The frequency and amplitude of the integrated discharges recorded from the C4 root were calculated every minute during a 10-min period for basal, CO_2 -induced acidosis/hypercapnia and metabolic acidosis conditions. Neural ventilation was estimated as estimated as (frequency x amplitude)/100. Experiments were repeated under standardized conditions using preparations from mice coming from at least 3 different litters. For each group and condition, the amplitude of the signal was expressed as a percentage of the corresponding baseline. Frequency and amplitude values were averaged minute per minute and the results expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted by performing two-way ANOVAs followed by Fisher's PLSD post hoc tests on Prism 6 software. The threshold of significance (*p*) was fixed at 0.05.

3. Results

3.1. Overexpression of cerebral epo in tg21 mice did not alter the fictive breathing response to CO_2 -induced acidosis

The neural activity from the C4 root was recorded in brainstem-spinal cord preparations of control and Tg21 mice. The basal activity was not different between strains. Moreover, while the CO_2 -induced acidosis/hypercapnia stimulus significantly increased the fictive breathing frequency and neural ventilation (but not amplitude) in preparations of both strains (frequency: WT-Tg21 from 5.8 ± 0.7 to 10.8 ± 0.4 ; Tg21 from 6.2 ± 0.3 to 9.7 ± 0.6 & neural ventilation: WT-Tg21 from 100.0 ± 11.8 to 193.5 ± 15.1 ; Tg21 from 100.0 ± 6.2 to 155.4 ± 9.1), no significant differences in fictive breathing frequency, amplitude or neural ventilation were observed between control and Tg21 groups (Fig. 1A–D).

3.2. Abnormally low expression of cerebral epo in Epo-TAG^h mice did not alter the fictive breathing response to metabolic acidosis

Recordings of brainstem-spinal cord C4 root activity from control and Epo-TAG^h mice under basal conditions did not show differences between groups. Furthermore, the metabolic-induced acidosis signifi-

cantly increased the fictive breathing frequency and neural ventilation (but not amplitude) in preparations of both strains without differences between control and Epo-TAG^h mice (frequency: WT- Epo-TAG^h from 5.6 ± 0.5 to 9.1 ± 1.3 ; Epo-TAG^h from 6.9 ± 1.3 to 10.1 ± 1.6 & neural ventilation: WT- Epo-TAG^h from 108.8 ± 13.1 to 172.8 ± 26.6 ; Epo-TAG^h from 100.0 ± 21.2 to 150.3 ± 29.4) (Fig. 2A–D).

3.3. The pharmacological inhibition of neural epo signalling decreases the fictive breathing response to CO_2 -induced acidosis

The pharmacological inhibition of neural Epo signalling in brainstem-spinal cord preparations of Tg21 mice was performed by using sEpoR or inhibitors of ERK/Akt. While baseline fictive breathing frequency, amplitude and neural ventilation activity were not altered, exposure to CO_2 -induced acidosis/hypercapnia resulted in a significant decrease of the neural ventilation (Tg21-sEpoR: from 100.0 ± 20.6 to 111.7 ± 41.1 ; & Tg21-ERK/Akt inhibitors: from 100.8 ± 23.8 to 112.3 ± 20.3) (Fig. 3A–D). This effect of CO_2 -induced acidosis/hypercapnia was due to a significant decrease of the amplitude (Tg21-sEpoR: from 100.0 ± 17.1 to 47.4 ± 11.0 ; & Tg21-ERK/Akt inhibitors: from 104.6 ± 10.6 to 54.9 ± 8.4) (Fig. 3C), rather than fictive breathing frequency (Tg21-sEpoR: from 4.3 ± 0.21 to 10.0 ± 1.7 ; & Tg21-ERK/Akt inhibitors: from 4.3 ± 0.8 to 8.4 ± 1.0) (Fig. 3B).

4. Discussion

In the present study we have investigated the potential impact of Epo in the regulation of central chemosensory stimulation (by CO_2/H^+) in 4 day old mice (P4). The fictive breathing of brainstem-spinal cord preparations was recorded by using the “en bloc” electrophysiology technique (Suzue, 1984). In line with previous investigations made at later stages of development (Ballot et al., 2015b; Laouafa et al., 2016a), we found that at P4 (i) Epo overexpression in the brain of transgenic Tg21 mice does not alter the central ventilatory drive response to CO_2 -induced acidosis/hypercapnia, (ii) cerebral Epo deficiency in Epo-TAG^h mice does not alter the central ventilatory drive response to metabolic acidosis. Remarkably however, (iii) both the antagonization of endogenous neural Epo (by sEpoR) and the blockade of Epo's molecular pathway (by inhibitors of ERK and Akt), significantly decreases the central ventilatory drive response to CO_2/H^+ .

Our studies were performed in mice at postnatal age P4. Apart from technical considerations showing that superfusion of brainstem-spinal cord preparations of animals older than P4 becomes inefficient, this age was chosen because we previously reported that, at P4, Epo alters the fictive ventilation generated by the central respiratory command of WT (Khemiri et al., 2011), and Tg21 (Caravagna et al., 2014) mice. Moreover, while Epo overexpression in Tg21 mice is already present at P1 (Caravagna et al., 2015), the expression of its receptor (EpoR) decreases from postnatal ages P7 to P15, most probably due to compensatory downregulation resulting from Epo overstimulation (Caravagna et al., 2015). In fact, *in vivo* ventilatory responses of Tg21 mice at these ages was reduced or unchanged in comparison to control animals (Caravagna et al., 2015).

Three key observations encouraged us to perform this study: (i) the stimulation of central CO_2/H^+ chemoreceptors at early ages is essential for breathing (Ramanantsoa et al., 2011), (ii) the central sensitivity to CO_2/H^+ during the maturation of the mammalian respiratory network is age-dependent (Abu-Shaweesh et al., 1985; Bissonnette and Knopp, 2004; Frantz et al., 1976; Putnam et al., 2005; Rigatto et al., 1975), and (iii) Epo has a strong impact on the development and maturation of the neural control system (Juul et al., 1998; Kumral et al., 2011; Shingo et al., 2001). Accordingly, in the present study we wanted to investigate whether cerebral Epo modulates the central ventilatory response to CO_2/H^+ at ages earlier than P10. Interestingly, our results suggested

Brainstem-spinal cord preparations of Tg21 mice exposed to hypercapnia

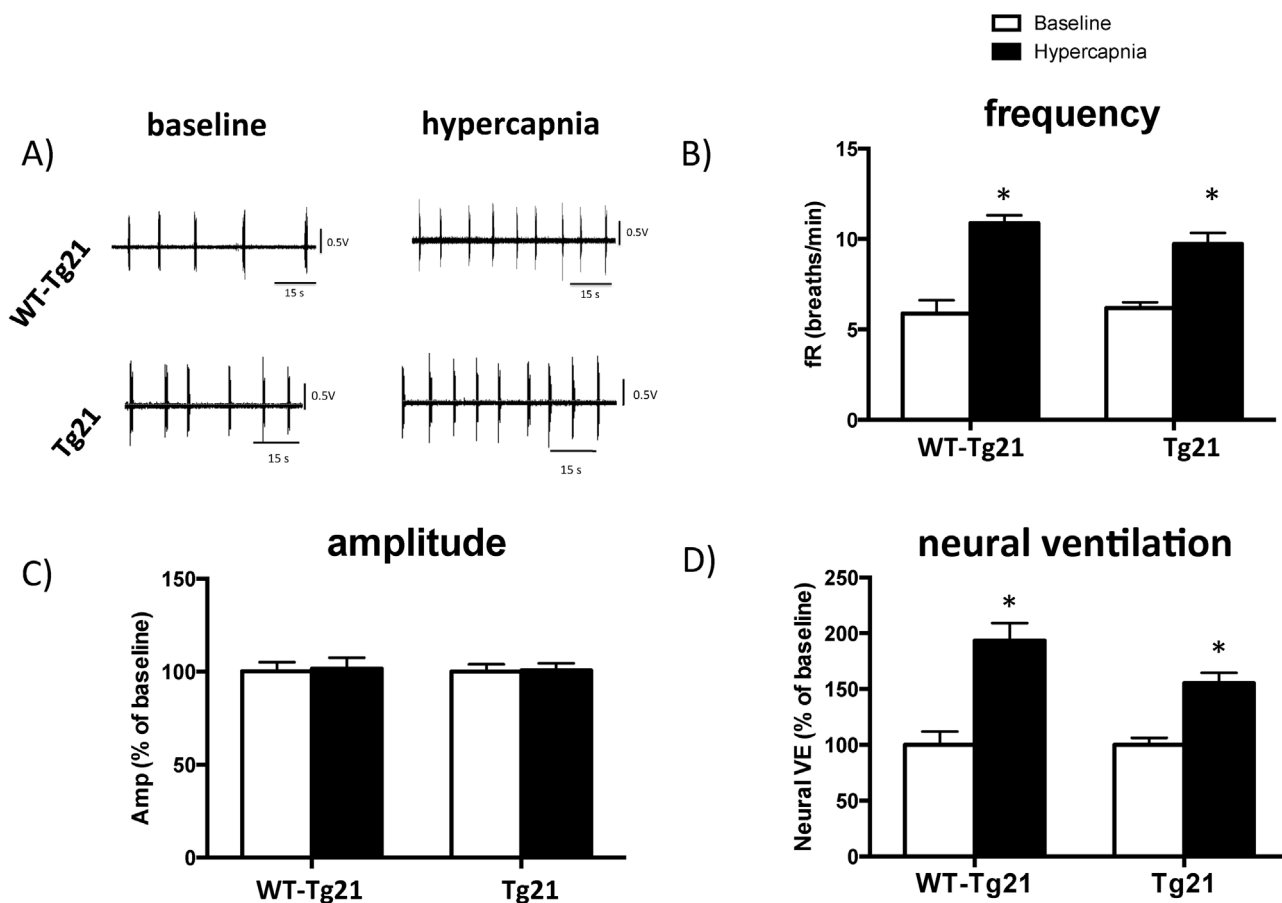


Fig. 1. Overexpression of cerebral Epo in Tg21 mice does not alter the fictive breathing response to CO_2 -induced acidosis. (A) Electrophysiological recordings of C4 ventral root activity illustrating the central respiratory drive of P4 brainstem-spinal cord preparations from WT-Tg21 and Tg21 mice exposed to basal and CO_2 -induced acidosis conditions. Histograms showing the mean value of (B) frequency (fR), (C) amplitude (Amp) relative to baseline, and (D) neural ventilation (neural VE) relative to baseline (C). Results are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ CO_2 -induced acidosis vs. baseline.

that the role of cerebral Epo in the control of central chemosensitivity is more complex than initially thought. Previous studies investigating the impact of cerebral Epo in the neural control of central chemosensitivity to CO_2/H^+ were performed in freely behaving animals. Using adult Tg21 mice we observed no changes in the ventilatory response to CO_2 stimulation compared to control animals (Laouafa et al., 2016a). Similar results were obtained (both at adult and P10 ages), by using WT mice receiving intra-cisternal injection of the natural antagonist of Epo (the sEpoR) (Ballot et al., 2015a,b). Our current results, obtained in brainstem-spinal cord preparations of P4 mice, are in line with these previous findings as no changes in the ventilatory response to CO_2/H^+ were observed both in Epo-overexpressing (Tg21) and in Epo-deficient (Epo-TAG^h) mice. Interestingly however, when the Epo/sEpoR ratio was altered (by incubating preparations with sEpoR for 1 h), the fictive ventilation of Tg21 mice in response to CO_2 was blunted. These results suggest that the Epo/sEpoR ratio is an important modulating factor for breathing regulation. Moreover, these results and those previously reported (Ballot et al., 2015b; Laouafa et al., 2016b) imply that the impact of altering the Epo/sEpoR ratio in mice is age-dependent, with an impact at P4, but not at P10 or in adults. These findings also suggest that when the level of cerebral Epo is genetically modified (as occurring in Tg21 and Epo-TAG^h mouse strains), such changes should also induce a compensatory change in the expression levels of Epo's natural regulator (the sEpoR), which (at least in part) may obscure Epo's actual impact in neural system regulation.

Apart from age, it is also important to consider that a hyperadditive

central-peripheral effect exists in ventilatory regulation during CO_2 stimulation (Smith et al., 2015). Experiments performed in dogs showed that peripheral chemoreceptors (over a wide range of PCO_2) determine the sensitivity of central chemoreceptors to CO_2 (Smith et al., 2015). These findings suggest that the apparent absence of cerebral Epo-related modulation of the hypercapnic ventilatory response (at P10 and adult ages) may actually be a consequence of peripheral CO_2 stimulation. As the current experiments were performed in isolated brainstem-spinal cord preparations, our observations avoid the confounding impacts of carotid body stimulation and restrict our observations to central regulation. Supporting this hypothesis, we recently showed in adult rats that the microinjection of Epo in the locus coeruleus (LC) induced a transient attenuation of the hypercapnic ventilatory response (Silva et al., 2017). Furthermore, the regulation of CO_2/H^+ chemosensing is a multi-localized function in the brainstem involving numerous structures, including the ventrolateral medullary surface, the nucleus tractus solitarius (NTS), the retrotrapezoid-parafacial respiratory group (RTN-pFRG), the raphe, and the pre-Bötzinger complex (PBC) (Biancardi et al., 2008; de Carvalho et al., 2010; Li et al., 1999; Loeschke, 1982; Nattie, 1999; Nattie and Li, 2009; Nattie and Li, 2002; Richerson, 2004). Indeed, the expression of Epo and its receptor has been reported for several of these structures (Soliz et al., 2005). In this context, the medullary catecholaminergic centers (present in our *en bloc* preparations) are good candidates because they are known to increase inhibitory or decrease stimulatory inputs in the brainstem (Blanchi et al., 2003). Moreover, while catecholaminergic cell groups

Brainstem-spinal cord preparations of Epo-TAg^h mice exposed to metabolic acidosis

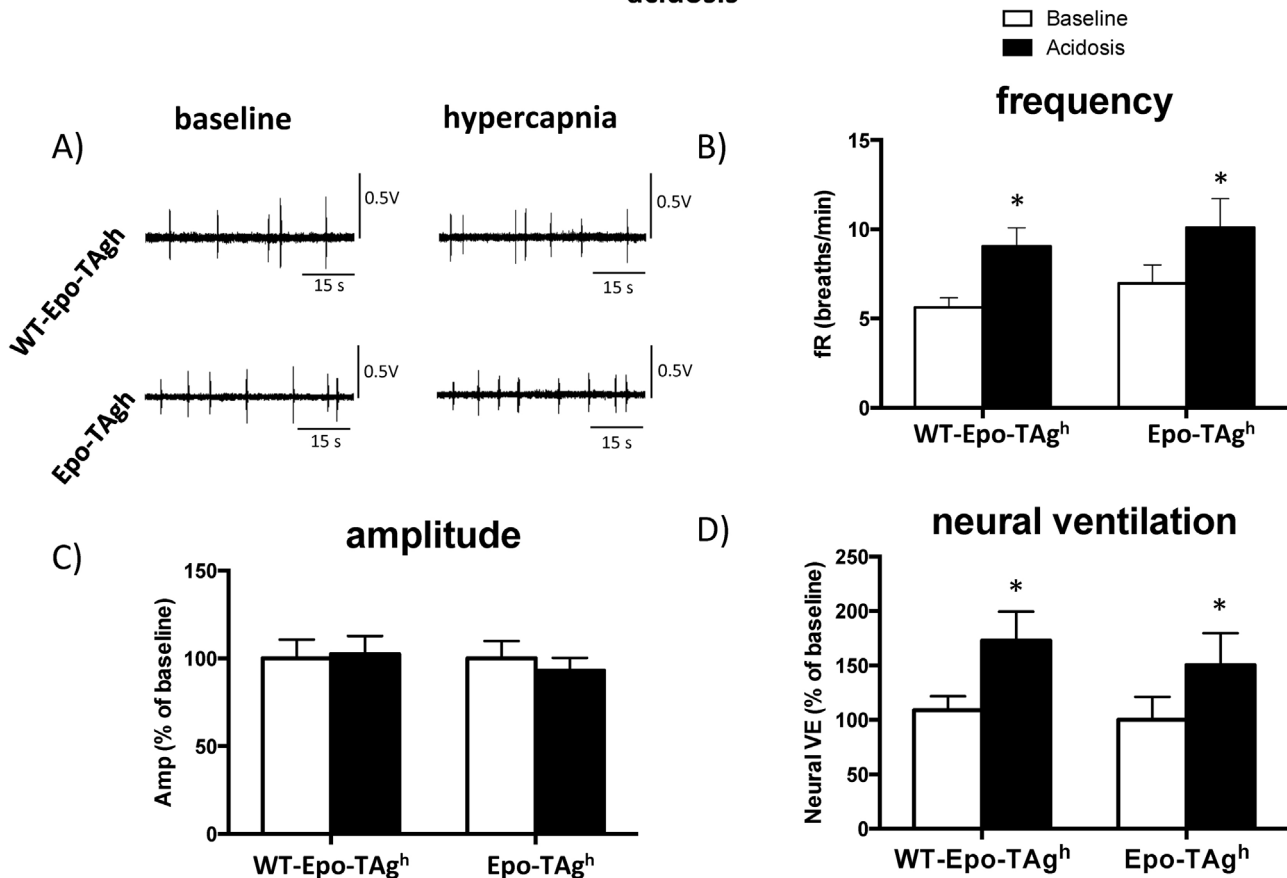


Fig. 2. Abnormally low expression of cerebral Epo in Epo-TAg^h mice did not alter the fictive breathing response to metabolic acidosis. (A) Electrophysiological recordings of C4 ventral root activity illustrating the central respiratory drive of P4 brainstem-spinal cord preparations from WT-Epo-TAg^h and Epo-TAg^h mice exposed to basal and metabolic acidosis conditions. Histograms showing the mean value of (B) frequency (fR), (C) amplitude (Amp) relative to baseline, and (D) neural ventilation (neural VE) relative to baseline (C). Results are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ metabolic acidosis vs. baseline.

do not modulate basal responses, they are the main regulators of ventilation upon hypoxic and hypercapnic stimulation (Hilaire et al., 2004; Soliz et al., 2005; Soulage et al., 2004; Soulage et al., 2003). This fact might explain why we do not observe changes in the basal fictive ventilation in the present study. Moreover, catecholaminergic activity induced by hypoxia (increased in the pons and decreased in the medulla) has been reported in adult Tg21 mice (Soliz et al., 2005).

Our results also show that the inhibition of ERK/Akt diminishes hypercapnic fictive breathing by blunting the amplitude rather than the burst frequency. However, apart from being implicated in the molecular pathway activated by Epo (Caravagna and Soliz, 2015), ERK/Akt are also molecules involved in major processes accomplishing a wide variety of neural tasks, including glucose metabolism (Engelman et al., 2006), cellular apoptosis and survival (Teng et al., 2014), differentiation (Chan et al., 2013), neural proliferation and migration (Dey et al., 2005), neuroprotection (Zhang et al., 2015), neurodegeneration (Fang et al., 2015), and synaptic signalling (Yoshii and Constantine-Paton, 2014). Moreover, ERK/Akt in brain tissue participates in the modulation of dopaminergic (Beaulieu et al., 2006), muscarinic (Rosenblum et al., 2000), adrenergic (Taraviras et al., 2002), serotonergic (Cowen, 2007), GABAergic (Balasubramanian et al., 2004) and adenosinergic (Wiese et al., 2007) neurotransmission. As such, our results are currently limited to explain whether apart from the Epo molecular pathway, ERK/Akt modulates the hypercapnic fictive breathing by affecting other mechanisms.

In conclusion, our results show that stimulation of fictive breathing by CO₂/H⁺ is not affected in transgenic mice overexpressing Epo

(Tg21) or showing neural Epo deficiency (EpoTAg^h), but that the pharmacological increase of sEpoR and inhibition of ERK/Akt produce a drastic reduction of the CO₂-induced/hypercapnic response in brainstem-spinal cord preparations of mice at birth. These important results suggest that more than the variation of Epo levels, the Epo/sEpoR ratio is an important modulating factor for breathing regulation. These data open up clinical perspectives based on the use of Epo drugs at birth in hypoventilation cases.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Vincent Joseph and Dr Tara Janes for his appraisal of the manuscript and editorial assistance. This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 130258), the Molly Towell Perinatal Research Foundation (Canada), and the “Legs Poix, Chancellerie des Universités de Paris” (Legs 1504). The salary of Jorge Soliz is supported by the “Fonds de recherche du Québec-Santé” (FRQ-S). Florine Jeton was supported by a Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The Laboratory of Excellence GR-Ex (ANR-11-LABX-0051) was funded by the program “Investissement d’avenir” of the French National Research agency (ANR-11-IDEX-0005-02). The authors thank Fanny Joubert for her help in the realization of the experiments on Epo-TAg^h mice at the UMR_S1158 lab. The authors have no actual or potential conflict of interest to disclose.

Brainstem-spinal cord preparations of inhibited Epo in Tg21 mice exposed to hypercapnia

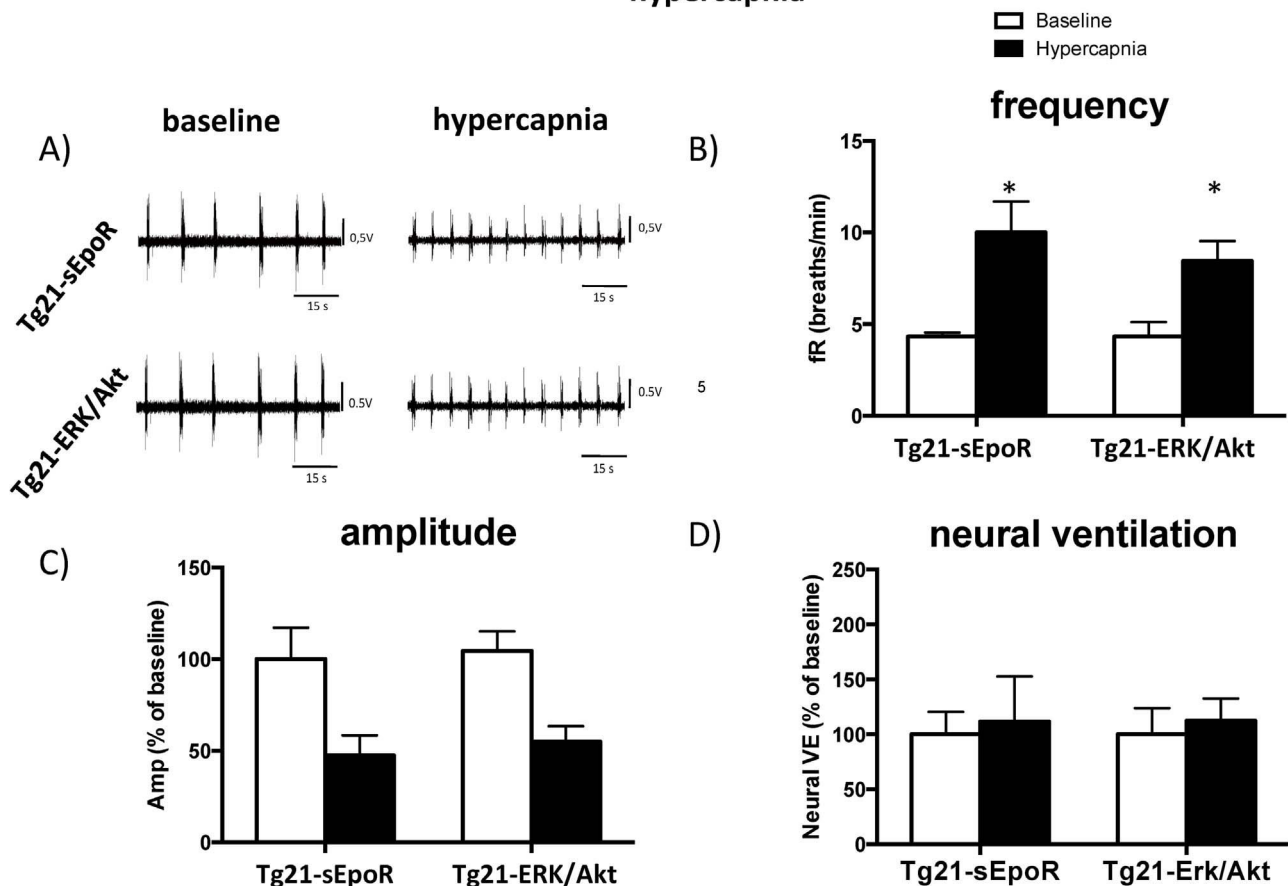


Fig. 3. Pharmacological inhibition of neural Epo signalling decreases the fictive breathing response to CO₂-induced acidosis. (A) Electrophysiological recordings of C4 ventral root activity illustrating the central respiratory drive of P4 brainstem-spinal cord preparations from Tg21 mice incubated for 1 h with sEpoR (Tg21-sEpoR) or ERK/Akt-inhibitors (Tg21-ERK/Akt). Preparations were exposed to basal and CO₂-induced acidosis conditions. Histograms showing the mean value of (B) frequency (fR), (C) amplitude (Amp) relative to baseline, and (D) neural ventilation (neural VE) relative to baseline (C). Results are expressed as mean \pm SEM. **p* < 0.05 CO₂-induced acidosis vs. baseline.

References

- Abu-Shaweesh, J.M., Dreshaj, I.A., Thomas, A.J., Haxhiu, M.A., Strohl, K.P., Martin, R.J., 1985. 1999: Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. *J. Appl. Physiol.* 87, 484–490.
- Balasubramanian, S., Teissere, J.A., Raju, D.V., Hall, R.A., 2004. Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 279, 18840–18850.
- Ballot, O., Joseph, V., Soliz, J., 2015a. Endogenous brain erythropoietin is a potent sex-specific respiratory stimulant in adult and newborn mice. *J. Appl. Physiol.* (1985) 00143, 02015.
- Ballot, O., Laouafa, S., Elliot-Portal, E., Tam, R., Voituren, N., Joseph, V., Soliz, J., 2015b. The central chemosensitivity is not altered by cerebral erythropoietin. *Neurosci. Lett.* 609, 63–68.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2006. Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *J. Biol. Chem.* 281, 32072–32080.
- Belzile, O., Gulemetova, R., Kinkead, R., 2007. Effects of medullary Raphe stimulation on fictive lung ventilation during development in *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Biol.* 210, 2046–2056.
- Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H., 2008. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Arch.* 455, 1119–1128.
- Binley, K., Askham, Z., Iqbal, S., Spearman, H., Martin, L., de Alwis, M., Thrasher, A.J., Ali, R.R., Maxwell, P.H., Kingsman, S., Naylor, S., 2002. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* 100, 2406–2413.
- Bissonnette, J.M., Knopp, S.J., 2004. Hypercapnic ventilatory response in mice lacking the 65 kDa isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65). *Respir. Res.* 5, 3.
- Blanchi, B., Kelly, L.M., Viemari, J.C., Lafon, I., Burnet, H., Bevengut, M., Tillmanns, S., Daniel, L., Graf, T., Hilaire, G., Sieweke, M.H., 2003. MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat. Neurosci.* 6, 1091–1100.
- Caravagna, C., Soliz, J., 2015. PI3 K and MEK1/2 molecular pathways are involved in the erythropoietin-mediated regulation of the central respiratory command. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 206, 36–40.
- Caravagna, C., Kinkead, R., Soliz, J., 2014. Post-natal hypoxic activity of the central respiratory command is improved in transgenic mice overexpressing Epo in the brain. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 200, 64–71.
- Caravagna, C., Schneider-Gasser, E.M., Ballot, O., Joseph, V., Soliz, J., 2015. Chronic overexpression of cerebral Epo improves the ventilatory response to acute hypoxia during the postnatal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 44, 84–91.
- Chan, W.S., Sideris, A., Sutachan, J.J., Montoya, G.J., Blanck, T.J., Recio-Pinto, E., 2013. Differential regulation of proliferation and neuronal differentiation in adult rat spinal cord neural stem/progenitors by ERK1/2, Akt, and PLCgamma. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 23.
- Chen, Z.Y., Asavaritikrai, P., Prchal, J.T., Noguchi, C.T., 2007. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282, 25875–25883.
- Cowen, D.S., 2007. Serotonin and neuronal growth factors – a convergence of signaling pathways. *J. Neurochem.* 101, 1161–1171.
- Danneman, P.J., Stein, S., Walshaw, S.O., 1997. Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats. *Lab. Anim. Sci.* 47, 376–385.
- Dey, N., Howell, B.W., De, P.K., Durden, D.L., 2005. CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Exp. Cell Res.* 307, 1–14.
- El Hasnaoui-Saadani, R., Pichon, A., Marchant, D., Olivier, P., Launay, T., Quidu, P., Beaudry, M., Duvallet, A., Richalet, J.P., Favret, F., 2009. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* 296, R801–R811.
- Engelman, J.A., Luo, J., Cantley, L.C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.
- Fang, W., Gao, G., Zhao, H., Xia, Y., Guo, X., Li, N., Li, Y., Yang, Y., Chen, L., Wang, Q., Li, L., 2015. Role of the Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway in axon degeneration of dopaminergic neurons resulting from MPP+ toxicity. *Brain Res.* 1602, 9–19.
- Frantz 3rd, I.D., Adler, S.M., Thach, B.T., Taeusch Jr., H.W., 1976. Maturation effects on respiratory responses to carbon dioxide in premature infants. *J. Appl. Physiol.* 41, 41–45.
- Guyenet, P.G., Stornetta, R.L., Bayliss, D.A., 2008. Retrotrapezoid nucleus and central

- chemoreception. *J. Physiol.* 586, 2043–2048.
- Guyenet, P.G., Stornetta, R.L., Abbott, S.B., Depty, S.D., Fortuna, M.G., Kanbar, R., 2010. Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. *J. Appl. Physiol.* 108, 995–1002.
- Hilaire, G., Viemari, J.C., Coulon, P., Simonneau, M., Bevent, M., 2004. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 143, 187–197.
- Joubert, F., Perrin-Terrin, A.S., Verkaeren, E., Cardot, P., Fiamma, M.N., Frugiere, A., Rivals, I., Similowski, T., Straus, C., Bodineau, L., 2016. Desogestrel enhances ventilation in ondine patients: animal data involving serotonergic systems. *Neuropharmacology* 107, 339–350.
- Juul, S.E., Anderson, D.K., Li, Y., Christensen, R.D., 1998. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr. Res.* 43, 40–49.
- Khemiri, H., Seaborn, T., Gestreau, C., Soliz, J., 2011. Erythropoietin and soluble erythropoietin receptor regulate the neural control of hypoxic respiration in newborn mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 183 151–121.
- Kinkead, R., Belzile, O., Gulemetova, R., 2002. Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *J. Appl. Physiol.* 93, 936–946.
- Knabe, W., Knerlich, F., Washausen, S., Kietzmann, T., Siren, A.L., Brunnett, G., Kuhn, H.J., Ehrenreich, H., 2004. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat. Embryol. (Berl.)* 207, 503–512.
- Kumral, A., Tuzun, F., Oner, M.G., Genc, S., Duman, N., Ozkan, H., 2011. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. *Brain Dev.* 632–643.
- Laouafa, S., Elliot-Portal, E., Revollo, S., Schneider Gasser, E.M., Joseph, V., Voituren, N., Gassmann, M., Soliz, J., 2016a. Hypercapnic ventilatory response is decreased in a mouse model of excessive erythrocytosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 00226, 02016.
- Laouafa, S., Pialoux, V., Roussel, D., Bairam, A., Joseph, V., 2016b. Estradiol prevents brain oxidative stress induced by chronic intermittent hypoxia in female rats. In: American Thoracic Society Meeting. San Francisco, CA, May 13–18.
- Li, T.Q., Moseley, M.E., Glover, G., 1999. A FAIR study of motor cortex activation under normo- and hypercapnia induced by breath challenge. *Neuroimage* 10, 562–569.
- Loeschcke, H.H., 1982. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J. Physiol.* 332, 1–24.
- Macarlupu, J.L., Buvry, A., Morel, O.E., Leon-Velarde, F., Richalet, J.P., Favret, F., 2006. Characterisation of the ventilatory response to hypoxia in a model of transgenic anemic mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 150, 19–26.
- Nattie, E.E., Li, A., 2002. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J. Appl. Physiol.* 92, 2119–2130.
- Nattie, E., Li, A., 2009. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J. Appl. Physiol.* 106, 1464–1466.
- Nattie, E., 1999. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog. Neurobiol.* 59, 299–331.
- Okada, Y., Muckenhoff, K., Scheid, P., 1993. Hypercapnia and medullary neurons in the isolated brain stem-spinal cord of the rat. *Respir. Physiol.* 93, 327–336.
- Pichon, A., Jeton, F., El Hasnaoui-Saadani, R., Hagstrom, L., Launay, T., Beaudry, M., Marchant, D., Quidu, P., Macarlupu, J.L., Favret, F., Richalet, J.P., Voituren, N., 2016a. Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia (Auckl.)* 4, 29–39.
- Pichon, A., Jeton, F., El Hasnaoui-Saadani, R., Hagstrom, L., Launay, T., Beaudry, M., Marchant, D., Quidu, P., Macarlupu, J.S., Favret, F., Richalet, J.P., Voituren, N., 2016b. Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia* 4, 29–39.
- Putnam, R.W., Conrad, S.C., Gdovin, M.J., Erlichman, J.S., Leiter, J.C., 2005. Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 149, 165–179.
- Rabie, T., Marti, H.H., 2008. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)* 23, 263–274.
- Ramanantsoa, N., Hirsch, M.R., Thoby-Brisson, M., Dubreuil, V., Bouvier, J., Ruffault, P.L., Matrot, B., Fortin, G., Brunet, J.F., Gallego, J., Goridis, C., 2011. Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *J. Neurosci.* 31, 12880–12888.
- Richerson, G.B., 2004. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 449–461.
- Rigatto, H., Brady, J.P., de la Torre Verdusco, R., 1975. Chemoreceptor reflexes in preterm infants: I. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhalation of 100% and 15% oxygen. *Pediatrics* 55, 604–613.
- Rosenblum, K., Futter, M., Jones, M., Hulme, E.C., Bliss, T.V., 2000. ERK1/2 regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J. Neurosci.* 20, 977–985.
- Ruschitzka, F.T., Wenger, R.H., Stallmach, T., Quaschnig, T., de Wit, C., Wagner, K., Labugger, R., Kelm, M., Noll, G., Rutlicke, T., Shaw, S., Lindberg, R.L., Rodenwaldt, B., Lutz, H., Bauer, C., Luscher, T.F., Gassmann, M., 2000. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11609–11613.
- Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T., Weiss, S., 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 21, 9733–9743.
- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., Fernandez-Luna, J.L., 1996. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88, 1576–1582.
- Silva, C.A., Vicente, M.C., Tenorio-Lopes, L., Soliz, J., Gargaglioni, L.H., 2017. Erythropoietin in the Locus coeruleus attenuates the ventilatory response to CO₂ in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 236, 11–18.
- Smith, J.C., Greer, J.J., Liu, G.S., Feldman, J.L., 1990. Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J. Neurophysiol.* 64, 1149–1169.
- Smith, C.A., Blain, G.M., Henderson, K.S., Dempsey, J.A., 2015. Peripheral chemoreceptors determine the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr. Res.* 57, 481–487.
- Soliz, J., Joseph, V., Soulage, C., Becskei, C., Vogel, J., Pequignot, J.M., Ogunshola, O., Gassmann, M., 2005. Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J. Physiol.* 568, 559–571.
- Soliz, J., Tam, R., Kinkead, R., 2016. Neonatal maternal separation augments carotid body response to hypoxia in adult males but not female rats. *Front Physiol.* 7 (September (27)), 432.
- Soulage, C., Perrin, D., Cottet-Emard, J.M., Pequignot, J.M., 2003. A6 noradrenergic cell group modulates the hypoxic ventilatory response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 536, 481–487.
- Soulage, C., Pascual, O., Roux, J.C., Denavit-Saubie, M., Pequignot, J.M., 2004. Chemosensory inputs and neural remodeling in carotid body and brainstem catecholaminergic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 551, 53–58.
- Suzue, T., 1984. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.* 354, 173–183.
- Taraviras, S., Olli-Lahdesmaki, T., Lymperopoulos, A., Charitonidou, D., Mavroidis, M., Kallio, J., Scheinin, M., Flordellis, C., 2002. Subtype-specific neuronal differentiation of PC12 cells transfected with alpha2-adrenergic receptors. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 363–374.
- Teng, L., Kou, C., Lu, C., Xu, J., Xie, J., Lu, J., Liu, Y., Wang, Z., Wang, D., 2014. Involvement of the ERK pathway in the protective effects of glycyrrhizic acid against the MPP+ -induced apoptosis of dopaminergic neuronal cells. *Int. J. Mol. Med.* 34, 742–748.
- Viemari, J.-C., Hilaire, G., 2002. Noradrenergic receptors and in vitro respiratory rhythm: interspecies differences between mouse and rat neonates. *Neurosci. Lett.* 324, 149–153.
- Viemari, J.C., Burnet, H., Bevent, M., Hilaire, G., 2003. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1233–1244.
- Voituren, N., Menuet, C., Dutschmann, M., Hilaire, G., 2010a. Physiological definition of upper airway obstructions in mouse model for Rett syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 146–156.
- Voituren, N., Shvarev, Y., Menuet, C., Bevent, M., Fasano, C., Vigneault, E., El Mestikawy, S., Hilaire, G., 2010b. Fluoxetine treatment abolishes the in vitro respiratory response to acidosis in neonatal mice. *PLoS One* 5, e13644.
- Voituren, N., Jeton, F., Cholley, Y., Hasnaoui-Saadani, R.E., Marchant, D., Quidu, P., Favret, F., Richalet, J.P., Pichon, A., 2014. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol. Rep.* 2, e00223.
- Weese-Mayer, D.E., Berry-Kravis, E.M., Ceccherini, I., Keeps, T.G., Loghmanee, D.A., Trang, H., 2010. An official ATS clinical policy statement: congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 626–644.
- Wiese, S., Jablonka, S., Holtmann, B., Orel, N., Rajagopal, R., Chao, M.V., Sendtner, M., 2007. Adenosine receptor A2A-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17210–17215.
- Wiessner, C., Allegrini, P.R., Ekatothramis, D., Jewell, U.R., Stallmach, T., Gassmann, M., 2001. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 857–864.
- Yoshii, A., Constantine-Paton, M., 2014. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 6.
- Yu, X., Shacka, J.J., Eells, J.B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R.M., Beleslin-Cokic, B., Lin, C.S., Nikodem, V.M., Hempstead, B., Flanders, K.C., Costantini, F., Noguchi, C.T., 2002. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129, 505–516.
- Zhang, X., Zhang, Q., Tu, J., Zhu, Y., Yang, F., Liu, B., Brann, D., Wang, R., 2015. Prosurvival NMDA 2A receptor signaling mediates postconditioning neuroprotection in the hippocampus. *Hippocampus* 25, 286–296.
- de Carvalho, D., Bicego, K.C., de Castro, O.W., da Silva, G.S., Garcia-Cairasco, N., Gargaglioni, L.H., 2010. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 172, 24–31.

II. Article à soumettre : Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-activated cells of the medulla oblongata with an increase in respiratory response to hypercapnia

Certains travaux de la partie 2 des résultats généraux ont donné lieu à :

- 1 manuscrit à soumettre dans *Neurosciences*

Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-activated cells of the medulla oblongata with an increase in respiratory response to hypercapnia

Jeton F*, **Perrin-Terrin AS***, Soliz J, Del Rio R, Marchant D, Richalet JP, Pichon A#, Bodineau L#, Voituron N# ; * co-premiers auteurs et # co-derniers auteurs

1. Résumé

Les souris déficientes en érythropoïétine présentent une augmentation de la réponse ventilatoire lors d'une hypercapnie associée à des changements de l'activation de structures respiratoires bulbaires

Objectifs

Déterminer si une déficience chronique en Epo chez l'adulte modifie le réseau neuronal respiratoire bulbaire activé par un challenge CO_2/H^+ et en conséquence, la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ en comparaison à des souris sauvages afin d'étudier l'implication de l'Epo dans la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ .

Contexte scientifique

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine connue pour jouer un rôle clé dans l'érythropoïèse en assurant la production et la maturation des lignées cellulaires qui donnent les érythrocytes (Bunn, 2013). Cependant, l'Epo est également une cytokine aux effets pléiotropiques avec des actions non-érythropoïétiques dont les effets protecteurs sont remarquables. En effet, son expression et celle de son récepteur Epo-R ont été détectés dans de nombreux tissus et en particulier au niveau du système nerveux central et périphérique (Rabie & Marti, 2008, Pichon et al., 2016) où l'Epo semble intervenir positivement dans les phénomènes de neuroprotection et de neurogenèse (Yu et al., 2002, Sattler *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2007).

L'Epo s'avère être aussi impliquée dans le contrôle de la ventilation. En effet, il a été démontré que l'Epo était impliquée dans la ventilation en normoxie et dans la modulation de la ventilation en réponse à l'hypoxie (Macarlupu *et al.*, 2006, Soliz et al., 2007b, Yalcin et al., 2007, Khemiri *et al.*, 2012, Voituron et al., 2014, Ballot et al., 2015a, Caravagna & Soliz, 2015, Caravagna *et al.*, 2015, Pichon et al., 2016). Ces observations sont à mettre en lien avec la présence d'Epo-R dans les principales structures respiratoires périphériques et centrales qui régulent la respiration en hypoxie (Soliz et al., 2005). Sachant que la régulation de la réponse ventilatoire au CO_2/H^+ dépend également d'une partie de ces structures respiratoires (Feldman et al., 2003, Guyenet et al., 2005b, Nattie & Li, 2006, Guyenet & Bayliss, 2015b), l'Epo pourrait intervenir de manière similaire sur la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. La possibilité de l'implication de l'Epo dans la modulation de la CCR lors d'une hypercapnie s'avère tout à fait intéressante, notamment dans la perspective d'une éventuelle piste thérapeutique visant à la correction pharmacologique de pathologies neuro-respiratoires caractérisées par l'absence ou la réduction importante de la chémosensibilité au CO_2/H^+ tels que les CHS (Weese-Mayer et al., 2010, Ramanantsoa et al., 2011).

Des études récentes ont tenté de déterminer l'implication de l'Epo sur la modulation de la réponse ventilatoire hypercapnique et n'aboutissent pas à un consensus (Ballot *et al.*, 2015b, Khemiri *et al.*, 2016, Laouafa *et al.*, 2016, Menuet *et al.*, 2016, Laouafa *et al.*, 2017, Silva *et al.*, 2017). D'un côté la surexpression centrale et plasmatique chronique d'Epo et/ou l'injection aigüe d'Epo au niveau central chez des animaux adultes et juvéniles diminue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie comparativement à des animaux sauvages (Menuet *et al.*, 2016, Silva *et al.*, 2017). De l'autre, la sous- et sur- expression chronique centrale d'Epo et/ou la diminution pharmacologique centrale d'Epo endogène en post-natal n'induit pas de modification de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie par rapport à des animaux sauvages (Ballot *et al.*, 2015b, Laouafa *et al.*, 2017).

Compte tenu de toutes ces données, nous avons formulé l'hypothèse que la chronicité de la déficience en Epo chez l'adulte pourrait modifier l'activité des structures neuronales respiratoires impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et donc induire des changements dans l'adaptation ventilatoire à l'hypercapnie. Nous nous sommes concentrés sur l'identification des populations neuronales activées par le stimulus CO_2/H^+ chez des souris adultes présentant un déficit chronique en Epo, les souris Epo-TAg^h parallèlement à l'analyse de leur réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Comme les principaux sites chémosensibles au CO_2/H^+ à savoir le RTN/pFRG et les neurones sérotoninergiques des raphés bulbaires sont situés dans le bulbe rachidien (Mulkey *et al.*, 2004, Hodges & Richerson, 2008, Guyenet *et al.*, 2013, Teran *et al.*, 2014, Kumar *et al.*, 2015, Ruffault *et al.*, 2015), nous avons décidé de centrer nos investigations au niveau bulbaire.

Résultats et discussion

- Caractérisation du phénotype ventilatoire des souris Epo-TAg^h en hypercapnie

La ventilation en normocapnie n'est pas modifiée chez les souris Epo-TAg^h par rapport aux souris témoins. En revanche, la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris Epo-TAg^h est significativement plus importante que celle des souris témoins. Chez les souris sauvages, l'hypercapnie induit une augmentation de la \dot{V}_E due à une augmentation du V_T mais pas de la f_R comme cela est décrit dans la littérature (Ohashi *et al.*, 2013). Chez les souris Epo-TAg^h, l'hypercapnie induit une augmentation du \dot{V}_E significativement plus importante que chez les souris sauvages, résultant d'une augmentation à la fois du V_T et de la f_R . La contribution supplémentaire de la f_R chez les Epo-TAg^h suggère un effet possible du déficit en Epo sur la CCR au cours de l'hypercapnie lié à une modification du réseau respiratoire bulbaire activé par le stimulus CO_2/H^+ .

- Détermination des structures bulbaires impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h

L'expression normocapnique basale de *c-fos* dans les structures respiratoires bulbaires est similaire entre les souris Epo-TAg^h et sauvages. Après exposition à l'hypercapnie, un effet différentiel selon la souche de souris a été observé sur l'activation de structures respiratoires bulbaires, soutenant l'hypothèse avancée de la plasticité du réseau neuronal respiratoire.

Chez les souris sauvages, nous avons observé principalement une augmentation de l'activité neuronale dans le cNTS, le mNTS, la rVLM et le RTN/pFRG suite à une hypercapnie, conformément à ce qui peut être observé classiquement dans la littérature.

Chez les Epo-TAg^h, nous n'avons pas observé d'augmentation d'expression de *c-fos* au niveau du cNTS et du mNTS en hypercapnie, ce qui suggère que la déficience en Epo ait pu d'une part altérer le fonctionnement des corps carotidiens car le NTS est décrit comme le site majeur recevant les projections des afférences des chémorécepteurs périphériques (Torrealba & Claps, 1988a, Finley & Katz, 1992) et qu'elle ait pu d'autre part exercer un effet direct sur le fonctionnement des neurones du NTS, les rendant incapables d'intégrer les informations provenant des corps carotidiens. Par conséquent, l'absence d'activation des neurones du cNTS et du mNTS à la suite d'un stimulus hypercapnique chez les souris Epo-TAg^h suggère que la déficience chronique en Epo affecte soit le fonctionnement des corps carotidiens et/ou l'intégration des informations provenant des chémorécepteurs périphériques. L'augmentation du nombre de cellules c-FOS-positives dans le RTN/pFRG en hypercapnie était moins importante chez les souris Epo-TAg^h que chez les souris sauvages. Le RTN/pFRG est un des sites majeurs de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ (Mulkey et al., 2004, Guyenet et al., 2013, Kumar et al., 2015, Ruffault et al., 2015), suggérant ainsi une altération de la chémoréception centrale chez les Epo-TAg^h. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons apprécié le nombre de neurones exprimant *Phox2B*, ces neurones étant connus pour jouer un rôle majeur dans la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ du RTN/pFRG (Gestreau et al., 2010, Wang et al., 2013c, Guyenet & Bayliss, 2015b, Ruffault et al., 2015). Nous avons alors observé un nombre global de neurones marqués similaire entre les sauvages et les Epo-TAg^h. La faible proportion de neurones exprimant *c-fos* chez les souris Epo-TAg^h ne peut donc pas être associée à un déficit de neurones exprimant *Phox2B*, ce qui suggère plutôt une modification dans leur fonctionnement comme par exemple une réduction de leur sensibilité au CO₂/H⁺. Les mécanismes moléculaires sous-tendant les propriétés de chémoréception des neurones du RTN/pFRG impliquent en partie les canaux TASK-2 et le récepteur GPR4 (Kumar et al., 2015). L'Epo pourrait interagir avec ses acteurs de la chémoréception même s'il n'existe à ce jour pas de données de la littérature sur l'interaction entre l'Epo et les détecteurs de protons moléculaires GPR4 ou TASK. Une déficience en Epo pourrait donc altérer la chémoréception centrale au CO₂/H⁺. Cependant, une autre théorie met en jeu un mécanisme de stimulation paracrine des neurones RTN/pFRG par les astrocytes (Gourine et al., 2010). En effet, les cellules gliales présentes à la surface ventrale du bulbe peuvent être dépolarisées par une acidification et seraient ensuite capables d'activer les neurones du RTN/pFRG via une libération d'ATP, entraînant la propagation des vagues calciques astrocytaires. La déficience en Epo pourrait

affecter le couplage entre les astrocytes et les neurones du RTN/pFRG. À l'appui de cette hypothèse, il a été démontré que l'Epo régule la propagation de l'influx calcique dans les cellules (Korbel *et al.*, 2004). Il est donc possible que la déficience en Epo altère la capacité des astrocytes à exciter les neurones RTN/pFRG. Enfin, les souris Epo-TAg^h ont montré une augmentation de l'expression de *c-fos* induite par l'hypercapnie dans les noyaux des raphés bulbaires pallidus et magnus (RPa et RMg), alors que les souris WT n'ont pas montré une telle augmentation. Dans le RPa, une partie importante des cellules c-FOS-positives était également immunoréactive pour la sérotonine, ce qui s'accorde avec l'idée que les neurones sérotoninergiques des raphés bulbaires jouent un rôle important dans la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ (Iceman *et al.*, 2013, Teran *et al.*, 2014). En revanche, les cellules c-FOS positives du RMg n'étaient pas sérotoninergiques. Cependant il a été démontré qu'un groupe de neurones non sérotoninergiques était stimulé par le CO₂ dans les raphés bulbaires (Iceman & Harris, 2014). Ainsi, il est possible que les neurones des raphés bulbaires n'exprimant pas la sérotonine soient impliqués dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris Epo-TAg^h. Les souris Epo-TAg^h semblent avoir développé des mécanismes compensatoires pour répondre de manière physiologique à l'hypercapnie, tel que le développement d'une plasticité au sein du réseau neuronal impliqué dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

Conclusion

Nous avons observé que la déficience chronique en Epo affecte à la fois le schéma de réponse ventilatoire à l'hypercapnie et le réseau respiratoire bulbaire activé par CO₂/H⁺ au stade adulte. Nos données histologiques suggèrent que l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h par rapport aux souris sauvages impliquerait le recrutement de zones chémosensibles silencieuses chez les sauvages, à savoir les neurones sérotoninergiques et non sérotoninergiques chémosensibles des noyaux des raphés bulbaires. Ce recrutement serait suffisant pour contrer d'une part une diminution de l'activation de la région du RTN/pFRG, site principal de chémoréception centrale au CO₂/H⁺ et d'autre part l'absence d'activation du NTS, principal lieu d'intégration des afférences périphériques traduisant l'inactivation de la voie impliquant les chémorécepteurs périphériques. Naturellement, d'autres zones chémosensibles au CO₂/H⁺ situées dans des régions supra-bulbaires telles que le locus coeruleus et l'hypothalamus caudal (Dillon & Waldrop, 1993, Horn & Waldrop, 1994, Nattie, 1999) pourraient également intervenir dans le phénomène compensatoire observé lors de la réponse ventilatoire des souris Epo-TAg^h et des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de rechercher leur implication dans la chémosensibilité centrale des souris Epo-TAg^h. Cependant, avec ou sans intervention de structures supra-bulbaires, nos données suggèrent que la déficience chronique en Epo entraîne une réorganisation du réseau neuronal bulbaire impliqué dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Ce remodelage du réseau respiratoire bulbaire pourrait être lié à un phénomène

de plasticité neuronale induit par l'Epo, comme cela a déjà été montré lors de la sous- ou sur-expression chronique d'Epo (Kamal *et al.*, 2011, Voituron *et al.*, 2014, Almaguer-Melian *et al.*, 2015, Kimakova *et al.*, 2017). Cette hypothèse est particulièrement intéressante en ce qui concerne les pathologies neuro-respiratoires telle que le CCHS caractérisé par une perte ou une diminution importante de la sensibilité au CO_2/H^+ et soutient la poursuite des investigations au niveau central sur l'implication de l'Epo dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

1 **Title:** Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-
2 activated cells of the *medulla oblongata* with an increase in respiratory response to
3 hypercapnia

4

5 **Authors names and affiliation:**

6 Florine JETON^{1,2,*}, Anne-Sophie PERRIN-TERRIN^{1,3,*}, Jorge SOLIZ⁴, Rodrigo DEL
7 RIO⁵, Dominique MARCHANT¹, Jean-Paul RICHALET^{1,2}, Aurélien PICHON^{1,2,6,||},
8 Laurence BODINEAU^{3,||}, Nicolas VOITURON^{1,2, ||,#}

9

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

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

13 ³ Sorbonne Université, Inserm, UMR_S1158 Neurophysiologie Respiratoire
14 Expérimentale et Clinique, F-75005 Paris, France

15 ⁴ Département de pédiatrie, Centre de Recherche de l’Hôpital St-François d’Assise,
16 Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de médecine, Québec
17 (Québec) G1L 3L5

18 ⁵ Laboratory of Cardiorespiratory Control, Dept. of Physiology, Fac. of Biological
19 Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

20 ⁶ Present address: Université de Poitiers, Laboratoire MOVE, EA6314, FSS, 86000
21 Poitiers, France

22

23 * and ||, equal contribution

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

27

28

29 **Abstract**

30 Erythropoietin (Epo) and its receptor are expressed in central respiratory areas. We
31 hypothesized that chronic Epo deficiency alters the functioning of central respiratory
32 areas and thus the respiratory adaptation to hypercapnia depending on structures of
33 the *medulla oblongata*. The hypercapnic ventilatory response (HcVR) was evaluated
34 by whole body plethysmography in wild type (WT) and Epo deficient (Epo-TAg^h) adult
35 male mice under 4%CO₂. Epo-TAg^h mice showed a larger HcVR than WT mice
36 because of an increase in both respiratory frequency and tidal volume whereas WT
37 mice only increased their tidal volume. Functional histological approach revealed
38 changes in CO₂/H⁺-activated cells between Epo-TAg^h and WT mice possibly
39 associated with brain plasticity. First, Epo-TAg^h mice showed a less important
40 hypercapnic increase in c-FOS-positive number of cells in the retrotrapezoid
41 nucleus/parafacial respiratory group than WT, and this, independently of changes in
42 the number of *PHOX2B*-expressing cells. Second, we did not observe in Epo-TAg^h
43 mice the hypercapnic increase in c-FOS-positive number of cells in the nucleus of the
44 solitary tract present in WT mice. Finally, whereas hypercapnia did not induce an
45 increase in the c-FOS-positive number of cells in medullary raphe nuclei in WT mice,
46 chronic Epo deficiency conducted to the observation of hypercapnic activated cells in
47 *raphe pallidus* and *magnus* nuclei, with an important part of c-FOS positive cells
48 displaying an immunoreactivity for serotonin in the *raphe pallidus* nucleus. All of
49 these elements suggest that chronic Epo-deficiency affects both the pattern of
50 ventilatory response to hypercapnia and associated medullary respiratory network at
51 adult stage.

52

53

54 **Highlights**

- 55 • Epo-deficiency led to high ventilatory response to hypercapnia associated with
56 a modified ventilatory pattern
- 57 • Epo-deficiency altered the CO₂/H⁺-activated network of the *medulla oblongata*
- 58 • Epo-deficiency reduced the hypercapnic activation of retrotrapezoid
59 nucleus/parafacial respiratory group neurons
- 60 • Epo-deficiency impacted the hypercapnic cells activation in the nucleus of the
61 solitary tract
- 62 • Epo-deficiency favoured the hypercapnic cell activation in *raphe pallidus* and
63 *magnus* nuclei

64

65 **Keywords:** erythropoietin, central CO₂/H⁺-activated cells, hypercapnia,
66 retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group, serotonergic cells

67

68 **Abbreviations**

69 7N, facial nucleus; Epo, erythropoietin; EpoR, erythropoietin receptor; f_R , respiratory
70 frequency; Hc, hypercapnia; HcVR, hypercapnic ventilatory response; NK1-R,
71 neurokinin-1 receptor; NOS, nitric oxide systems; cNTS, commissural part of the
72 nucleus of the solitary tract; mNTS, medial part of the nucleus of the solitary tract;
73 vINTS, ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract; PHOX2B, paired-like
74 homeobox 2b; RMg, *raphe magnus* nucleus; ROb, *raphe obscurus* nucleus; RPa,
75 *raphe pallidus* nucleus; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory
76 group; \dot{V}_E , minute ventilation; cVLM, caudal ventrolateral reticular nucleus of the
77 medulla; rVLM, rostral ventrolateral reticular nucleus of the medulla; VMS, ventral
78 medullary surface; V_T , tidal volume.

79

80 **Acknowledgements**

81 The authors acknowledge Patricia Quidu for technical support and Samira Varela
82 and Sonia Varela for their support in Animal Care.

83

84 **Funding**

85 This work was supported by the “Relations Internationales”, the “Bonus Qualité
86 Recherche” and the “Institut Fédératif de Recherche Biomédicale” programs of the
87 University Paris 13. This work was also supported by a Legs Poix grant (NV, n°1022)
88 and ECOS-SUD program (N.V. action n°C16S03, and R.D.L. PROGRAMA DE
89 COOPERACIÓN CIENTÍFICA ECOS-CONICYT C16S03.). FJ was supported by a
90 Laboratory of Excellence GR-Ex fellowship. The Laboratory of Excellence GR-Ex
91 (ANR-11-LABX-0051) was funded by the program “Investissement d’avenir” of the
92 French National Research agency (ANR-11-IDEX-0005-02).

93

94 **Introduction**

95 The glycoprotein erythropoietin (Epo) is known to play a key role in
96 erythropoiesis and insufficient Epo production in adult induce well-know blood
97 defects, mostly due to the damage of Epo-producing cells or suppression of Epo
98 production by inflammatory cytokines (Bunn, 2013). It is also established that Epo
99 exerts other functions in agreement with the fact that Epo and its receptor EpoR have
100 been detected in many tissues (Rabie and Marti, 2008, Pichon et al., 2016). Notably,
101 Epo and EpoR has been reported to be efficient at the level of the central nervous
102 system in both the normal brain development or protective effect in pathologies such
103 as multiple sclerosis or epilepsy (Yu et al., 2002, Sattler et al., 2004, Chen et al.,
104 2007, Kondo et al., 2009). In such idea, it has been reported that Epo deficiency
105 produces deep alterations in the normoxic expression of hypoxia-related genes in the
106 brain (El Hasnaoui-Saadani et al., 2009, Pichon et al., 2016). As such, basal level of
107 hypoxia inducible factors, vascular endothelial growth factor, glucose transporter 1,
108 erythropoietin receptor (EpoR), and endothelial, neural and inducible NOS were
109 drastically augmented (El Hasnaoui-Saadani et al., 2009).

110 Several studies have been interested in influence of Epo in the control of
111 breathing. Brain Epo has been shown to modulate both the basal ventilation and the
112 hypoxic ventilatory response (Macarlupu et al., 2006, Soliz et al., 2007, Yalcin et al.,
113 2007, Khemiri et al., 2012, Voituron et al., 2014, Ballot et al., 2015a, Caravagna et
114 al., 2015, Caravagna and Soliz, 2015, Pichon et al., 2016). These observations can
115 be related with the presence of EpoR in the main peripheral and central respiratory
116 areas that regulate breathing (Soliz et al., 2005). On the basis of these data, keeping
117 in mind that the CO_2/H^+ regulation of breathing mainly depends on brainstem
118 structures (Feldman et al., 2003, Guyenet et al., 2005, Nattie and Li, 2006a, Guyenet
119 and Bayliss, 2015), recent studies aimed to determine if Epo modulates the
120 hypercapnic ventilatory response to CO_2 (HcVR). To search for an influence of Epo in
121 HcVR is relevant because the central CO_2/H^+ chemosensitivity is essential. Indeed,
122 absence or drastically reduction of the CO_2/H^+ sensitivity leads to neurorespiratory
123 disease named central hypoventilations syndromes such as Ondine's curse (Weese-
124 Mayer et al., 2010, Ramanantsoa et al., 2011). Conclusions of the few studies
125 conducted on this topic do not reach consensus (Ballot et al., 2015b, Khemiri et al.,
126 2016, Laouafa et al., 2016, Menuet et al., 2016, Laouafa et al., 2017, Silva et al.,

127 2017). Menuet and collaborators reported a decrease in HcVR in adult transgenic
128 mice over-expressing brain Epo suggesting that an excess of Epo limits the CO_2/H^+
129 respiratory response (Menuet et al., 2016). This observation is in agreement with a
130 study using exogenous supply of Epo in the brainstem of juvenile rat (Silva et al.,
131 2017), but it is opposed with others works (Ballot et al., 2015b, Laouafa et al., 2016,
132 Laouafa et al., 2017). In particular, it is surprising that transgenic newborn mice
133 showing either a chronic deficient-expression of brain EPO or a pharmacologically-
134 induced decrease in brain Epo do not show an increase in HcVR (Ballot et al., 2015b,
135 Laouafa et al., 2017). We hypothesized that chronic life-long Epo deficiency is
136 necessary to induce changes in the central CO_2/H^+ -activated cells, and thus to
137 observe an enhancement of the HcVR in accordance with the conclusion of Menuet
138 and collaborators (Menuet et al., 2016). Changes in central CO_2/H^+ -activated cells
139 induced by chronic Epo deficiency are supported by the recognized link between
140 neuronal plasticity phenomenon and over- or deficient-expression of Epo (Kamal et
141 al., 2011, Voituron et al., 2014, Almaguer-Melian et al., 2015, Kimakova et al., 2017).
142 Considering all these data, we searched for changes in the central CO_2/H^+ -activated
143 cells in chronic Epo deficient (Epo-TAg^h) adult mice in parallel with the analysis of
144 their HcVR. Because the major CO_2/H^+ -chemosensitive sites, retrotrapezoid
145 nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) and medullary raphe
146 serotonergic neurons are located within the *medulla oblongata* (Mulkey et al., 2004,
147 Hodges et al., 2008, Guyenet et al., 2013, Teran et al., 2014, Kumar et al., 2015,
148 Ruffault et al., 2015), we decided to focus our investigations at the medullary level.

149

150 **Experimental procedures**

151 ***Ethical approval***

152 Experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal
153 Experiment Charles Darwin and the French ministry of research (Ce5/2011/05 and
154 APAFIS#8192), done in accordance with the European Communities Council
155 Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and conducted in
156 accordance with the French legislation for animal care.

157 ***Animals and procedures***

158 All experiments were performed in in-house bred wild type (WT, n=47) and
159 Epo-TAg^h (n=45) male adult littermates (\approx 10 weeks) from Bl6/CBA strain. Mean
160 body weight and temperature were 30.4 ± 3.3 g / 35.3 ± 1.6 °C for WT mice and 29.7
161 ± 4.0 g / 35.0 ± 1.0 °C for Epo-TAg^h mice respectively. Epo-TAg^h mice present a
162 targeted disruption in the 5' untranslated region of the *Epo* gene that reduces the
163 whole body Epo expression (Binley et al., 2002) leading to plasma and brain Epo
164 concentrations approximately at around 50 pg/ml and 0.10 pg/mg respectively
165 (around 150 pg/ml and 0.40 pg/mg for plasma and brain Epo concentration
166 respectively in WT) (El Hasnaoui-Saadani et al., 2009). Haemoglobin concentration
167 and haematocrit were approximately 7 g/dl and 16-20% in Epo-TAg^h mice
168 (approximately 17 g/dl and 38-40% in WT) (El Hasnaoui-Saadani et al., 2013). All
169 animals were housed in a 12h/12h light/dark cycles at 18-20°C temperature and had
170 *ad libitum* access to water and food.

171 ***Hypercapnic ventilatory response***

172 ***Recording of ventilatory variables***

173 In non-anesthetized and unrestrained mice, ventilatory variables were
174 recorded by whole-body plethysmography (WT n= 25; Epo-TAg^h n= 25) (Bartlett and
175 Tenney, 1970, Voituron et al., 2014). The animal chamber (200ml) was connected to
176 a differential pressure transducer (model DP 45-18, Validyne Engineering Northridge,
177 CA, USA), which measured pressure fluctuations within the chamber, relative to a
178 reference chamber of the same volume. The differential pressure transduced signals
179 were recorded by Spike 2 data analysis system (CED, Cambridge UK). To avoid

180 stress effects on ventilatory variables, mice were habituated in the recording
181 chamber two or three days before the experiments. To evaluate the acute ventilatory
182 response to hypercapnia, air was enriched with CO₂ gas for 5 min (CO₂ 4%, O₂ 21%,
183 balanced N₂). At the beginning, mice were exposed to normoxic conditions for at
184 least 30 min. Recordings were made under normoxic conditions for the last 10 min to
185 define control values and then during the last min of hypercapnia. Only periods of
186 breathing without body movements were analysed. We evaluated respiratory
187 frequency (f_R , cycles.min⁻¹), tidal volume (V_T , μ l) normalized as the ratio of V_T divided
188 by body weight (V_T , μ l.g⁻¹) and minute ventilation (\dot{V}_E , ml.g⁻¹.min⁻¹). For V_T calculation
189 (determined using Drorbaugh and Fenn's equation, Drorbaugh and Fenn (1955)) the
190 rectal temperature was measured just before placing mice in the recording chamber
191 for normoxic values and just after the end of CO₂ exposure for hypercapnic values.

192 *Analyses of ventilatory variables*

193 Values are presented as mean \pm standard deviation (SD). Kolmogorov–
194 Smirnov test assessed the normality of distribution. The effects of hypercapnia on
195 ventilatory variables in male WT and Epo-TAg^h mice were evaluated by multivariate
196 analyses of variance (MANOVA) with Greenhouse and Geisser adjustments. All
197 analyses were performed with the Statistica software (Stat Soft, Tulsa, USA).
198 Differences were considered significant when $P < 0.05$.

199 ***Analysis of hypercapnia-responding areas of the medulla oblongata***

200 *Immunohistological procedures*

201 To localize medullary areas presenting modifications of activity in response to
202 hypercapnia, we analysed *c-fos* expression in WT (n=22) and Epo-TAg^h (n=20) mice.
203 The c-FOS immunodetection is a classic tool used to identify central pathways
204 involved in specific physiological response that requires minimizing manipulations
205 that could induce changes of cell activity unrelated to the studied stimulus and a
206 sufficiently long induction period to induce detectable changes in *c-fos* expression
207 (Larnicol et al., 1994, Herdegen and Leah, 1998, Bodineau and Larnicol, 2001,
208 Okada et al., 2002, Perrin-Terrin et al., 2015). Animals were placed in an airtight box
209 ventilated with hypercapnic gas mixture (CO₂ 4%, O₂ 21% balanced N₂; WT, n=12
210 and Epo-TAg^h, n=10) or normocapnic gas mixture (O₂ 21% balanced N₂; WT, n=10

211 and Epo-TAg^h, n=10) for 2 h. At the end of the hypercapnic or normocapnic period,
212 mice were deeply anesthetized (pentobarbital, 100mg/kg, i.p.) and transcardially
213 perfused with saline solution (NaCl 0.9%) and then with 4% paraformaldehyde in
214 0.1M phosphate buffer (pH7.4). Brain were removed, postfixed in the same fixative
215 solution for 48h and then cryoprotected in 30% sucrose in 0.1M PBS for 24-48h.
216 Standard immunohistochemical procedures were used to locate c-FOS on 40 µm-
217 thick coronal free-floating sections of the medulla oblongata obtained using a cryostat
218 (Leica CM1510S or Leica CM1850UV).

219 The detection of c-FOS was coupled with that of serotonin (5-
220 hydroxytryptamine, 5-HT) or Glial fibrillary acidic protein (GFAP) to characterize the
221 cells displaying changes in activity revealed by c-FOS analysis. The detection of
222 PHOX2B was also used to search for changes between in Epo-TAg^h and WT mice at
223 the level of the main CO₂/H⁺-sensor of the *medulla oblongata*, the retrotrapezoid
224 nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) (Mulkey et al., 2004, Guyenet et
225 al., 2013, Kumar et al., 2015, Ruffault et al., 2015).

226 The manufacturer verified the specificity of primary antibodies in all cases and
227 in addition, control sections were processed in parallel, but with the omission of the
228 primary or secondary antibodies; we observed no labeling in the absence of the
229 primary or secondary antibodies.

230 *c-FOS Immunohistochemistry*

231 Sections were placed in 0.1M phosphate-buffer saline solutions supplemented
232 with 0.3% Triton X-100 and 2% normal goat serum, and then incubated for 48h at
233 4°C with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-52; Santa Cruz
234 Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), diluted 1/2000 in 0.1M phosphate-buffer
235 saline solution supplemented with 0.3% Triton X-100 and 0.25% bovine serum
236 albumin. Sections were then incubated for 1h with a biotinylated goat anti-rabbit
237 immunoglobulin diluted 1/500, and for 1h with an avidin-biotin complex (ABC,
238 Novostain Super ABC Kit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). Peroxidase
239 activity was detected by using VECTOR NovaRED (Substrate Kit for Peroxidase,
240 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were mounted in sequential
241 caudo-rostral order on slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared

242 with xylene and coverslipped with mounting medium (Entellan[®], VWR International
243 S.A.S).

244 *5HT and c-FOS double labelling*

245 5-HT cells of medullary raphe nuclei are considered as important CO₂/H⁺-
246 chemosensitive sites (Hodges et al., 2008, Teran et al., 2014). In order to determine
247 the serotonergic phenotype of hypercapnic activated-cells in medullary midline
248 raphe, c-FOS and 5HT were both investigated. Sections were first incubated with a
249 polyclonal rabbit anti-c-FOS primary antibody (sc-253; Santa Cruz Biotechnology
250 Inc., USA; 1:8000; 48 h at 4°C), then with biotinylated goat anti-rabbit
251 immunoglobulin (BA-1000; Vector Laboratories, Canada; 1:500) in 1% normal goat
252 serum supplemented with 0.3% Triton X-100 for 2 h. After 1h with ABC, peroxidase
253 activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.04%
254 nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in Tris-HCl buffer (pH 7.6).
255 Subsequently, sections were incubated first with a polyclonal rabbit anti-5-HT primary
256 antibody (sc-73024; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; 1:500, 48 h at 4°C),
257 second with biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (BA-1000; Vector
258 Laboratories, Canada; 1:500) in 1% bovine serum albumin for 2 h and then with ABC
259 for 1h. Peroxidase activity was detected by using VECTOR NovaRED. Sections were
260 mounted in sequential caudo-rostral order on slides, air-dried, dehydrated with
261 absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped with mounting medium
262 (Entellan[®], VWR International S.A.S).

263 *GFAP and c-FOS double labelling*

264 Astrocytes, a well-known source of Epo, are involved in the modulation of
265 neighbouring neurons at the RTN/pFRG place (Marti et al., 1996, Gourine et al.,
266 2010). In order to determine if the RTN/pFRG hypercapnic c-FOS-positive cells were
267 astrocytes, double labelling c-FOS and GFAP was performed. Sections were first
268 incubated with a polyclonal rabbit anti-c-FOS primary antibody (sc-253; Santa Cruz
269 Biotechnology Inc., USA; 1:2000; 48h at 4°C), then with biotinylated goat anti-rabbit
270 immunoglobulin (BA-1000; Vector Laboratories, Canada; 1:500) in 1% 1% normal
271 goat serum supplemented with 0.3% Triton X-100 for 1h. After 1h with ABC,
272 peroxidase activity was detected with 0.015% 3,3'-diaminobenzidine
273 tetrahydrochloride, 0.4% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in

274 Tris-HCl buffer (pH 7.6). Subsequently, sections were incubated first with a
275 polyclonal rabbit anti-GFAP primary antibody (Z0334; Dako, Denmark; 1:1000, 48h at
276 4°C), second with biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (BA-1000; Vector
277 Laboratories, Canada; 1:500) in 1% bovine serum albumin for 1 h at room
278 temperature and then with ABC for 1h. Peroxidase activity was detected with 0.02%
279 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% hydrogen peroxide in Tris-HCl
280 buffer (pH 7.6). Sections were mounted in sequential caudo-rostral order on slides,
281 air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped with
282 mounting medium (Entellan[®], VWR International S.A.S).

283 *PHOX2B immunohistochemistry*

284 CO₂/H⁺-activated cells of the RTN/pFRG are described as PHOX2B-positive
285 (Mulkey et al., 2004, Guyenet et al., 2013, Kumar et al., 2015, Ruffault et al., 2015).
286 To compare distribution of PHOX2B-positive neurons in RTN/pFRG between WT and
287 Epo-TAg^h mice, sections were incubated with a polyclonal goat anti-PHOX2B
288 antibody (sc-13226; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; 1:750) in 1% bovine serum
289 albumin for 48 h at 4°C. Afterward, sections were firstly incubated with a biotinylated
290 horse anti-goat immunoglobulin (BA-9500; Vector Laboratories, Canada; 1:500) for
291 2h, and then with ABC in % bovine serum albumin for 2 and 1 h respectively.
292 Peroxidase activity was detected with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine
293 tetrahydrochloride and 0.01% H₂O₂ in 0.005M Tris-HCL buffer. Sections were
294 mounted in sequential caudo-rostral order on slides, air-dried, dehydrated with
295 absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped with mounting medium
296 (Entellan[®], VWR International S.A.S).

297 *Quantitative analysis of the effect of hypercapnia on the number of c-FOS-positive* 298 *cells and their characterization*

299 Sections were examined under a light microscope (Zeiss axioskop, Germany
300 or Leica DM 2000, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and regions of
301 interest were photographed with a digital camera (Q-Imaging Retiga-200R CCD or
302 Leica DFC450 C, Germany).

303 We analyzed c-FOS-positive cells in structures of the *medulla oblongata*
304 related to the respiratory control and its chemical regulation at high magnification

305 (x200) using standard landmarks (Paxinos and Franklin, 2001). The number of c-
306 FOS-positive cells was determined in the nucleus of the solitary tract (NTS), which
307 includes three subdivisions: commissural (cNTS), medial (mNTS) and ventrolateral
308 (vINTS), the medullary *raphes* nuclei (*Raphe Obscurus* nucleus, ROb; *Raphe*
309 *Pallidus* nucleus, RPa and *Raphe Magnus* nucleus, RMg), the ventrolateral reticular
310 nucleus of the medulla (VLM), the facial nucleus (n7) and the ventral medullary
311 surface (VMS). Using standard landmarks (Paxinos and Franklin, 2001, Voituron et
312 al., 2011), the VMS was sub-divided in two areas corresponding to the retrotrapezoid
313 nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG, under the facial nucleus) and the
314 parapyramidal area (PP; lateral edge of the pyramidal tract) (Voituron et al., 2011).
315 The VLM was separated in caudal and rostral parts, cVLM from the pyramidal
316 decussation to the caudal edge of the lateral paragigantocellular nucleus and rVLM
317 from the caudal edge of the lateral paragigantocellular nucleus to the caudal edge of
318 the facial nucleus (Voituron et al., 2011). We localized all of these structures with the
319 aid of numerous ventral, dorsal, and lateral landmarks to delimit the entire volume of
320 each structure.

321 For each analysed area, the mean number of c-FOS-positive cells per section
322 was calculated on one side for bilateral structures (NTSm, NTSvl, VLM, RTN/pFRG,
323 PP, RMg and n7) and on the entire area for midline structures (NTSc, RPa, ROb).
324 Kolmogorov–Smirnov test assessed the normality of distribution. Differences
325 between mean numbers of c-FOS-positive cells per structure obtained under control
326 or hypercapnic conditions in WT and Epo-TAg^h mice were analysed by multivariate
327 analyses of variance (MANOVA). Newman Keuls post-hoc tests were used to assess
328 specific differences between groups. All analyses were performed with the Statistica
329 software (Stat Soft, Tulsa, USA). Differences were considered significant when
330 $P < 0.05$.

331

332 **Results**

333

334 ***Minute ventilation in normocapnia was not modified in Epo-TAg^h compared to***
335 ***WT mice***

336 Although Epo-TAg^h mice displayed a significant increase in V_T compared to
337 WT (~23%; Figure 1Ab), \dot{V}_E was not different between WT and Epo-TAg^h male mice
338 in normocapnic condition (Figure 1Ac).

339 ***Ventilatory pattern in response to hypercapnia differed between Epo-TAg^h and***
340 ***WT mice***

341 In WT mice, hypercapnia induced a significant increase in V_T (~35%; Figure
342 1Ab, Bb) without change in f_R (Figure 1Aa) whereas in Epo-TAg^h mice hypercapnia
343 significantly increased both V_T and f_R (~34% and ~26%, respectively; Figure 1Aa,
344 Ab). To note that in absolute values, the V_T in Epo-TAg^h mice was significantly larger
345 than in WT mice (Figure 1Ab). As a result of all this, the hypercapnic increase in \dot{V}_E
346 was significantly greater in Epo-TAg^h than in WT mice (~68% and ~36%,
347 respectively; Figure 1Ac).

348 ***Medullary areas involved in the HcVR were different between WT and Epo-TAg^h***
349 ***mice***

350 In normocapnic conditions, we observed basal *c-fos* expression in most
351 studied respiratory structures (Table 1). There was no difference in *c-fos* expression
352 in baseline condition between WT and Epo-TAg^h mice (Table 1, Figure 2Aa, Ba, Ca,
353 Ac, Bc, Cc).

354 The hypercapnic exposure led to an increase in *c-fos* expression in WT mice
355 in cNTS (~112%), mNTS (~185%), rVLM (~250%) and RTN/pFRG, (~267%) but not
356 in other analysed medullary areas (Table 1, Figure 2Ab, Bb, Cb).

357 In Epo-TAg^h mice, c-FOS distribution was different from WT mice. No
358 modification of *c-fos* expression was found in NTS and VLM (Table 1, Figure 2Cd).
359 Epo-TAg^h mice displayed an hypercapnic increase in the number of c-FOS positive
360 cells in RPa (~200%) and RMg (~1450%; Table 1, Figure 2Ad). Although no co-
361 labelled cells were observed in the RMg and ROb of both Epo-TAg^h and WT mice
362 (Figure 3Ab, Bd, Ad, Bd), in the RPa, approximately 66% of c-FOS positive cells

363 were also immunoreactive for 5-HT in WT mice in hypercapnic conditions (Figure
364 3Cb) and they were approximately 75% in Epo-TAg^h mice (Figure 3Cd). This
365 observation mainly concerned the rostral part of the RPa (Figure 3C). In addition, we
366 observed a significant increase in *c-fos* expression in RTN/pFRG (~200%; Table 1,
367 Figure 2Bd), but this increase was significantly reduced compared to that observed in
368 WT mice (Table 1, Figure 2Bb). PHOX2B immunodetection in the RTN/pFRG
369 suggested that this under-activation did not depend on a smaller number of
370 PHOX2B-cells in this area in Epo-TAg^h mice compare to WT mice (Figure 4).
371 Besides, the analysis of *c-fos* and *Gfap* expression in WT and Epo-TAg^h mice didn't
372 show any double-labelled cells in the RTN/pFRG (Figure 5).

373

374 **Discussion**

375 We described the CO₂/H⁺-activated cells in the *medulla oblongata* in Epo
376 deficient adult mice by analysing c-FOS protein levels by immunohistochemistry. Our
377 main finding is that there were differences in the medullary CO₂/H⁺-activated cells
378 between Epo-TAg^h and their littermate WT mice at the level of major CO₂/H⁺-
379 chemosensitive sites *i.e.* RTN/pFRG region and medullary raphe nuclei. These
380 changes are possibly related with neuronal plasticity phenomenon as already shown
381 under chronic Epo over- or deficient-expression (Kamal et al., 2011, Voituron et al.,
382 2014, Almaguer-Melian et al., 2015, Kimakova et al., 2017). The changes in CO₂/H⁺-
383 activated cells observed in Epo-TAg^h paralleled with an increase in the HcVR
384 compare to WT mice.

385

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

387 Our results showed that the ventilatory response to hypercapnia in WT mice is
388 mainly due to an increase in V_T. This result is in line with a previous study, which
389 suggested that CO₂-homeostasis was more regulated by V_T than by f_R (Ohashi et al.,
390 2013). In contrast, HcVR in Epo-TAg^h mice was due to an increase in both V_T and f_R.
391 These observations suggest a possible effect of Epo deficiency on ventilatory control
392 during hypercapnia. It is tempting to think that despite Epo deficiency and/or anemia,
393 Epo-TAg^h mice might have developed compensatory mechanisms to cope with
394 hypercapnia. Our hypothesis, sustained by our approach of functional
395 immunohistochemistry, could be that the changes observed in HcVR of Epo-TAg^h
396 mice could be due to plasticity in the neuronal network involved in ventilatory
397 response to hypercapnia. Indeed, although the baseline normocapnic expression of
398 *c-fos* in central respiratory structures was similar between WT and Epo-TAg^h mice,
399 when exposed to hypercapnia, a differential effect of mice strain was observed on the
400 expression of *c-fos* in medullary respiratory areas.

401

402 ***The retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group displays decreased c-***
403 ***fos expression induced by hypercapnia in Epo deficient mice***

404 The increase in c-FOS positive cell number in RTN/pFRG under hypercapnia
405 was lower in Epo-TAg^h mice than in WT. As this area is considered as a major
406 CO₂/H⁺-chemosensitive site (Mulkey et al., 2004, Guyenet et al., 2013, Kumar et al.,
407 2015, Ruffault et al., 2015) this result suggested a smaller number of CO₂/H⁺-
408 sensitive neurons in this area. RTN/pFRG CO₂/H⁺-sensitive neurons are PHOX2B-
409 positive (Gestreau et al., 2010, Wang et al., 2013, Guyenet and Bayliss, 2015,
410 Ruffault et al., 2015). We thus searched for a decrease in PHOX2B-positive number
411 of cell in the RTN/pFRG in Epo-TAgh compared to WT, and surprisingly, we found
412 that Epo-TAgh mice have the same number of PHOX2B-positive neurons, as
413 compared to WT mice. It was thus not probable that the decrease in hypercapnic c-
414 fos expression in Epo-TAgh mice depended on a loss of PHOX2B-CO₂/H⁺-sensitive
415 cells in this area. Another possibility is a reduction of the CO₂/H⁺-sensitivity of
416 RTN/pFRG neurons in Epo-TAgh mice compared to WT. CO₂/H⁺-activation
417 processes for RTN/pFRG neurons have been associated with direct activation of two
418 molecular proton detectors, GPR4 and TASK-2 {Kumar, 2015 #64). To date, there no
419 data of the literature supporting the possibility that Epo interacts with GPR4 or TASK
420 molecular proton detectors. Paracrine stimulation of RTN/pFRG neurons by
421 astrocytes having CO₂/H⁺-sensing properties has also been involved in the
422 RTN/pFRG neuron activation under hypercapnia (Gourine et al., 2010). Thus, a
423 possible explanation would be that Epo deficiency affects the coupling between
424 astrocytes and neurones in this medullary area. In support of this hypothesis, it has
425 been shown that RTN/pFRG astrocytes responded to physiological decreases in pH
426 with vigorous elevations in intracellular Ca²⁺ (Gourine et al., 2010) and that Epo
427 regulates Ca²⁺ transport in cells (Korbel et al., 2004). It is thus possible that Epo
428 deficiency alters the capacity of RTN/pFRG astrocytes to detect the CO₂/H⁺-elevation
429 and thus to excite RTN/pFRG neurons. Further experimentations are thus necessary
430 to validate this hypothesis.

431

432 ***The hypercapnic activation of neurons in the nucleus of the solitary tract, the***
433 ***main projection site from the peripheral chemoreceptors, is blunted by the Epo***
434 ***deficiency***

435 In WT mice, hypercapnia elicited an increase in *c-fos* expression in
436 commissural and medial parts of NTS as already described (Teppema et al., 1997).
437 As cNTS and mNTS are known to be the major site projection of peripheral
438 chemoreceptor afferences (Torrealba and Claps, 1988, Finley and Katz, 1992), the
439 increase in c-FOS-positive number of cells under hypercapnia at their level would be
440 associated with the stimulation of peripheral chemoreceptors by CO_2/H^+ in
441 accordance with the reported increase in carotid body sinus nerve firings due to
442 elevation of CO_2 (Fitzgerald and Dehghani, 1982). Therefore, the absence of CO_2/H^+ -
443 activation in cNTS and mNTS in Epo-TAg^h mice suggests that chronic Epo deficiency
444 affects either the functioning of carotid bodies and/or the integration of inputs from
445 peripheral chemoreceptors. These hypotheses are supported by both previous
446 reported interactions between Epo and carotid bodies and the presence of EpoR on
447 cNTS and mNTS catecholaminergic cells (Soliz et al., 2005). Keeping in mind that
448 the CO_2/H^+ -activation of peripheral chemoreceptors could play a significant role,
449 these data open up interesting perspectives. Indeed, it has been shown that some
450 patients suffering from Ondine's curse displayed a small residual ability to response
451 to hypercapnia whereas the major CO_2/H^+ -sensing site is supposed to be deficient
452 because of the *PHOX2B* mutation that characterise the neurorespiratory disease
453 (Amiel et al., 2003, Ramanantsoa and Gallego, 2013, Carroll et al., 2014). This small
454 residual response could, at least in part, depend on the activation of peripheral
455 chemoreceptor (Ramanantsoa and Gallego, 2013). Thus, based on present data it
456 would be interesting to investigate the Epo interaction with carotid bodies in the
457 context of the hypercapnia. Of course, it cannot be excluded that Epo deficiency
458 affects the establishment of cNTS and mNTS first order projection site from
459 peripheral chemoreceptors because of the influence of Epo/Epo-R signalling in brain
460 development (Yu et al., 2002, Chen et al., 2007).

461

462 ***Epo deficiency favours the hypercapnic activation of 5-HT and non 5-HT***
463 ***neurons of medullary raphe nuclei, a pathway possibly involved in***
464 ***reinforcement of the HcVR in Epo-TAg^h mice***

465 Epo-TAg^h displayed an increase in *c-fos* expression induced by hypercapnia in
466 the medullary raphe nuclei, RPa and RMg, whereas WT mice did not show such an

467 increase. In RPa but not in RMg, an important part of the c-FOS-positive cells were
468 also immunoreactive for 5-HT. The activation of 5-HT cells by CO₂/H⁺, in particular at
469 the level of the rostral part of the RPa (Figure 3), are in agreement with the idea that
470 medullary 5-HT neurons play a significant role in central chemosensitivity (Iceman et
471 al., 2013, Teran et al., 2014). In addition, we also found c-FOS positive cells in
472 medullary raphe regions that were not serotonergic (Figure 3). It was recently
473 demonstrated that a group of non-serotonergic cells was stimulated by CO₂ in
474 medullary raphe (Iceman and Harris, 2014). These non-5-HT cells are robustly
475 stimulated by CO₂ and express neurokinin 1 receptors (NK1-R) (Iceman and Harris,
476 2014). A lesion of *raphe* NK1-R expressing cells reduces the HcVR (Hodges et al.,
477 2004, Nattie et al., 2004, Nattie and Li, 2006b). Thus, it is possible that medullary
478 *raphe* 5-HT and non-5-HT/NK1-R expressing cells are involved in the HcVR in Epo-
479 TAg^h mice.

480

481 **Conclusion**

482 We thus observed that in adult male Epo-deficiency affects both the pattern of
483 ventilatory response to hypercapnia and the CO₂/H⁺-activated medullary respiratory
484 network at adult stage. Our histological data suggest that the exaggeration of the
485 HcVR in Epo-TAg^h mice would implies the recruitment of chemosensitive areas silent
486 in WT and particularly the chemosensitive 5-HT and non 5-HT neurons of medullary
487 raphe nuclei. This recruitment would be sufficient to counteract a decrease in the
488 activation of RTN/pFRG region, the main CO₂/H⁺-sensing site and the pathway
489 implicating the peripheral chemoreceptors. Of course, other CO₂/H⁺ chemosensitive
490 areas located in supramedullary regions such as the locus coeruleus and caudal
491 hypothalamus (Dillon and Waldrop, 1993, Horn and Waldrop, 1994, Nattie, 1999),
492 could also be involved and further investigations are needed to search for their
493 implication. However, with or without the intervention of supramedullary structures,
494 our data suggest that induction of neuroplasticity by changes in the Epo contain
495 modulates the ventilatory response to hypercapnia. This hypothesis is particularly
496 interesting with regard to respiratory pathologies such as central hypoventilation
497 syndrome characterized by a loss or an important decrease in CO₂/H⁺ sensibility and

498 supports continuing investigations at the central level on the link between Epo and
499 the response of the respiratory drive to hypercapnia.

500

501

- 503 **Almaguer-Melian W, Merceron-Martinez D, Pavon-Fuentes N, Alberti-Amador E, Leon-**
504 **Martinez R, Ledon N, Delgado Ocana S, Bergado Rosado JA (2015)**
505 **Erythropoietin Promotes Neural Plasticity and Spatial Memory Recovery in**
506 **Fimbria-Fornix-Lesioned Rats. *Neurorehabilitation and neural repair* 29:979-**
507 **988.**
- 508 **Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D,**
509 **Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C,**
510 **Lyonnet S (2003) Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-**
511 **like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome.**
512 ***Nature genetics* 33:459-461.**
- 513 **Ballot O, Joseph V, Soliz J (2015a) Endogenous brain erythropoietin is a potent sex-**
514 **specific respiratory stimulant in adult and newborn mice. *Journal of applied***
515 **physiology** 118:1386-1395.
- 516 **Ballot O, Laouafa S, Elliot-Portal E, Tam R, Voituron N, Joseph V, Soliz J (2015b) The**
517 **central chemosensitivity is not altered by cerebral erythropoietin. *Neuroscience***
518 **letters** 609:63-68.
- 519 **Bartlett D, Jr., Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia.**
520 ***Respiration physiology* 10:384-395.**
- 521 **Binley K, Askham Z, Iqbal S, Spearman H, Martin L, de Alwis M, Thrasher AJ, Ali RR,**
522 **Maxwell PH, Kingsman S, Naylor S (2002) Long-term reversal of chronic anemia**
523 **using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* 100:2406-2413.**
- 524 **Bodineau L, Larnicol N (2001) Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue**
525 **hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in**
526 **the rat. *Neuroscience* 108:643-653.**
- 527 **Bunn HF (2013) Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine***
528 **3:a011619.**
- 529 **Caravagna C, Schneider Gasser EM, Ballot O, Joseph V, Soliz J (2015) Chronic**
530 **overexpression of cerebral Epo improves the ventilatory response to acute**
531 **hypoxia during the postnatal development. *International journal of***
532 **developmental neuroscience : the official journal of the International Society**
533 **for Developmental Neuroscience** 44:84-91.
- 534 **Caravagna C, Soliz J (2015) PI3K and MEK1/2 molecular pathways are involved in the**
535 **erythropoietin-mediated regulation of the central respiratory command.**
536 ***Respiratory physiology & neurobiology* 206:36-40.**
- 537 **Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE (2014)**
538 **Residual chemosensitivity to ventilatory challenges in genotyped congenital**
539 **central hypoventilation syndrome. *Journal of applied physiology* 116:439-450.**
- 540 **Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT (2007) Endogenous erythropoietin**
541 **signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *The Journal***
542 **of biological chemistry** 282:25875-25883.
- 543 **Dillon GH, Waldrop TG (1993) Responses of feline caudal hypothalamic**
544 **cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Experimental brain***
545 **research** 96:260-272.
- 546 **Drorbaugh JE, Fenn WO (1955) A barometric method for measuring ventilation in**
547 **newborn infants. *Pediatrics* 16:81-87.**
- 548 **El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, Escoubet B, Pezet M, Hilfiker-Kleiner D,**
549 **Hoch M, Pham I, Quidu P, Voituron N, Journe C, Richalet JP, Favret F (2013)**
550 **Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respiratory***
551 **physiology & neurobiology** 186:146-154.
- 552 **El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, Olivier P, Launay T, Quidu P, Beaudry**
553 **M, Duvallet A, Richalet JP, Favret F (2009) Cerebral adaptations to chronic**
554 **anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia.**

555 American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative
556 physiology 296:R801-811.

557 Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity,
558 chemosensitivity. Annual review of neuroscience 26:239-266.

559 Finley JC, Katz DM (1992) The central organization of carotid body afferent projections
560 to the brainstem of the rat. Brain research 572:108-116.

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

564 Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou
565 S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H,
566 Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R, Barhanin J (2010) Task2
567 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity.
568 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
569 America 107:2325-2330.

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

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

575 Guyenet PG, Bayliss DA (2015) Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis.
576 Neuron 87:946-961.

577 Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA, Mulkey DK (2005) Retrotrapezoid nucleus: a
578 litmus test for the identification of central chemoreceptors. Experimental
579 physiology 90:247-253; discussion 253-247.

580 Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the
581 mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox,
582 and CREB/ATF proteins. Brain research Brain research reviews 28:370-490.

583 Hodges MR, Opansky C, Qian B, Davis S, Bonis J, Bastasic J, Leekley T, Pan LG,
584 Forster HV (2004) Transient attenuation of CO₂ sensitivity after neurotoxic
585 lesions in the medullary raphe area of awake goats. Journal of applied
586 physiology 97:2236-2247.

587 Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson
588 RL, Chen ZF, Richerson GB (2008) Defects in breathing and thermoregulation in
589 mice with near-complete absence of central serotonin neurons. The Journal of
590 neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28:2495-
591 2505.

592 Horn EM, Waldrop TG (1994) Modulation of the respiratory responses to hypoxia and
593 hypercapnia by synaptic input onto caudal hypothalamic neurons. Brain
594 research 664:25-33.

595 Iceman KE, Harris MB (2014) A group of non-serotonergic cells is CO₂-stimulated in
596 the medullary raphe. Neuroscience 259:203-213.

597 Iceman KE, Richerson GB, Harris MB (2013) Medullary serotonin neurons are CO₂
598 sensitive in situ. Journal of neurophysiology 110:2536-2544.

599 Kamal A, Al Shaibani T, Ramakers G (2011) Erythropoietin decreases the excitatory
600 neurotransmitter release probability and enhances synaptic plasticity in mice
601 hippocampal slices. Brain research 1410:33-37.

602 Khemiri H, Maresca M, Gestreau C (2016) Carbamylated erythropoietin enhances mice
603 ventilatory responses to changes in O₂ but not CO₂ levels. Respiratory
604 physiology & neurobiology 232:1-12.

605 Khemiri H, Seaborn T, Gestreau C, Soliz J (2012) Erythropoietin and its antagonist
606 regulate hypoxic fictive breathing in newborn mice. Respiratory physiology &
607 neurobiology 183:115-121.

608 Kimakova P, Solar P, Solarova Z, Komel R, Debeljak N (2017) Erythropoietin and Its
609 Angiogenic Activity. International journal of molecular sciences 18.

610 Kondo A, Shingo T, Yasuhara T, Kuramoto S, Kameda M, Kikuchi Y, Matsui T, Miyoshi
611 Y, Agari T, Borlongan CV, Date I (2009) Erythropoietin exerts anti-epileptic
612 effects with the suppression of aberrant new cell formation in the dentate gyrus
613 and upregulation of neuropeptide Y in seizure model of rats. *Brain research*
614 1296:127-136.

615 Korbelt S, Bittorf T, Siegl E, Kollner B (2004) Recombinant human erythropoietin
616 induces proliferation and Ca(2+)-influx in specific leukocyte subpopulations of
617 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood and head kidney cells. *Journal of*
618 *comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental*
619 *physiology* 174:121-128.

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

625 Laouafa S, Elliot-Portal E, Revollo S, Schneider Gasser EM, Joseph V, Voituron N,
626 Gassmann M, Soliz J (2016) Hypercapnic ventilatory response is decreased in a
627 mouse model of excessive erythrocytosis. *American journal of physiology*
628 *Regulatory, integrative and comparative physiology* 311:R940-R947.

629 Laouafa S, Perrin-Terrin AS, Jeton F, Elliot-Portal E, Tam R, Bodineau L, Voituron N,
630 Soliz J (2017) Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo
631 modifies the CO₂/H(+) central chemosensitivity in postnatal mice. *Respiratory*
632 *physiology & neurobiology* 242:73-79.

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

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

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

642 Menuet C, Khemiri H, de la Poeze d'Hambure T, Gestreau C (2016) Polycythemia and
643 high levels of erythropoietin in blood and brain blunt the hypercapnic
644 ventilatory response in adult mice. *American journal of physiology Regulatory,*
645 *integrative and comparative physiology* 310:R979-991.

646 Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG
647 (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats.
648 *Nature neuroscience* 7:1360-1369.

649 Nattie E (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in*
650 *neurobiology* 59:299-331.

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

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

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

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

662 Okada Y, Chen Z, Jiang W, Kuwana S, Eldridge FL (2002) Anatomical arrangement of
663 hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *Journal of*
664 *applied physiology* 93:427-439.

665 Paxinos G, Franklin KB (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates San Diego:
666 CA: Academic Press.

667 Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, Frugiere A, Richalet JP, Bodineau L, Voituren N
668 (2015) The c-FOS protein immunohistological detection: a useful tool as a
669 marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo
670 and ex vivo. *Journal of visualized experiments* in press.

671 Pichon A, Jeton F, El Hasnaoui-Saadani R, Hagstrom L, Launay T, Beaudry M,
672 Marchant D, Quidu P, Macarlupu JL, Favret F, Richalet JP, Voituren N (2016)
673 Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient
674 mice. *Hypoxia (Auckl)* 4:29-39.

675 Rabie T, Marti HH (2008) Brain protection by erythropoietin: a manifold task.
676 *Physiology* 23:263-274.

677 Ramanantsoa N, Gallego J (2013) Congenital central hypoventilation syndrome.
678 *Respiratory physiology & neurobiology* 189:272-279.

679 Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL,
680 Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J, Goridis C (2011) Breathing without
681 CO₂ chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *The Journal of*
682 *neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:12880-
683 12888.

684 Ruffault PL, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, Fujiyama T, Hoshino
685 M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet JF, Fortin G, Goridis C (2015) The
686 retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for
687 the respiratory response to CO₂. *eLife* 4.

688 Sattler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M, Diem R (2004)
689 Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin
690 in a rat model of multiple sclerosis. *Cell death and differentiation* 11 Suppl
691 2:S181-192.

692 Silva CA, Vicente MC, Tenorio-Lopes L, Soliz J, Gargaglioni LH (2017) Erythropoietin
693 in the Locus coeruleus attenuates the ventilatory response to CO₂ in rats.
694 *Respiratory physiology & neurobiology* 236:11-18.

695 Soliz J, Joseph V, Soulage C, Becskei C, Vogel J, Pequignot JM, Ogunshola O,
696 Gassmann M (2005) Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by
697 interacting with brainstem and carotid bodies. *The Journal of physiology*
698 568:559-571.

699 Soliz J, Soulage C, Hermann DM, Gassmann M (2007) Acute and chronic exposure to
700 hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice
701 overexpressing erythropoietin. *American journal of physiology Regulatory,*
702 *integrative and comparative physiology* 293:R1702-1710.

703 Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997)
704 Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to
705 normoxic and hyperoxic hypercapnia. *The Journal of comparative neurology*
706 388:169-190.

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

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

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

715 Voituren N, Jeton F, Cholley Y, Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Quidu P, Favret F,
716 Richalet JP, Pichon A (2014) Catalyzing role of erythropoietin on the nitric
717 oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia.
718 *Physiological reports* 2:e00223.

719 **Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bevengut M, Penton D, Guyenet PG,**
720 **Lesage F, Gestreau C, Barhanin J, Bayliss DA (2013) TASK-2 channels**
721 **contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons.**
722 **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for**
723 **Neuroscience 33:16033-16044.**

724 **Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Ceccherini I, Keens TG, Loghmanee DA, Trang H,**
725 **Subcommittee ATSCCHS (2010) An official ATS clinical policy statement:**
726 **Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and**
727 **management. American journal of respiratory and critical care medicine**
728 **181:626-644.**

729 **Yalcin M, Ak F, Cangul IT, Erturk M (2007) The effect of centrally administered**
730 **erythropoietin on cardiovascular and respiratory system of anaesthetized rats.**
731 **Autonomic neuroscience : basic & clinical 134:1-7.**

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

736

737

738

739 **Competing interests**

740 None

741

742 **Author contributions**

743 A.P. and N.V. designed the experiments. F.J., A.S.P.T., D.M., L.B. and N.V.
744 performed and analysed the histological experiments. F.J., A.P., J.S., R.D.L. and
745 N.V. performed and analysed the physiological experiments. L.B. and N.V. wrote the
746 manuscript. F.J., A.S.P.T., J.S., R.D.L., D.M., A.P., L.B. and J.P.R. discussed the
747 data and revise the manuscript for important intellectual content.

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

751

752

753

754 **Tables**

755 **Table 1 – Average number of C-FOS-positive cells in respiratory areas of the**
 756 **medulla oblongata under normocapnia (Nc) and hypercapnia (Hc) in male wild**
 757 **type (WT) and Epo-TAg^h mice**

	WT		Epo-TAg ^h ⁷⁵⁸	
	Nc	Hc	Nc	Hc
cNTSc	0.8 ± 1.0	1.7 ± 1.4*	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2 ^{\$}
mNTSm	0.7 ± 0.8	2.0 ± 1.0*	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3 ^{\$}
vINTSvl	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
cVLM	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.4
rVLM	0.4 ± 0.3	1.4 ± 0.9*	0.2 ± 0.3	0.7 ± 0.4 ^{\$}
RTN/pFRG	0.6 ± 0.3	2.2 ± 0.9*	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.4* ^{\$}
PP	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.7
RPa	0.8 ± 0.5	2.4 ± 1.1	1.2 ± 1.3	3.6 ± 2.9*
RMg	0.2 ± 0.2	2.2 ± 1.8	0.2 ± 0.3	3.1 ± 3.5*
ROb	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
N7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

759 Mean ± SD. VLM: ventrolateral reticular nucleus of the medulla; RTN/pFRG: retrotrapezoid
 760 nucleus/parafacial respiratory group; RPa: *raphe pallidus* nucleus; RMg: *raphe magnus*
 761 nucleus; ROb: *raphe obscurus* nucleus; PP: Parapyramidal area; cNTS: commissural part of
 762 the nucleus tractus solitary; mNTS: medial part of the nucleus tractus solitary; vINTS:
 763 ventrolateral part of the nucleus tractus solitary; N7: facial nucleus. * p<0.05 Nc vs Hc (same
 764 strain); \$ p<0.05 WT vs EpoTAg^h.

765

766 **Legend for figures**

767

768 **Figure 1 – Chronic Epo-deficiency led to an increase in the ventilatory**
769 **response to hypercapnia with change of ventilatory pattern compared to WT**
770 **mice**

771 Histograms showing mean values of respiratory variables of WT and Epo-TAg^h mice;
772 respiratory frequency (f_R , **Aa**), tidal volume (VT, **Ab**) and minute ventilation (\dot{V}_E , **Ac**)
773 under normocapnia (white bars) and hypercapnia (black bars). Data are expressed
774 as mean \pm SD. *indicates a significant difference between normocapnia vs hypercapnia
775 (same strain) and # indicates a significant difference between WT vs Epo-TAg^h mice.*
776 and # $p < 0.05$.

777

778 **Figure 2 – Epo deficiency affected the medullary respiratory network activated**
779 **by hypercapnia**

780 Drawings locating the structures illustrated in the microphotographs below, *raphe*
781 *pallidus* and *magnus* nuclei (**A**), retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group
782 (RTN/pFRG) (**B**), and nucleus of the solitary tract (**C**). The black box defines the
783 photographed areas. Photomicrographs of sections immunolabelled for c-FOS in WT
784 (**Aa, Ba, Ca, Ac, Bc, Cc**) and Epo-TAg^h (**Ab, Bb, Cb, Ad, Bd, Cd**) mice in *raphe*
785 *magnus* and *raphe pallidus* nuclei (**Aa, Ab, Ac, Ad**) under normocapnia (**Aa, Ac**) and
786 hypercapnia (**Ab, Ad**), in retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (**Ba, Bb,**
787 **Bc, Bd**) under normocapnia (**Ba, Bc**) and hypercapnia (**Bb, Bd**), and in nucleus of
788 the solitary tract (**Ca, Cb, Cc, Cd**) under normocapnia (**Ca, Cc**) and hypercapnia (**Cb,**
789 **Bd**). Black arrows show some c-FOS-positive neurons. Scale bars = 100 μ m.
790 Abbreviations: 7N: facial nucleus; cc: central canal; cNTS: commissural part of the
791 nucleus of the solitary tract; mNTS: medial part of the nucleus of the solitary tract; py:
792 pyramidal tract; RMg: *raphe magnus* nucleus; RPa: *raphe pallidus* nucleus; rs:
793 rubrospinal tract; RTN/pFRG, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group;
794 sp5: spinal trigeminal tract; vINTS, ventrolateral part of the nucleus of the solitary
795 tract.

796

797 **Figure 3 – Serotonergic character of hypercapnic c-FOS positive cells in**
798 **medullary raphe nuclei**

799 Drawings of the medulla oblongata locating 5-HT structures illustrated in the
800 microphotographs below, *raphe magnus* (**A**), *raphe obscurus* (**B**), and *raphe pallidus*
801 nucleus (**C**) nuclei. Scale bar = 100 μ m. The black box defines the photographed
802 areas. Photomicrographs of sections dually immunolabelled for c-FOS and 5-HT in
803 WT (**Aa, Ba, Ca, Ac, Bc, Cc**) and Epo-Tag^h (**Ab, Bb, Cb, Ad, Bd, Cd**) mice in raphe
804 *magnus* nucleus (**Aa, Ab, Ac, Ad**) under normocapnia (**Aa, Ac**) and hypercapnia
805 (**Ab, Ad**), in raphe *obscurus* nucleus (**Ba, Bb, Bc, Bd**) under normocapnia (**Ba, Bc**)
806 and hypercapnia (**Bb, Bd**), and in nucleus *pallidus* nucleus (**Ca, Cb, Cc, Cd**) under
807 normocapnia (**Ca, Cc**) and hypercapnia (**Cb, Bd**). Black arrowed show c-FOS/5-HT-
808 positive neurons. Scale bars = 100 μ m. High magnification in **Cb, Cc** and **Cd**, scale
809 bar = 10 μ m. Abbreviations: py: pyramidal tract; RMg: *raphe magnus* nucleus; ROb:
810 *raphe obscurus* nucleus; RPa: *raphe pallidus* nucleus.

811

812 **Figure 4 – Epo deficiency did not modify *PHOX2B* expression in RTN/pFRG and**
813 **C-FOS positive cells of the RTN/pFRG did not express GFAP in WT and Epo-**
814 **TAg^h mice**

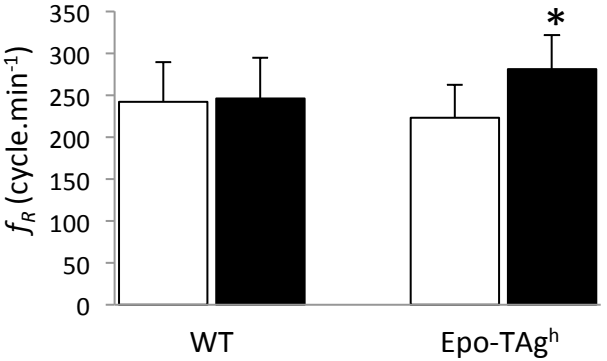
815 Drawings of representative section from the ventral medulla oblongata illustrating the
816 distribution of PHOX2B-positive cells (black points) in the retrotrapezoid
817 nucleus/parafacial respiratory group of WT (**Aa**) and Epo-TAg^h (**Ba**) mice. Scale Bar
818 = 100 μ m. The black box defines the photographed area in the right of drawings.
819 Photomicrographs illustrating the immunolabelling for PHOX2B in the RTN/pFRG of
820 WT (**Ab**) and Epo-TAg^h (**Bb**) mice in normocapnia. Back arrows indicate PHOX2B-
821 positive cells. Scale bar: 10 μ m. Photomicrographs in the RTN/pFRG of a section
822 dually immunolabelled for c-FOS and GFAP in WT (**Ac**) and Epo-TAg^h (**Bc**) mice in
823 hypercapnia. Black arrows show GFAP immunolabelling. Scale bar = 10 μ m.
824 Abbreviations: 7N: facial nucleus; py: pyramidal tract; rs: rubrospinal tract; sp5: spinal
825 trigeminal tract; RPa: *raphe pallidus* nucleus; RTN/pFRG: retrotrapezoid/parafacial
826 respiratory group.

827

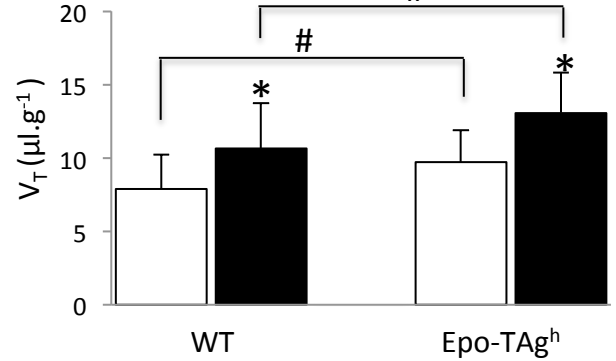
Figure 1

Aa

□ normocapnia
■ hypercapnia



Ab



Ac

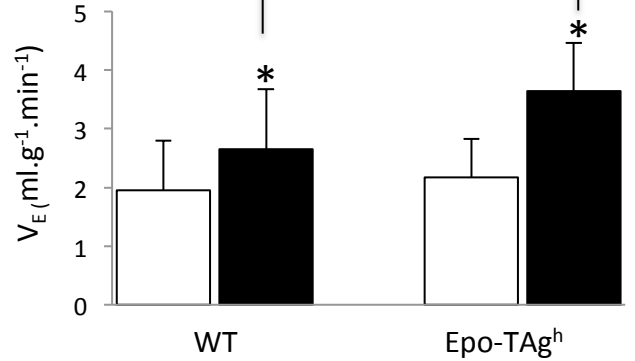


Figure 2

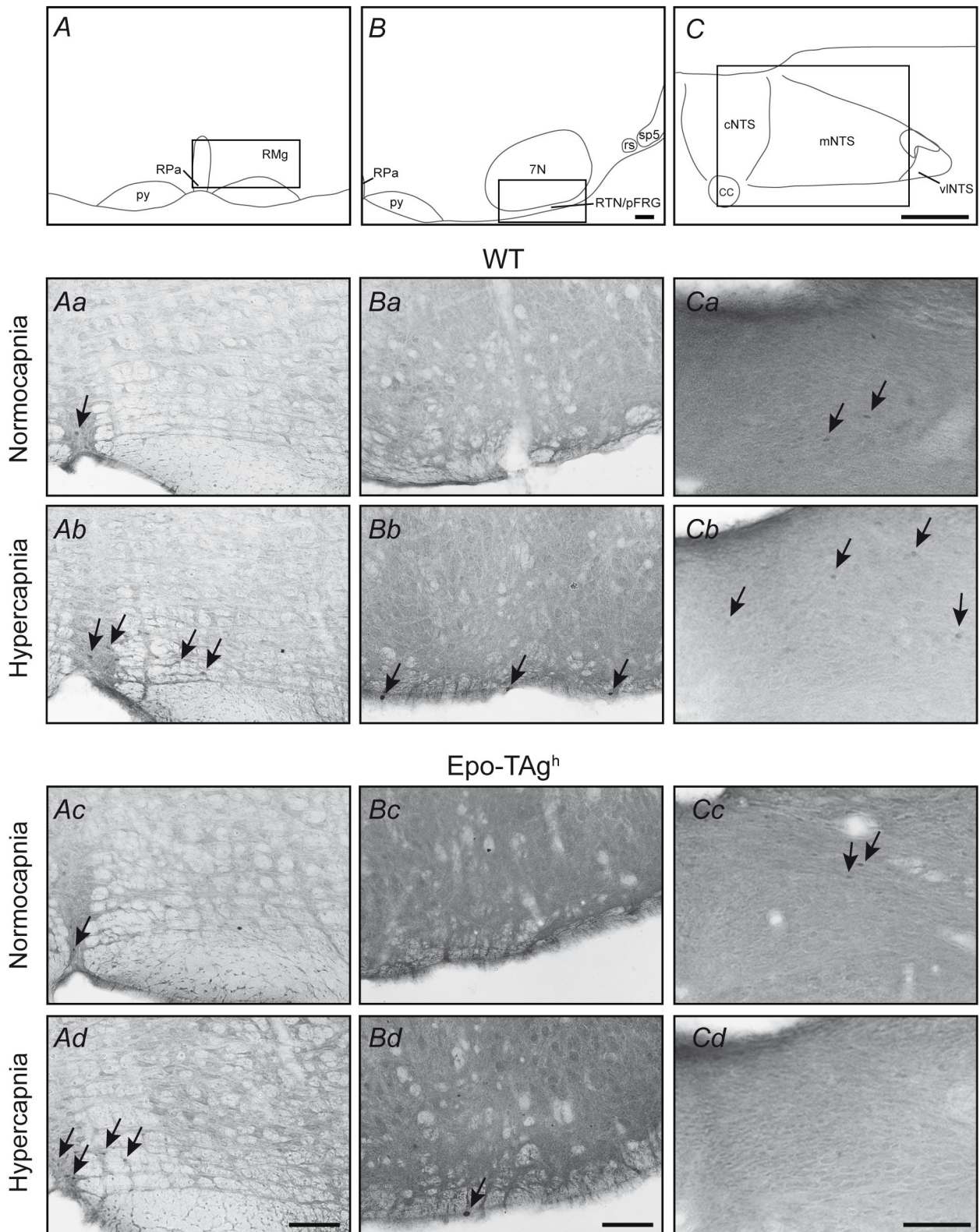
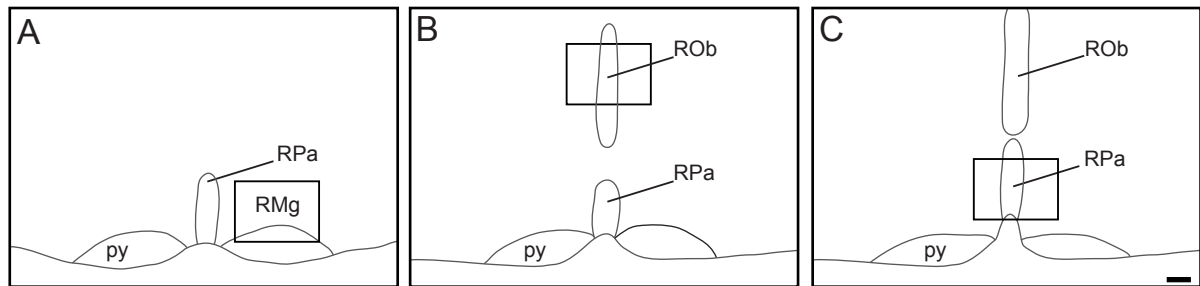
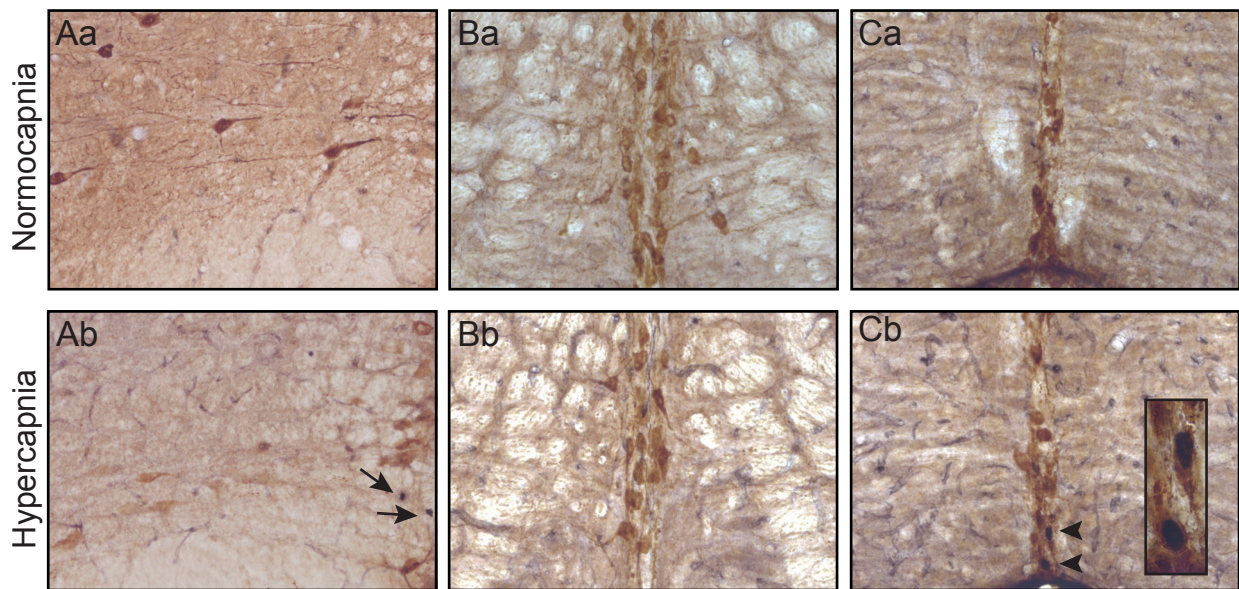


Figure 3



WT



Epo-TAg^h

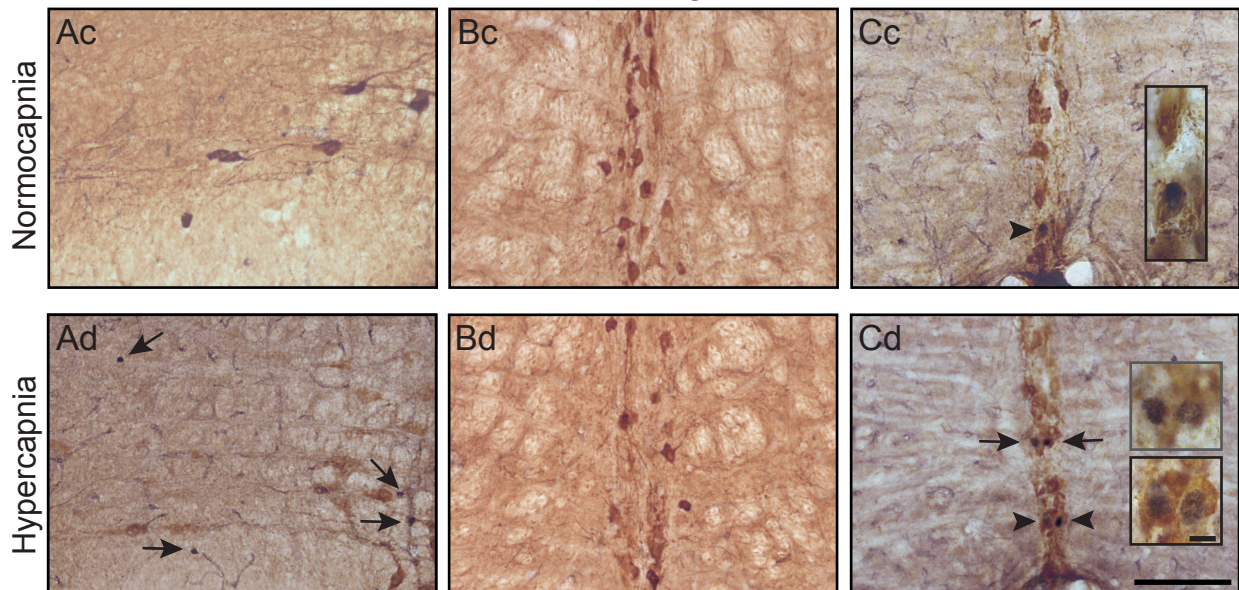
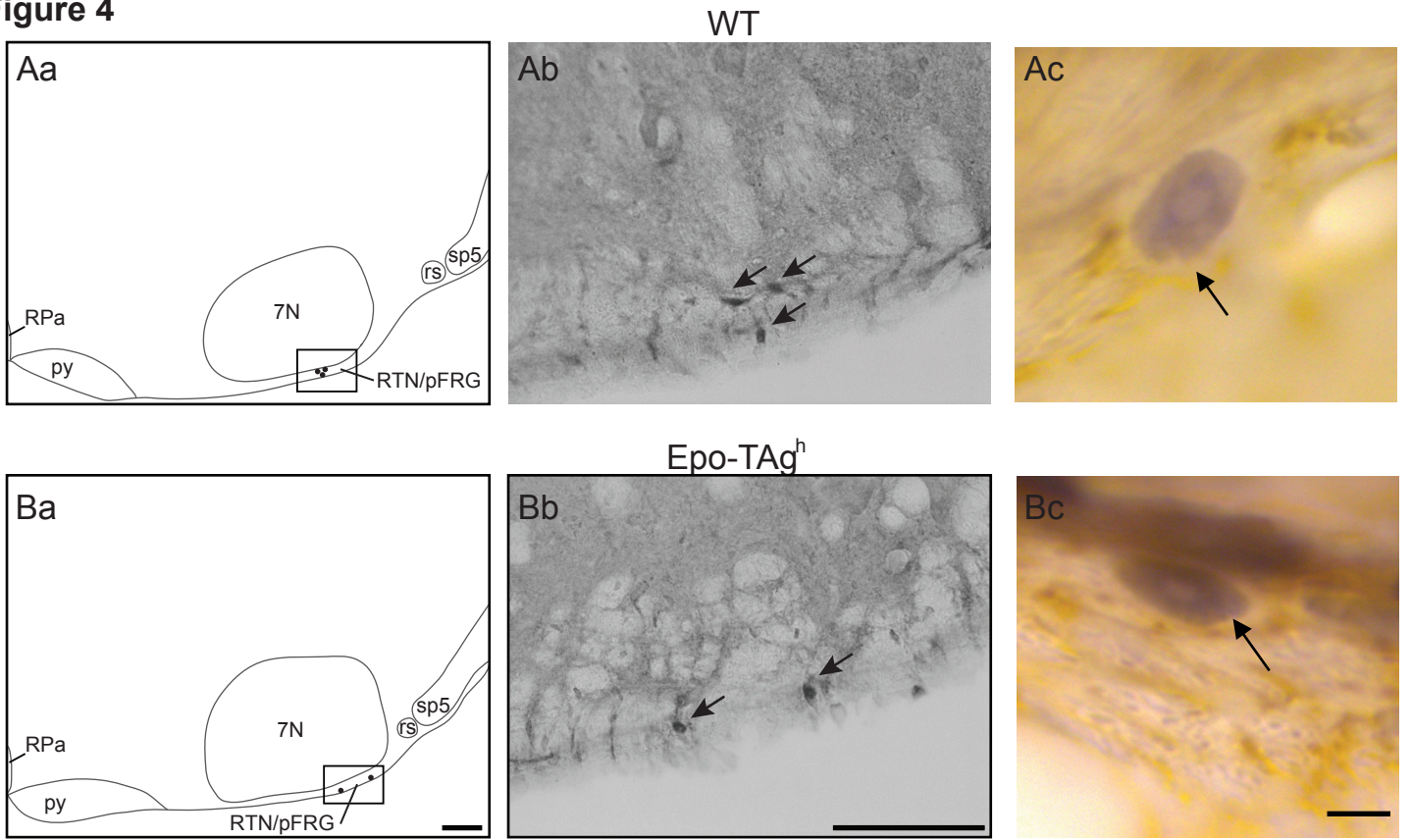


Figure 4



Partie 3: Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie

Un des objectifs de ce doctorat était de caractériser l'effet de la leptine sur la CCR en normocapnie et en hypercapnie et de déterminer ses mécanismes d'action. Pour cela, nous avons cherché à mettre en évidence les effets d'une déficience en leptine sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie à l'aide de souris transgéniques *ob/ob*. Afin de mener à bien cette étude, nous avons évalué les effets d'une déficience en leptine sur :

- les variables ventilatoires en hypercapnie *in vivo* de souris adultes *ob/ob*.
- l'activité neuronale au sein de structures encéphaliques connues pour leur rôle dans la régulation de la ventilation sur des encéphales issus d'adultes *ob/ob* soumis à une hypercapnie *in vivo*.

*Les résultats de ce chapitre donneront lieu à un manuscrit à soumettre prochainement
A l'exception du matériel et méthodes, ce chapitre est rédigé en français*

Implication centrale de la leptine dans la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

Objectif

Etudier les réponses ventilatoires à l'hypercapnie normoxique et hyperoxique de souris *ob/ob* en pléthysmographie afin d'observer la part des effets centraux et/ou périphériques de la déficience en leptine sur la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Caractériser dans un second temps, à l'aide de la détection immunohistochimique de c-FOS, les régions encéphaliques impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie sur des encéphales de souris *ob/ob* préalablement exposées à une hypercapnie-normoxique.

Contexte scientifique

La leptine est un peptide de satiété sécrété principalement par les adipocytes (Cao, 2014) qui traverse la barrière hémato-encéphalique (Banks et al., 1996) et agit par voie neuronale afin de réguler principalement l'appétit et le métabolisme énergétique (Ruffin & Nicolaidis, 2000). Par ailleurs, certaines études rapportent que la leptine régule également la ventilation (Tankersley et al., 1996, O'Donnell et al., 2000, Malli et al., 2010, Bassi *et al.*, 2015a). Tankersley et collaborateurs sont les premiers à montrer que les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) présentent une hypoventilation basale et une réponse à l'hypercapnie diminuée par rapport à celle de souris sauvages et cela avant même l'apparition d'une obésité, suggérant une altération du contrôle ventilatoire due à la déficience en leptine (Tankersley et al., 1996, O'Donnell et al., 1999, O'Donnell et al., 2000, Bassi et al., 2012). L'ajout systémique ou central de leptine chez les souris *ob/ob* corrige leur hypoventilation basale et améliore leur réponse ventilatoire à l'hypercapnie, suggérant un effet stimulant central et/ou périphérique de la leptine sur la ventilation (O'Donnell et al., 2000, Bassi et al., 2012, Bassi et al., 2014). En outre, une étude réalisée chez des rats anesthésiés a montré qu'une perfusion systémique aiguë de leptine pendant 90 minutes entraînait une augmentation durable de l'amplitude de décharge du nerf phrénique pendant plus d'une heure après la fin de la perfusion (Chang et al., 2013). Ces éléments sont à mettre en relation avec le consensus actuel sur le fait que les taux de leptine élevés qui accompagnent l'obésité participent à une élévation de la ventilation contribuant à maintenir des PaCO₂ et PaO₂ adaptés aux besoins de l'organisme (O'Donnell et al., 1999, Phipps et al., 2002, Yee et al., 2006).

Les mécanismes d'action par lesquels la leptine influence la ventilation de base d'une part et la réponse ventilatoire à l'hypercapnie d'autre part restent aujourd'hui peu connus. Certaines études suggèrent que la facilitation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie par la leptine chez les souris *ob/ob* dépende de l'action centrale plus que d'une action périphérique de

la leptine (Inyushkin et al., 2009, Inyushkina et al., 2010, Bassi et al., 2012, Bassi et al., 2014, Bassi et al., 2016). En effet, les récepteurs à la leptine sont présents dans plusieurs régions encéphaliques connues pour avoir un rôle dans l'élaboration et la régulation du rythme respiratoire, notamment le noyau du tractus solitaire (NTS), le locus coeruleus (LC) et le noyau réticulaire bulbaire ventro-latéral rostral (rVLM) (Mercer et al., 1996, Mercer *et al.*, 1998, Elias et al., 2000, Hosoi et al., 2002, Grill & Hayes, 2009, Bassi et al., 2012). En agissant sur les structures encéphaliques impliquées dans la commande centrale respiratoire (CCR) et sa modulation, la leptine pourrait moduler la ventilation basale et la chémoréception centrale au CO_2/H^+ . Cependant, un traitement périphérique par la leptine peut également affecter les systèmes périphériques modulant la ventilation. Des résultats récents indiquant que les récepteurs à la leptine sont présents dans les corps carotidiens (Porzionato *et al.*, 2011, Messenger *et al.*, 2013) et le tissu pulmonaire (Tsuchiya et al., 1999, Hansel *et al.*, 2009) suggèrent que la leptine pourrait également agir par des mécanismes périphériques.

Dans le cas où la modulation de la ventilation par la leptine serait centrale, nous avons émis l'hypothèse que la déficience en leptine des souris *ob/ob* entraîne des remaniements dans l'activation du réseau neuronal respiratoire en hypercapnie qui pourraient expliquer leur phénotype ventilatoire. Par conséquent, nous avons étudié les réponses ventilatoires à l'hypercapnie normoxique et hyperoxique de souris *ob/ob*, l'hyperoxie ayant pour résultante de mettre au silence les chémorécepteurs périphériques, afin d'observer la part des effets centraux et/ou périphériques de la déficience en leptine sur la modulation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Parallèlement à l'étude de la réponse ventilatoire au CO_2 en normoxie, nous avons recherché d'éventuelles différences entre les souris *ob/ob* et leurs témoins au niveau des structures neuronales activées par l'hypercapnie ; notre analyse a été focalisée sur les structures encéphaliques connues pour avoir un rôle dans l'élaboration et la régulation de la CCR. Les résultats obtenus suggèrent que l'effet facilitateur de la leptine sur la ventilation en condition basale et hypercapnique serait largement médié par des mécanismes centraux. D'autre part, la comparaison de l'expression de *c-fos* observée chez les souris sauvages et les souris *ob/ob* nous a permis d'identifier des groupes neuronaux pour lesquels une modification d'activité suggère leur implication dans le phénotype ventilatoire associé à un dysfonctionnement des systèmes leptinergiques.

Matériel et méthodes

Nota Bene : Cette partie a été rédigée en anglais en vue de la soumission de l'étude présentée.

Animals and ethical approval

Plethysmographic ventilatory analysis and immunohistochemical experiments were performed on 36 9-weeks old adult male mice: 18 obese mice ($45.0 \pm 0.5\text{g}$; *Lepr^{ob/ob}* C57BL/6,

referred to as *ob/ob* mice; B6.V-Lepr^{ob}/JRj, Janvier Laboratories) and 18 lean wild-type-like control mice (25.8 ± 0.4 g; *Lepr*^{ob/+} and *Lepr*^{+/+}, referred to as WT mice; Janvier Laboratories).

All experiments were approved by the Charles Darwin Ethics Committee for Animal Experimentation (APAFIS#15017) and were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and 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.

Analysis of acute hypercapnic ventilatory response by whole body plethysmography

- Recording of ventilatory variables

In non-anesthetized and unrestrained mice, ventilatory variables were recorded by whole-body plethysmography (Emka Technologies, France; *ob/ob* n= 18; WT n= 18) (Bartlett & Tenney, 1970, Voituron et al., 2014). The animal chamber (20mL) was connected to a differential pressure transducer (Emka Technologies, France), which measured pressure fluctuations within the chamber, relative to a reference chamber. The differential pressure transduced signals were recorded with IOX (version 2.8.053, Emka Technologies, France). To avoid stress effects on ventilatory variables, mice were habituated in the recording chamber under normoxia/normocapnia (21% O₂/79% N₂) 45 minutes before the experiments.

The day of experiments, after 50 min under normoxia/normocapnia (21% O₂/79% N₂), mice were submitted to either normoxia/hypercapnia (WT, n= 18; *ob/ob*, n = 18) or hyperoxia/hypercapnia (WT, n= 12; *ob/ob*, n = 12). Hyperoxia condition was used to silence breathing modulation by peripheral chemosensors, as according to Dejours test (Dejours, 1962). In both normoxia/hypercapnia and hyperoxia/hypercapnia, animals were exposed to 3%, 5% and 8 % CO₂ (3% CO₂/21% O₂/76% N₂; 5% CO₂/21% O₂/74% N₂ and 8% CO₂/21% O₂/71% N₂ for normoxia/hypercapnia and 3% CO₂/97% O₂; 5% CO₂/95% O₂ and 8% CO₂/92% O₂ for normoxia/hypercapnia). Each condition hypercapnia lasted 10 min before changing to the next CO₂ concentration (Figure 1).

- Analysis of ventilatory variables

Ventilatory variables were breath-by-breath analyzed *i.e.* respiratory frequency, f_R (in cycles.min⁻¹), tidal volume, V_T normalized as the ratio of V_T divided by body weight (in $\mu\text{l.g}^{-1}$) and minute ventilation, \dot{V}_E (in $\mu\text{l.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$). For V_T calculation, the buccal temperature was measured just before placing mice in the recording chamber. Baseline value were defined during the 5 min preceding the hypercapnic exposure (Figure 1). Values from the last 5 min of each hypercapnic episode were used to define respective HC values (Figure 1). Only periods of breathing without body movements were analyzed.

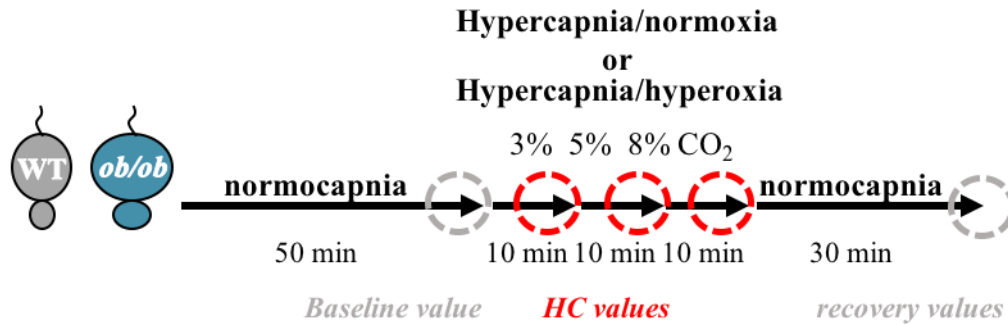


Figure 1. Protocol for measuring in vivo ventilatory parameters in whole body plethysmography

ob/ob and WT mice are placed in the measuring chamber of the plethysmograph and held for 50 minutes in normocapnic conditions. Averages of ventilatory variables recorded during the last 5 minutes of this period are used to obtain the baseline values that reflect the basal ventilatory activity of the mice. Animals are then exposed to several hypercapnic challenges achieved by gradually increasing the proportion of CO₂ in the gas mixture: 10 minutes at 3% CO₂ (hypercapnia-normoxia: 3% CO₂, 21% O₂ and 76% N₂; hypercapnia-hyperoxia: 3% CO₂ and 97% O₂), 10 minutes at 5% CO₂ (hypercapnia-normoxia: 5% CO₂, 21% O₂ and 74% N₂; hypercapnia-hyperoxia: 5% CO₂ and 95% O₂) and lastly 10 minutes at 8% CO₂ (hypercapnia-normoxia: 8% CO₂, 21% O₂ and 71% N₂; hypercapnia-hyperoxia: 8% CO₂ and 92% O₂). Ventilatory variables from hypercapnic conditions (HC) are determined by averaging the ventilatory variables recorded during the last 5 minutes for each condition and represent the HC values. Animals are then placed again in normocapnia for 30 minutes. Averages of ventilatory variables from the last 5 minutes of this period represent the recovery values.

- Statistical analysis

WT and *ob/ob* values are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Kolmogorov-Smirnov test assessed the normality of distribution. The effect of hypercapnia on ventilatory variables and the difference between two hypercapnia protocols within or between *ob/ob* and WT groups was evaluated by two-way ANOVA analysis followed by the Bonferroni multiple comparison test. All analyses were performed with Graphpad Prism 7 (San Diego, California, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Analysis of hypercapnia-responding areas of the brainstem and diencephalon

To localize medullary areas presenting modifications of activity in response to hypercapnia, we analysed *c-fos* expression in WT (n=17) and *ob/ob* (n=18) mice. The c-FOS immunodetection is a classic tool used to identify central pathways involved in specific physiological response that 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 & Leah, 1998, Larnicol et al., 1994, Bodineau et al., 2001, Okada et al., 2002, Perrin-Terrin *et al.*, 2015).

The detection of c-FOS was coupled with that of 5-HT to characterize the cells displaying changes in activity revealed by c-FOS analysis inside the brainstem.

- **Induction of hypercapnia**

Animals were placed in an airtight box ventilated with normoxic/hypercapnic gas mixture (CO₂ 4%, O₂ 21% balanced N₂; WT, n=11 and ob/ob, n=12) or normocapnic gas mixture (O₂ 21% balanced N₂; WT, n=6 and ob/ob, n=6) for 90 min. At the end of the hypercapnic or normocapnic period, mice were deeply anesthetized (intraperitoneal injection of pentobarbital at a sub-lethal dosage, 60-90mg/kg) and transcardially perfused with saline solution (NaCl 0.9%) and then with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH7.4). Brain were removed, postfixed in the same fixative solution for 24h and then cryoprotected in 30% sucrose in 0.1M PBS for 72h. Afterwards, tissues were sliced in a cryostat (Leica CM 1510S) into three separate sets of 40µm-thick serial coronal sections from the caudal edge of the brainstem to the rostral edge of the diencephalon. Sections were stored in 0.1M PB containing 30% sucrose, 30% ethylene glycol, 1% polyvinylpyrrolidone and 0.5% NaCl at -20°C until immunohistochemical staining.

- **Immunohistological procedures**

Coronal sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody against c-FOS (sc-52; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:8000) for 48h at 4° C. They were then incubated for 2h with a biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (BA-1000, Vector Laboratories, Burlington, Canada; 1:500) followed by an avidin-biotin-peroxidase complex (PK-6100, Vector Laboratories; 1:250) for 1h. Peroxidase activity was detected using 0.015% 3,3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.4% nickel ammonium sulfate, and 0.006% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

For coupling of c-FOS and 5-HT co-immunolabelling, *c-fos* expression in brainstem section was first revealed according to the protocol described above. The free-floating sections were then incubated with a rabbit polyclonal antibody directed against 5-HT (S5545, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; 1:500) for 48h at 4°C. Sections were subsequently incubated with a biotinylated goat anti-rabbit antibody for 2h. Sections were then incubated in 1:250 avidin-biotin-peroxidase complex for 1h and ultimately, Peroxidase activity was revealed in 0.015% 3,3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride, and 0.006% H₂O₂ in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) deprived of nickel ammonium sulfate.

During all steps, sections resulting from submission to normocapnic and hyperapnic breathings were processed in parallel. The manufacturer verified the specificity of primary antibodies in all cases and in addition, in the lab control sections were processed in parallel, but with the omission of the primary or secondary antibodies; we observed no labelling in the absence of the primary or secondary antibodies.

Ultimately, sections were mounted in sequential caudo-rostral order on silane-treated slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol (ethanol >99.5% purity, 107017, Merck), cleared with xylene and coverslipped using Entellan with mounting medium (Entellan®, VWR International S.A.S).

Quantitative analysis of the number of c-FOS-positive neurons in response to hypercapnic ventilation

Sections were examined under a light microscope (DM-200-LED; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and regions of interest were photographed with a digital camera (Leica DFC450C, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

We analyzed c-FOS-positive cells in structures of the brainstem and diencephalon related to the respiratory control and its chemical regulation at high magnification (x200) using standard landmarks (Paxinos & Franklin, 2001). The number of c-FOS-positive cells was determined in: A5 pontine nucleus, noradrenergic cell groups (A5), dorsomedial hypothalamic nucleus (DM), dorsolateral periaqueductal gray matter (dIPAG), dorsal periaqueductal gray matter (dPAG), locus coeruleus (LC), lateral hypothalamic area (LH), lateral parabrachial nucleus (IPB), medial parabrachial nucleus (mPB), nucleus of the solitary tract commissural and median part (c/mNTS), and ventrolateral part (vINTS), paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular part (PaLM), paraventricular hypothalamic nucleus, lateral parvocellular part (PaLP), posterior hypothalamic area (PH), parapyramidal area (PP), dorsal raphe nucleus (RDo), raphe magnus nucleus (RMg), raphe obscurus nucleus (ROb), raphe pallidus nucleus (RPa), retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG), ventrolateral reticular nucleus of the medulla (VLM), ventrolateral periaqueductal gray (vIPAG) and ventromedial hypothalamic nucleus (VMH). The definitions of boundaries of these structures were made according to the mouse brain atlas published by Paxinos and Franklin with the aid of numerous ventral, dorsal, and lateral landmarks to delimit the entire volume of each structure (Paxinos & Franklin, 2001).

Counts of c-FOS-positive cells were done by eye. For each analyzed area, the mean number of c-FOS-positive cells per section was calculated on both left and right sides and the mean between sides was calculated side for bilateral structures (dIPAG, dPAG, DM, DR, LC, LH, IPB, mPB, cNTS, mNTS, vINTS, PaLM, PaLP, PH, RDo, RMg, VLM, vIPAG and VMH) and on the entire area for midline structures (ROb and RPa).

For serotonergic brainstem structures (RDo, RMg, ROb and RPa), the proportion of 5-HT-positive cells expressing *c-fos* was calculated by calculating the percentage of c-FOS / 5-HT double-labelled cells from the total number of c-FOS-positive cells inside the respective structures. The procedure of taking the mean between left and right sides in bilateral structures, as described above, was respected here as well.

- Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM of absolute numbers of number of c-FOS-positive cells per brain section for each analyzed structure. Data from WT and *ob/ob* mice under normocapnia or hypercapnia were compared. Kolmogorov-Smirnov test assessed the normality of distribution. Differences between mean numbers of c-FOS-positive cells per structure obtained between conditions (normocapnie *versus* hypercapnia within or between animal

groups WT and *ob/ob*.) were analysed by unpaired *t* test or non-parametric equivalent (Mann-Whitney test). All analyses were performed with Graphpad Prism 7 (San Diego California, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Résultats et discussion

I. La déficience en leptine modifie le phénotype ventilatoire des souris *ob/ob* par rapport aux WT

1. Phénotype ventilatoire des souris *ob/ob* et WT en normocapnie

En normocapnie, les souris *ob/ob* présentent une diminution significative de la \dot{V}_E ($1656 \pm 210,3$ vs $850,9 \pm 71,4 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; - 51,4% ; $p < 0,001$; Figure 1) via une diminution du V_T ($5,8 \pm 0,7$ vs $2,7 \pm 0,1 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$; -53,4% ; $p < 0,001$; Figure 1) et sans modification de la f_R ($347,5 \pm 18,7$ vs $325,9 \pm 13,8$ cycles.min⁻¹) par rapport aux souris WT. Ces observations suggèrent que les souris *ob/ob* présentent une hypoventilation basale. Une mesure métabolique de la PaO_2 et la PaCO_2 pourrait s'ajouter à notre étude pour confirmer si la diminution de la \dot{V}_E que nous avons observée chez les souris *ob/ob* est en lien avec une diminution de la PaO_2 et une augmentation de la PaCO_2 , comme cela a été décrit dans la littérature (O'Donnell et al., 1999). En effet, l'étude qui caractérise pour la première fois l'hypoventilation basale des souris *ob/ob* se base essentiellement sur la mesure des paramètres métaboliques de PaCO_2 et PaO_2 . Dans l'étude pionnière de Tankersley et Collaborateurs, les auteurs n'observent pas de différences significatives au niveau des variables ventilatoires mêmes si le V_T et la \dot{V}_E tendent à diminuer chez de jeunes souris *ob/ob* où l'obésité ne s'est pas encore installée (Tankersley et al., 1996). Ils démontrent que les changements dans la respiration de base de souris *ob/ob* semblent dus à la déficience en leptine mais également en partie à une augmentation du poids corporel en fonction de l'âge (Tankersley et al., 1996). Il semblerait que dans notre étude en plus de la déficience en leptine, le facteur obésité pourrait accentuer l'hypoventilation basale des souris *ob/ob*.

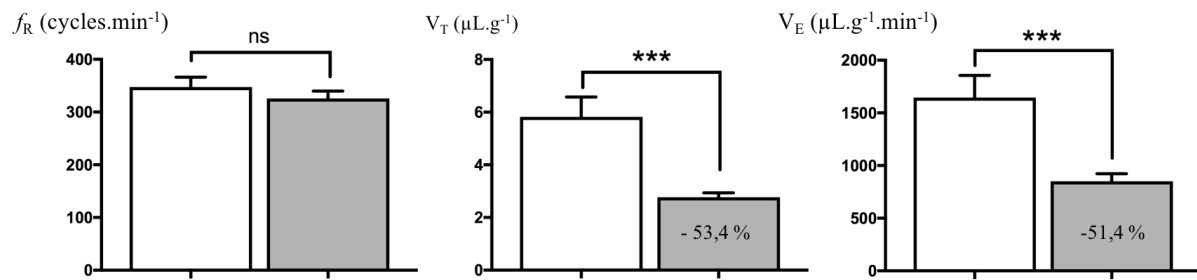


Figure 2. Histogrammes illustrant les moyennes des valeurs absolues \pm SEM de la f_R du V_T et de la \dot{V}_E des souris *ob/ob* et témoins (WT wild type) en normocapnie

indique une différence significative entre les souris *ob/ob* et WT. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; ns : non significatif. La normalité des distributions a été testée selon le test de Kolmogorov-Smirnov (GraphPad Prism7, San Diego, Californie, Etats-Unis). La significativité des différences observées entre les groupes a été évaluée à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivi d'une analyse post test Bonferroni (GraphPad Prism 7, San Diego, Californie, Etats-Unis).

2. Réponses ventilatoires au CO₂ des souris *ob/ob* et WT

Les valeurs des trois variables ventilatoires des souris *ob/ob* et WT (f_R , V_T et \dot{V}_E) ont été exprimées en valeur relative rapportée à la valeur de base (% par rapport aux valeurs de normocapnie) ainsi qu'en valeur absolue au cours des trois différentes périodes d'hypercapnie (3%CO₂; 5%CO₂. 8%CO₂) normoxique ou hyperoxique ; elles sont présentées dans le Tableau 1.

		Hypercapnie-Normoxique		Hypercapnie-Hyperoxique	
		WT n=18 25,8 ± 0,4g	<i>ob/ob</i> n=18 45 ± 0,5g	WT n=12 24,8 ± 0,3g	<i>ob/ob</i> n=12 43,1 ± 0,8g
f_R (cycles.min ⁻¹) ou (% normocapnie)	3% CO ₂	305,1 ± 16,6 92,9 ± 5,4 (%) ns	321,3 ± 10,7 109,9 ± 4,5 (%) ns	340,3 ± 34,1 97,7 ± 6,3 (%) ns	339,1 ± 20,8 97,2 ± 6,3 (%) ns
	5% CO ₂	348,3 ± 18,0 110,3 ± 10,1 (%) ns	349,3 ± 10,5 119,4 ± 5,8 (%) **	373,5 ± 28,5 109,8 ± 7,9 (%) ns	337,5 ± 17,4 98,8±9,9 (%) ns
	8% CO ₂	401,5 ± 9,0 127,7 ± 10,2 (%) **	351,8 ± 7,3 120 ± 4,9 (%) ***	399,2 ± 14,3 121,5 ± 9,9 (%) ns	324,6 ± 10,3 96,4 ± 9,9 (%) ns
V_T (μL.g ⁻¹) ou (% normocapnie)	3% CO ₂	5,6 ± 0,4 106,6 ± 7,0 (%) ns	3,0 ± 0,2 114,6 ± 5,2 (%) *	5,9 ± 0,8 119,3 ± 10,1 (%) ns	3,6 ± 0,3 127,1 ± 5,9 (%) ***
	5% CO ₂	8,7 ± 1,6 163,9 ± 26,9 (%) ***	3,8 ± 0,3 141,6 ± 5,6 (%) ***	5,9 ± 0,8 115,5 ± 6,5 (%) *	4,0 ± 0,4 138,7 ± 5,6 (%) ***
	8% CO ₂	11,0 ± 1,3 199,3 ± 17,4 (%) ***	4,7 ± 0,4 173,7 ± 6,4 (%) ***	8,2 ± 1,1 163,4 ± 12,9 (%) ***	4,7 ± 0,4 162 ± 4,4 (%) ***
\dot{V}_E (μL.g ⁻¹ .min ⁻¹) ou (% normocapnie)	3% CO ₂	1685 ± 185,9 112,8 ± 6,5 (%) ns	953,3 ± 80,9 131,2 ± 9,4 (%) **	2122 ± 483,1 128,6 ± 9,3 (%) *	1208 ± 159,5 128,3 ± 9,1 (%) **
	5% CO ₂	3277 ± 782,8 211,5 ± 36,9 (%) ***	1299 ± 113,4 178,3 ± 13,8 (%) ***	2671 ± 611,1 166 ± 15,2 (%) **	1304 ± 161,8 145,2 ± 15,2 (%) *
	8% CO ₂	3866 ± 384,8 266,6 ± 18,2 (%) ***	1621 ± 145,7 221,2 ± 15,3 (%) ***	3486 ± 744,8 234,5 ± 20,6 (%) ***	1486 ± 124,3 174,2 ± 19,0 (%) **

ns
ns

Tableau 1. Réponse ventilatoire des souris *ob/ob* et WT à une hypercapnie-normoxique ou à une hypercapnie-hyperoxique pour trois fractions de CO₂ différentes

Les moyennes des valeurs relatives et absolues ± SEM de la fréquence respiratoire (f_R), du volume courant (V_T) et de la ventilation minute (\dot{V}_E) sont représentées pour les souris *ob/ob* (gris) et WT (blanc). * indique une différence significative entre les valeurs de base et les valeurs HC intragroupe. # indique une différence significative entre les souris *ob/ob* et WT. Les barres sous le tableau représentent la différence entre les 3 variables ventilatoires pour les 3 conditions d'hypercapnie enregistrées en hypercapnie-normoxique et en hypercapnie-hyperoxique pour les souris *ob/ob* et WT. *ou # p<0,05 ; ** ou ## p<0,01 ; ***ou ### p<0,001 ;

ns : non significatif. La normalité des distributions a été testée selon le test de Kolmogorov-Smirnov (GraphPad Prism 7, San Diego, Californie, Etats-Unis). La significativité des différences observées au sein d'un groupe et entre les groupes a été évaluée à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie d'une analyse post test Bonferroni (GraphPad Prism 7, San Diego, Californie, Etats-Unis).

a. La réponse ventilatoire à l'hypercapnie-normoxique des souris *ob/ob* et WT

- Les souris WT hyperventilent en hypercapnie normoxique principalement du fait d'une augmentation de leur V_T

A la suite d'une exposition croissante de CO_2 en normoxie, les souris WT augmentent leur ventilation par rapport aux valeurs de base à 5% de CO_2 ($215,5 \pm 36,9$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et à 8% de CO_2 ($266,6 \pm 18,2$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) via seulement une augmentation du V_T à 5% de CO_2 ($163,9 \pm 26,9$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et une augmentation du V_T ($199,3 \pm 17,4$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et de la f_R ($127,7 \pm 10,2$ % ; $p < 0,01$; Tableau 1) à 8% de CO_2 par rapport aux valeurs de base. La participation du V_T à l'augmentation de la \dot{V}_E prédomine par rapport à celle de la f_R . Ce schéma de réponse ventilatoire à l'hypercapnie que nous avons observé chez les souris WT est classiquement décrit dans la littérature (Duffin et al., 2000, Ohashi et al., 2013).

- Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie normoxique par une élévation de leur ventilation principalement du fait d'une augmentation de leur V_T

Au cours des différents challenges hypercapniques les souris *ob/ob* ont montré une réponse ventilatoire à l'hypercapnie normoxique. En effet, elles présentent une augmentation de la \dot{V}_E par rapport aux valeurs de base à 3% de CO_2 ($131,2 \pm 9,4$ % ; $p < 0,01$; Tableau 1), 5% de CO_2 ($178,3 \pm 13,8$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et 8% de CO_2 ($221,2 \pm 15,3$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1). La \dot{V}_E augmente via principalement une augmentation de V_T par rapport aux valeurs de base à 3% de CO_2 ($114,6 \pm 5,2$; $p < 0,05$; Tableau 1), 5% de CO_2 ($141,6 \pm 5,6$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et 8% de CO_2 ($173,7 \pm 6,4$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1). De plus, nous avons observé une augmentation de la f_R par rapport aux valeurs de base à de 5% de CO_2 ($119,4 \pm 5,8$ % ; $p < 0,01$; Tableau 1) et à 8 % de CO_2 ($120 \pm 4,9$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1). L'hypercapnie normoxique à 3% de CO_2 est un stimulus suffisant pour observer une augmentation significative de la ventilation par rapport aux valeurs de base chez les souris *ob/ob*, contrairement au souris WT qui ne répondent qu'à partir d'une stimulation à 5% de CO_2 . Il semblerait donc que les souris *ob/ob* aient un seuil de réponse au CO_2 abaissé par rapport aux souris WT. Les souris *ob/ob* pourraient alors présenter d'une part une plus grande sensibilité au CO_2 que les souris WT et donc répondre à un stimulus CO_2 plus faible que les souris WT. D'autre part, les souris *ob/ob* pourraient avoir une $PaCO_2$ plus importante que celle des souris WT qui résulterait de leur hypoventilation basale dès la normocapnie, et donc répondre à un stimulus CO_2 plus faible que les souris WT puisque celui-ci s'ajouterait à leur état hypercapnique basal.

b. Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique entre les souris *ob/ob* et WT

- **Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie normoxique par une élévation de leur ventilation réduite par rapport à celle développée par les souris WT du fait d'une augmentation moindre de leur V_T**

Malgré la persistance d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les souris *ob/ob*, celle-ci est significativement diminuée par rapport à celle des souris WT. En effet nous avons constaté une diminution de la réponse à l'hypercapnie normoxique chez les souris *ob/ob* par rapport au WT à 5% CO₂ ($3277 \pm 728,8$ vs $1299 \pm 113,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; -60,4 % ; $p < 0,001$; Tableau 1) et 8% de CO₂ ($3866 \pm 384,8$ vs $1621 \pm 145,7$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; -58,1% ; $p < 0,001$; Tableau 1). Cette réponse réduite à l'hypercapnie était due à une augmentation plus faible du V_T chez les souris *ob/ob* que chez les souris WT à 5% de CO₂ ($8,7 \pm 1,6$ vs $3,8 \pm 0,3$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$; -56,3% ; $p < 0,001$; Tableau 1) et à 8% de CO₂ ($11 \pm 1,3$ vs $4,7 \pm 0,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$; -57,2% $p < 0,001$; Tableau 1). Nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de la f_R entre les souris *ob/ob* et WT au cours des différents challenges d'hypercapnie normoxie.

c. La réponse ventilatoire à l'hypercapnie-hyperoxique des souris *ob/ob* et WT

- **Les souris WT hyperventilent en hypercapnie hyperoxique exclusivement via une augmentation de leur V_T**

Lors du protocole d'hypercapnie-hyperoxique, nous avons observé une augmentation de la ventilation chez les souris WT par rapport aux valeurs de base à 3% de CO₂ ($128,6 \pm 9,3$ % ; $p < 0,05$; Tableau 1), 5% de CO₂ ($166 \pm 15,2$ % ; $p < 0,01$; Tableau 1) et 8% de CO₂ ($234,5 \pm 20,6$ % ; $p < 0,001$; Tableau 1). Cette augmentation de le \dot{V}_E s'effectue via augmentation significative du V_T à 5% de CO₂ ($115 \pm 6,5\%$; $p < 0,05$; Tableau 1) et 8% de CO₂ ($163,4 \pm 20,6\%$; $p < 0,001$; Tableau 1). L'augmentation de la \dot{V}_E à 3% de CO₂ que nous avons relevée ne se traduit pas par des augmentations significatives du V_T et de la f_R même si nous pouvons noter une tendance à l'augmentation du V_T par rapport aux valeurs de base ($119,3 \pm 10,1\%$; ns ; Tableau 1). Nous n'avons pas observé de différence significative par rapport aux valeurs de base pour la f_R des souris WT.

- **Les souris *ob/ob* hyperventilent en hypercapnie hyperoxique exclusivement via une augmentation de leur V_T**

Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie hyperoxique en augmentant leur \dot{V}_E par rapport aux valeurs de base à base à 3% de CO₂ ($128,3 \pm 9,1\%$; $p < 0,01$; Tableau 1), 5% de CO₂ ($145,2 \pm 15,2\%$; $p < 0,05$; Tableau 1) et 8% de CO₂ ($174,2 \pm 19,0\%$; $p < 0,01$; Tableau 1). La \dot{V}_E augmente via principalement une augmentation de V_T par rapport aux valeurs de base à 3% de CO₂ ($127,1 \pm 5,9$; $p < 0,001$; Tableau 1), 5% de CO₂ ($138,7 \pm 5,6\%$; $p < 0,001$; Tableau 1)

et 8% de CO₂ ($162 \pm 4,4\%$; $p < 0,001$; Tableau 1). Nous n'avons pas observé de différence significative par rapport aux valeurs de base pour la f_R des souris *ob/ob*.

d. Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique entre les souris *ob/ob* et WT

- **Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie hyperoxique par une élévation de leur ventilation réduite par rapport à celle développée par les souris WT du fait d'une augmentation moindre de leur V_T**

La réponse ventilatoire à l'hypercapnie hyperoxique des souris *ob/ob* est significativement diminuée par rapport à celle des souris WT. En effet nous avons constaté une diminution de la réponse à l'hypercapnie hyperoxique chez les souris *ob/ob* par rapport au WT à 8% CO₂ ($3486 \pm 744,8$ vs $1486 \pm 124,3$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; $-57,3\%$; $p < 0,001$; Tableau 1). Cette réponse réduite à l'hypercapnie était due à une augmentation plus faible du V_T chez les souris *ob/ob* que chez les souris WT à 8% de CO₂ ($8,2 \pm 1,1$ vs $4,7 \pm 0,4$ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$; $-42,6\%$ $p < 0,01$; Tableau 1). Nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de la f_R entre les souris *ob/ob* et WT au cours des stimuli d'hypercapnie hyperoxiques.

e. Comparaison des réponses ventilatoires à l'hypercapnie-normoxique et à l'hypercapnie-hyperoxique des souris *ob/ob* et WT

- **L'hyperventilation hypercapnique sous hyperoxie des souris WT n'est pas significativement différente de celle développée en hypercapnie normoxique bien qu'elle tende à être diminuée**

La mise sous silence des chémorécepteurs périphériques grâce à la condition d'hyperoxie ne change pas significativement la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris WT puisque la comparaison des réponses ventilatoires hypercapniques normoxique et hyperoxique ne montre aucune différence significative pour toutes les fractions de CO₂ même si on peut constater en hyperoxie une tendance à ce que l'augmentation du V_T et de la \dot{V}_E soit inférieure à 5 et 8% de CO₂ à ce qui est observé en hypercapnie normoxique. Cependant, alors qu'à 5% de CO₂ la manière de répondre à l'hypercapnie hyperoxique via une augmentation du V_T est la même que celle observée lors de l'hypercapnie normoxique, à 8% de CO₂, nous avons constaté une perte de l'augmentation de la f_R par rapport à l'hypercapnie normoxique. De plus, nous avons relevé une augmentation de la \dot{V}_E à 3% de CO₂ non visible en hypercapnie-normoxique sans que des augmentations significatives du V_T et de la f_R soient observées même si nous pouvons noter une tendance à l'augmentation de ces deux variables par rapport à l'hypercapnie normoxique. Les chémorécepteurs périphériques ne semblent donc pas participer de manière efficiente à la mise en place de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez la souris WT.

- **Comme pour les souris WT, l'hyperventilation hypercapnique sous hyperoxie des souris *ob/ob* n'était pas significativement différente de celle développée en normoxie bien qu'elle tende à être diminuée**

La mise sous silence des chémorécepteurs périphériques en hypercapnie n'a pas changé significativement l'augmentation de la \dot{V}_E et du V_T observée en comparaison de l'hypercapnie normoxique. Cependant, de la même manière que pour les souris WT, nous avons observé une perte d'augmentation de la f_R . Là encore, les chémorécepteurs périphériques ne semblent donc pas participer de manière efficiente à la mise ne place de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez la souris *ob/ob* même s'ils y contribuent dans une moindre part.

II. La déficience en leptine modifie l'expression de *c-fos* de base et induite par l'hypercapnie chez les souris *ob/ob* par rapport aux WT

Les valeurs moyennes du nombre de neurones c-FOS positifs par coupe dans les différentes structures, en lien avec la commande centrale respiratoire, du bulbe rachidien, du pont, du mésencéphale et du diencephale sont présentées dans le Tableau 2.

		WT		Ob/Ob	
		Normocapnie	Hypercapnie	Normocapnie	Hypercapnie
Bulbe rachidien	c/mNTS	2,98 ± 0,16	12,42 ± 0,90	32,62 ± 4,91 #	30,64 ± 1,40 ###
	vINTS	0,22 ± 0,11	2,28 ± 0,48	3,67 ± 0,72 #	2,94 ± 0,33
	RMg	4,33 ± 0,30	3,11 ± 0,30	4,21 ± 0,57	1,22 ± 0,26 ###
	RPa	3,27 ± 0,25	3,53 ± 0,22	3,86 ± 0,95	3,11 ± 0,19
	ROb	2,60 ± 0,18	2,22 ± 0,37	15,49 ± 2,77 #	6,41 ± 0,50 ###
	VLM	0,29 ± 0,04	3,13 ± 0,49	2,64 ± 0,81 #	2,65 ± 0,48
	PP	0,10 ± 0,04	0,68 ± 0,17	0,23 ± 0,11	0,07 ± 0,02 ##
	RTN/pFRG	0,09 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,38 ± 0,22	0,84 ± 0,14 ###
Pont	LC	4,01 ± 0,69	8,65 ± 1,30	4,87 ± 2,28	6,47 ± 1,14
	A5	0,13 ± 0,13	0,38 ± 0,21	1,08 ± 0,65	0,47 ± 0,24
	IPB	2,13 ± 0,81	8,02 ± 1,63	15,80 ± 2,63 #	14,08 ± 2,53
	mPB	2,28 ± 0,56	3,62 ± 0,72	6,97 ± 1,97	4,38 ± 0,77
Mésencéphale	dPAG	10,39 ± 0,49	6,17 ± 1,46	6,66 ± 1,49 #	4,05 ± 1,16
	dIPAG	25,51 ± 4,20	27,78 ± 2,96	27,34 ± 4,79	24,09 ± 1,63
	vIPAG	12,61 ± 1,58	22,08 ± 2,20	20,36 ± 4,60	20,57 ± 2,96
	RDo	21,44 ± 1,82	33,54 ± 3,87	26,36 ± 5,50	24,49 ± 2,03
Diencephale	PH	55,69 ± 3,99	71,34 ± 9,07	42,51 ± 11,59	49,99 ± 8,34
	DM	27,96 ± 3,79	36,24 ± 7,08	37,9 ± 7,73	29,03 ± 3,76
	LH	39,57 ± 5,19	45,46 ± 6,60	29,28 ± 4,66	33,29 ± 6,57
	VMH	21,38 ± 6,87	20,23 ± 2,78	38,48 ± 8,93	22,81 ± 3,42
	PaLP	17,83 ± 7,37	33,95 ± 8,36	17,29 ± 5,38	36,74 ± 5,64
	PaLM	32,75 ± 10,54	43,78 ± 5,88	51,71 ± 8,54	58,83 ± 7,95
	Arc	21,86 ± 4,20	28,72 ± 6,21	34,22 ± 5,1	36,44 ± 4,99

Tableau 2. Nombre moyen de neurones c-FOS-positifs par coupes dans les structures du tronc cérébral et du diencephale impliquées dans l'élaboration ou la régulation de la commande centrale respiratoire chez des souris *ob/ob* et WT après une exposition gazeuse normocapnique ou hypercapnique/normoxique.

Nombre moyen de neurones c-FOS ± SEM. * indique une différence significative entre WT ou *ob/ob* normocapnie et WT ou *ob/ob* hypercapnie ; # indique une différence significative entre WT normocapnie et *ob/ob* normocapnie ou WT hypercapnie et *ob/ob* hypercapnie. * ou # p<0,05 ; ** ou ## p<0,01 ; *** ou ### p<0,001. La normalité des distributions a été testée selon le test de Kolmogorov Smirnov (GraphPad Prism 7, San Diego, Californie, Etats-Unis). La différence entre le nombre moyen de neurones c-FOS-positifs par structure obtenu dans les différentes conditions a été évaluée à l'aide d'un test de Mann-Whitney (GraphPad Prism 7, San Diego, Californie, Etats-Unis).

1. Conséquence de l'absence de leptine sur l'expression de *c-fos* en normocapnie

- Au niveau du bulbe rachidien.

Les souris *ob/ob* ont présenté un nombre moyen de neurones c-FOS positifs plus important que celui observé chez les souris WT dans le c/mNTS (+995% ; $p < 0,05$; Figure 2, Tableau 2), le vlNTS (+1568% ; $p < 0,05$; Tableau 2), le ROb (+496% ; $p < 0,05$; Figure 3, Tableau 2), et la VLM (+810% ; $p < 0,05$; Figure 4, Tableau 2). Le nombre moyen de neurones c-FOS positifs était inchangé chez les souris *ob/ob* comparé aux souris WT dans le RPa, le RMg, le PP et le RTN/pFRG (Tableau 2).

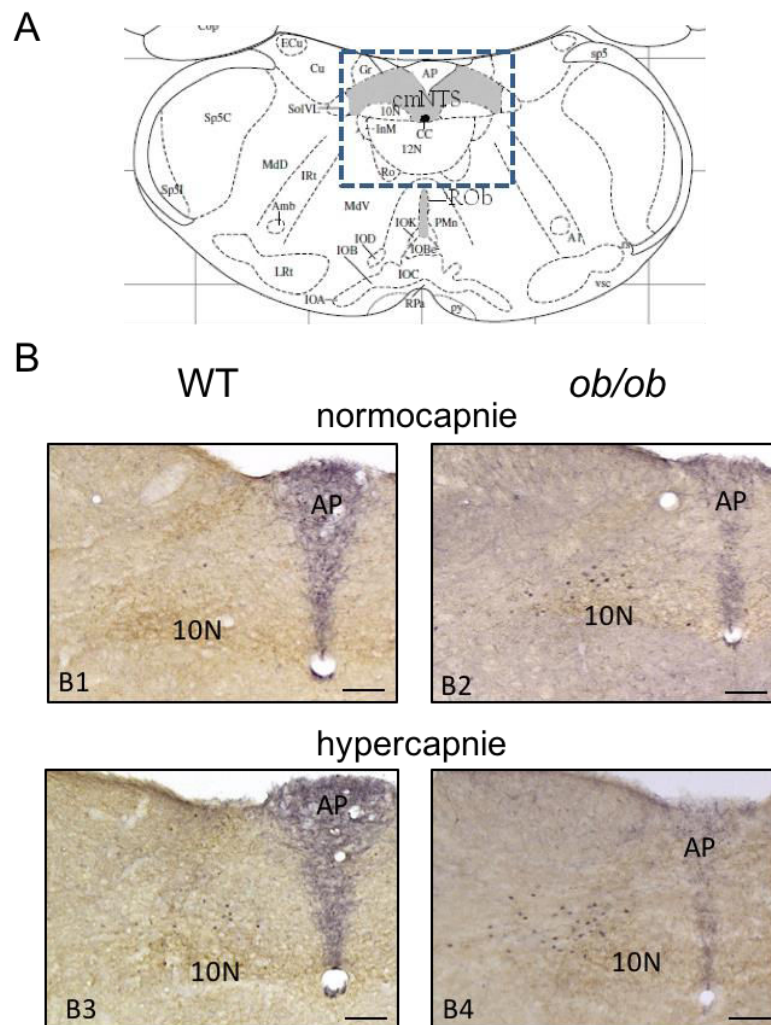


Figure 2. Illustration des neurones c-FOS positifs dans le c/mNTS

A. Schéma d'une coupe transversale de bulbe rachidien de souris adulte (Bregma -7,64 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). La région grisée correspond au c/mNTS et l'encadré en pointillé bleu à la prise de vue.

B. Microphotographies au niveau du *c/mNTS* de souris adultes : WT (B1) et *ob/ob* (B2) en normocapnie ; WT (B3) et *ob/ob* (B4) en hypercapnie. Barre d'échelle=100 μ m. Notez que le *c/mNTS* est situé au-dessus du noyau moteur dorsal du nerf vague (10N) et de part et d'autre de l'area postrema (AP).

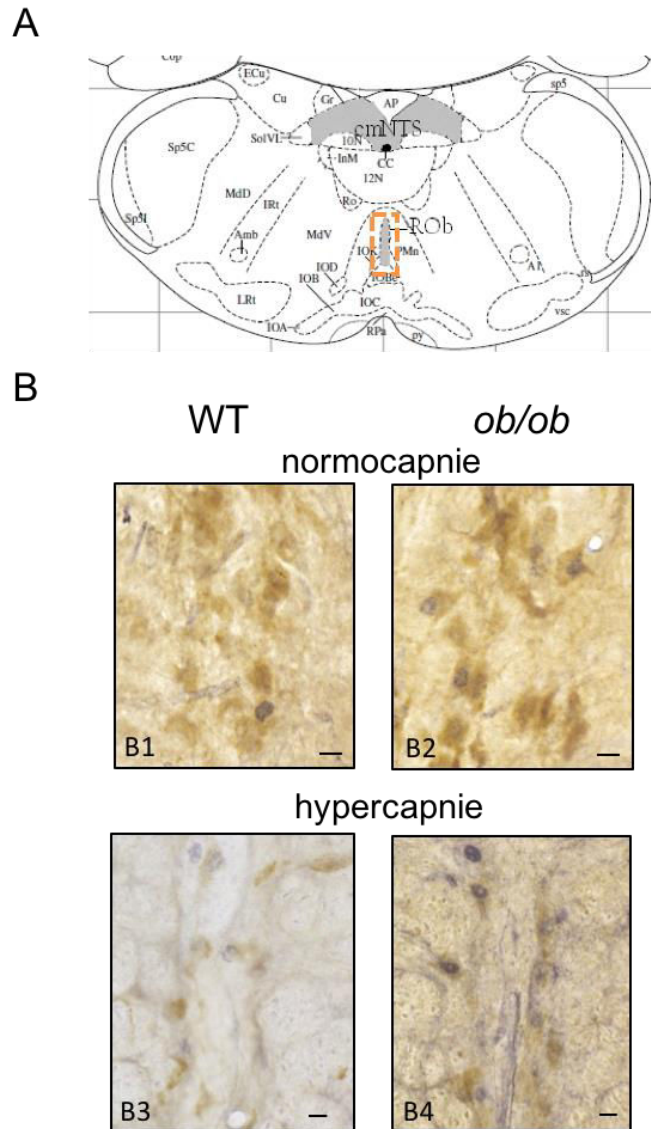


Figure 3. Illustration des neurones c-FOS positifs dans le ROB

A. Schéma d'une coupe transversale de bulbe rachidien de souris adulte (Bregma -7,64 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). L'encadré en pointillé orange représente la prise de vue pour illustrer le ROB.

B. Microphotographies de souris adultes : WT (B1) ou *ob/ob* (B2), en normocapnie et WT (B3) ou *ob/ob* (B4) en hypercapnie. Certains neurones c-FOS positifs ont un marquage cytoplasmique (marron) positif pour 5-HT. Barre d'échelle = 10 μ m.

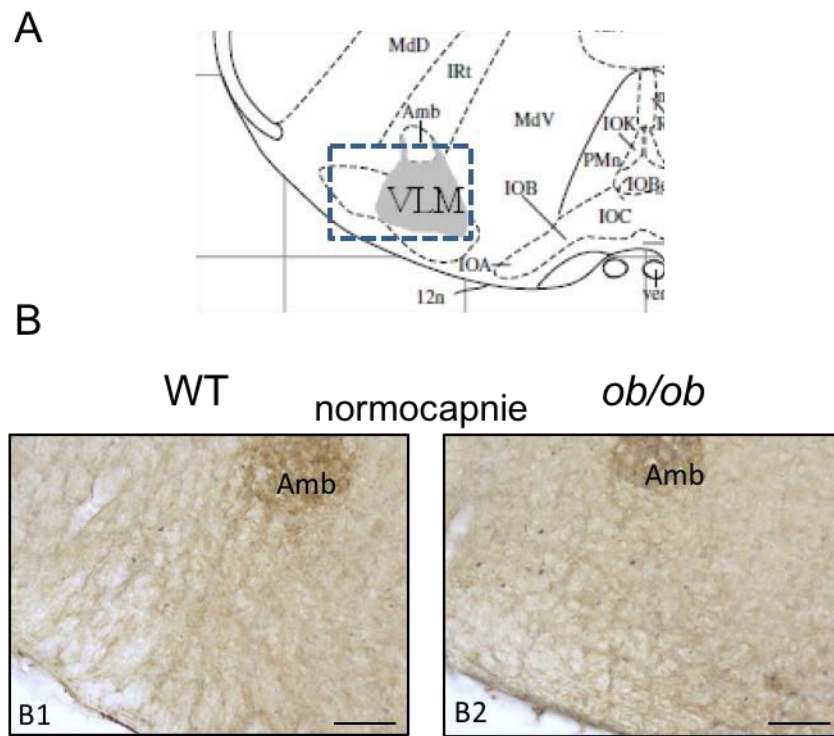


Figure 4. Illustration des neurones c-FOS positifs dans la VLM

A. Schéma d'une coupe transversale de bulbe rachidien de souris adulte (Bregma -7,76 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). La zone grisée indique la VLM et l'encadré en pointillé bleu la prise de vue.

B. Microphotographies au niveau de la VLM de souris adultes : WT (B1) et *ob/ob* (B2) en normocapnie. Barre d'échelle = 100µm. Notez que la VLM est située à proximité du noyau ambigu (Amb).

- Au niveau du pont

Nous n'avons pas observé de modification significative du nombre de neurones c-FOS positifs en normocapnie entre les souris *ob/ob* et WT dans les structures pontiques, excepté au niveau du IPB (+642% ; $p < 0,05$; Figure 5, Tableau 2).

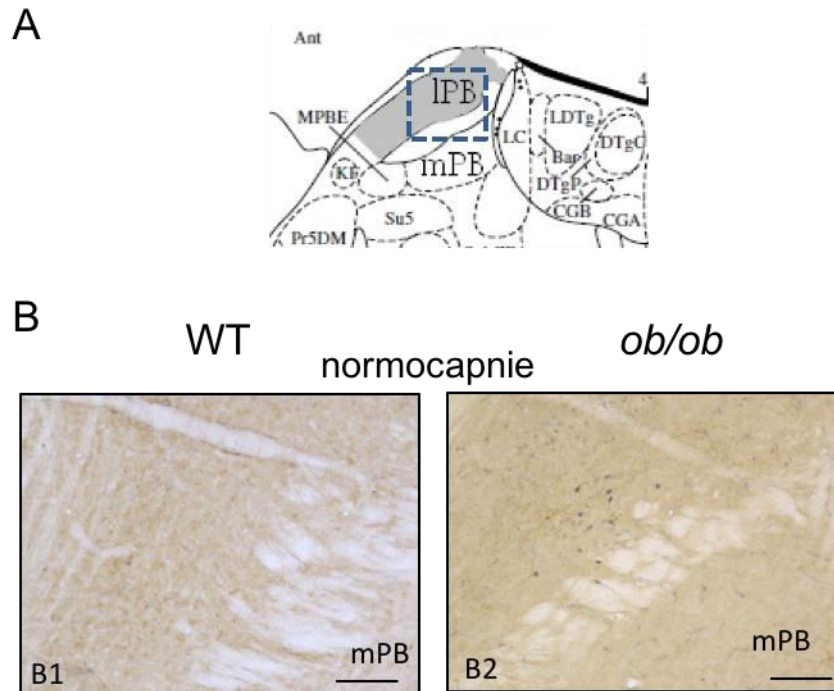


Figure 5. Illustration des neurones c-FOS positifs dans le IPB.

A. Schéma d'une coupe transversale de pont de souris adulte (Bregma -5,34 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). La zone grisée correspond au IPB et l'encadré en pointillé bleu à la prise de vue.

B. Microphotographies au niveau du IPB de souris adultes : WT (B1) et ob/ob (B2) en normocapnie. Barre d'échelle = 100 μ m.

- Au niveau du mésencéphale

Nous avons observé une diminution du nombre moyen de neurones c-FOS positifs dans la dPAG (-56% ; $p < 0,05$; Figure 6, Tableau 2) mais pas de variation significative dans la dIPAG, la vIPAG et le RDo (Tableau 2).

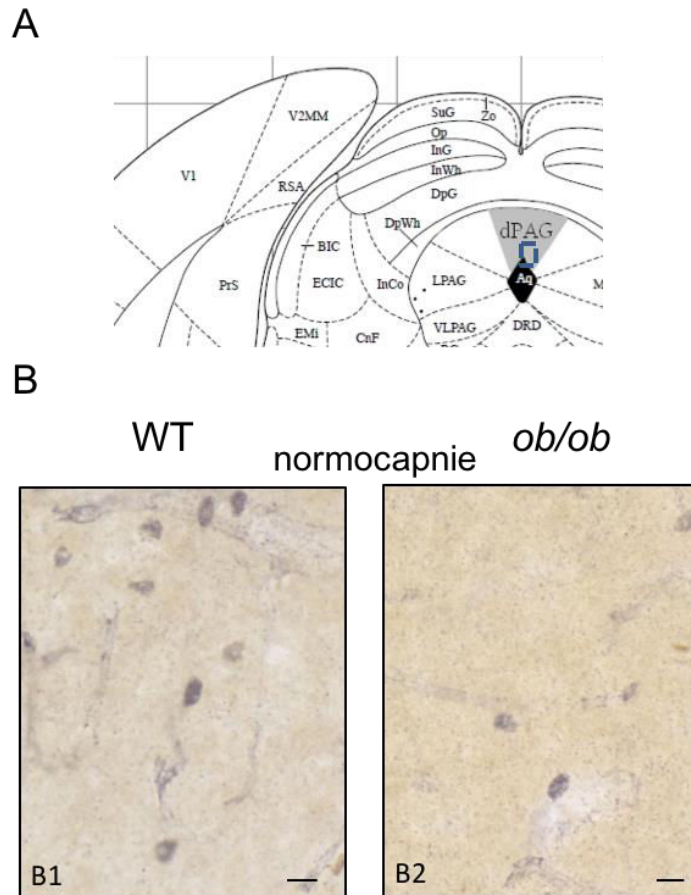


Figure 6 : Illustration des neurones c-FOS positifs dans la dPAG.

A. Schéma d'une coupe transversale de pont de souris adulte (Bregma -4,48 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). La zone grisée correspond à la dPAG et l'encadré en pointillé bleu à la prise de vue.

B. Microphotographies au niveau de la dPAG de souris adultes : WT (B1) et *ob/ob* (B2) en normocapnie. Barre d'échelle = 10 μ m.

- Au niveau du diencéphale

Nous n'avons pas observé de différence significative entre le nombre de neurones c-FOS-positifs des structures diencéphaliques des souris *ob/ob* et WT en normocapnie.

2. Induction de l'expression de *c-fos* par l'hypercapnie chez les souris WT et *ob/ob*

- Au niveau du bulbe rachidien

L'hypercapnie a induit une forte augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs chez les souris sauvages dans le c/mNTS (+317% ; $p < 0,01$; Figure 2, Tableau 2), le vINTS (+936% ; $p < 0,01$; Tableau 2), et la VLM (+979% ; $p < 0,01$; Figure 4, Tableau 2). Nous n'avons pas observé de variation du nombre de neurones c-FOS positifs chez les souris sauvages dans le ROb, le RPa, le RMg, le PP et le RTN/pFRG en hypercapnie. (Tableau 2). La comparaison du pourcentage de neurones c-FOS positifs qui sont sérotoninergiques en normocapnie et en

hypercapnie au niveau du RPa, ROb et RDo, ne montre aucune différence chez les souris WT (données non communiquées).

Comme les souris WT, les souris *ob/ob* présentent une absence de variation du nombre de neurones c-FOS positifs dans RPa, le PP et le RTN/pFRG. Contrairement aux souris WT, nous n'avons pas observé de variation du nombre de neurones c-FOS positifs chez les souris *ob/ob* en hypercapnie dans la VLM, le vlNTS et le c/mNTS (Tableau 2). Enfin, L'hypercapnie a induit une diminution du nombre de neurones c-FOS positifs chez les souris *ob/ob* dans le RMg (-71% ; $p < 0,05$; Tableau 2) et le ROb (-59% ; $p < 0,05$; Tableau 2), ce qui n'était pas observable chez les WT. Chez les souris *ob/ob*, la proportion de neurones doublement marqués c-FOS/5-HT était inchangée en hypercapnie en comparaison de la normocapnie dans les raphés (données non communiquées).

- **Au niveau du Pont**

En réponse à un stimulus hypercapnique, le nombre de neurones c-FOS positifs des souris WT a été augmenté dans le LC (+116 % ; $p < 0,05$; Tableau 2) et dans le IPB (+277 % ; $p < 0,05$; Figure 4 ; Tableau 2). Cependant nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de la région A5 et du mPB.

Contrairement aux souris WT, l'hypercapnie n'a pas induit de différence significative dans l'expression de *c-fos* au niveau du LC et du IPB. Par ailleurs, les autres structures pontiques ne présentaient pas de modification d'expression de *c-fos*.

- **Au niveau du mésencéphale**

Une augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs était visible dans la vlPAG (+75% ; Tableau 2) et dans le RDo (+56% ; Tableau 2) chez les souris WT entre les conditions de normocapnie et d'hypercapnie. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les structures mésencéphaliques dPAG et dlPAG entre la normocapnie et l'hypercapnie chez les souris WT.

Contrairement aux souris WT, la stimulation hypercapnique n'a pas induit de différence significative dans l'expression de *c-fos* pour chacune des structures étudiées du mésencéphale chez les souris *ob/ob*.

- **Au niveau du diencephale**

Nous n'avons pas observé d'augmentation significative des neurones c-FOS-positifs dans les structures diencephaliques d'intérêt après une exposition à une hypercapnie chez les souris WT.

En revanche, la stimulation à l'hypercapnie a induit une augmentation significative des neurones c-FOS-positifs (+ 112,5% ; $p < 0,05$; Tableau 2) uniquement pour la structure diencephalique PaLP chez les souris *ob/ob*.

3. Comparaison du niveau d'expression de *c-fos* en hypercapnie entre les souris WT et les souris *ob/ob*

- Au niveau du bulbe rachidien

Le nombre moyen de neurones c-FOS positifs observés en hypercapnie était significativement augmenté chez les souris *ob/ob* par rapport aux souris WT dans le c/mNTS (+147% ; $p < 0,0001$; Figure 4, Tableau 2), le ROb (+189% ; $p < 0,0001$; Figure 4, Tableau 2), et le RTN/pFRG (+740% ; $p < 0,001$; Figure 8). En revanche, le nombre moyen de neurones c-FOS positifs observés en hypercapnie était significativement diminué chez les souris *ob/ob* par rapport aux souris WT dans le RMg (-51% ; $p < 0,001$; Figure 9 ; Tableau 2) et le PP (-90% ; $p < 0,001$; Tableau 2). Enfin, le nombre moyen de neurones c-FOS positifs que nous avons observés en hypercapnie est inchangé chez les souris *ob/ob* par rapport aux souris WT dans le RPa, la VLM et le vlNTS (Tableau 2). Enfin, la comparaison de la proportion de neurones sérotoninergiques parmi les neurones c-FOS positifs entre les souris WT et les souris *ob/ob* en hypercapnie montre qu'à l'exception du RDo et du RMg pour lesquels nous n'avons observé de modification, les neurones sérotoninergiques représentaient une plus grande partie de la population de neurones c-FOS positifs chez les souris *ob/ob* (RPa, +81%, $p < 0,05$; ROb, +100 %, $p < 0,05$; données non montrées).

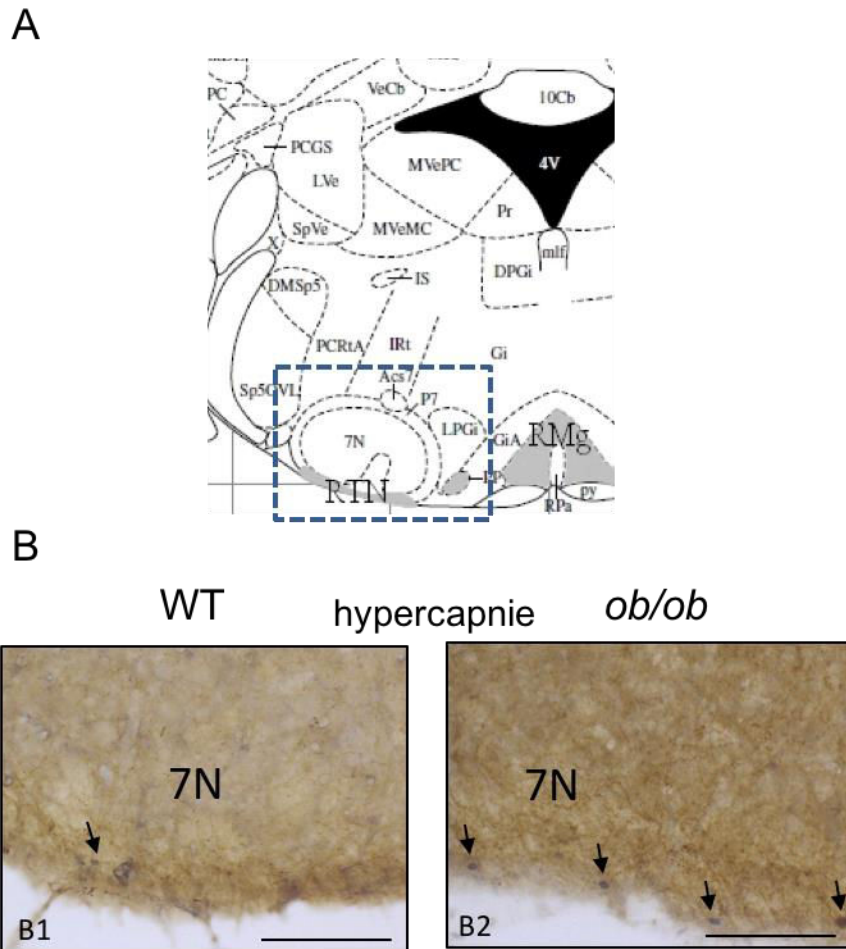


Figure 8. Illustration des neurones c-FOS positifs dans le RTN/pFRG

A. Schéma d'une coupe transversale de bulbe rachidien de souris adulte (Bregma -6,12 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). L'encadré en pointillés bleu correspond à la prise de vue pour illustrer le RTN/pFRG.

B. Microphotographies au niveau du RTN/pFRG de souris adultes : WT (**B1**) et *ob/ob* (**B2**) soumises à l'hypercapnie. Barre d'échelle = 100µm. Notez que le RTN et le pFRG avec lequel il est confondu, sont situés ventralement sous le noyau moteur facial (7N).

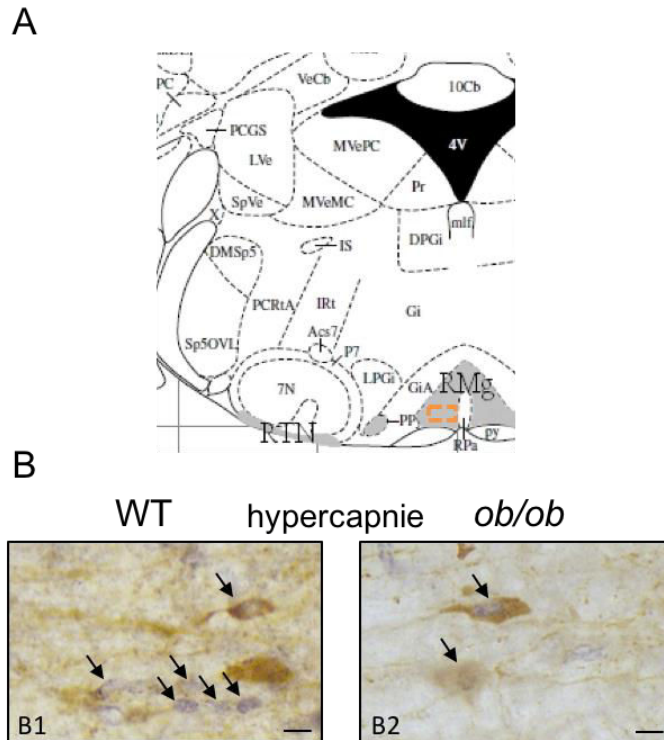


Figure 9. Illustration des neurones c-FOS positifs dans le RMg

A. Schéma d'une coupe transversale de bulbe rachidien de souris adulte (Bregma -6,12 mm), adapté de l'atlas Paxinos et Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). L'encadré en pointillé orange indique la prise de vue des microphotographies pour illustrer le RMg.

B. Microphotographies au niveau du RMg de souris adultes : WT (B1) et *ob/ob* (B2) maintenues en hypercapnie. Les flèches indiquent des neurones c-FOS positifs. Certains neurones c-FOS positifs ont un marquage cytoplasmique (marron) positif pour 5-HT. Barre d'échelle = 10 μ m.

- Au niveau du pont et du mésencéphale

En hypercapnie, le nombre moyen de neurones c-FOS positifs, dans les structures pontiques LC, A5, IPB, mPB, et mésencéphaliques dPAG, dlPAG, vlPAG n'était pas différent entre les souris *ob/ob* et les souris WT (Tableau 2).

- Au niveau du diencéphale

Nous n'avons pas observé de différence entre les souris *ob/ob* et WT au niveau des structures diencéphaliques.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent chez les souris *ob/ob* un profil ventilatoire basal caractérisé par une hypoventilation qui dépendrait d'une part de leur déficience en leptine et d'autre part de leur poids corporel. De plus, malgré la persistance d'une réponse ventilatoire à

l'hypercapnie chez les souris *ob/ob*, les résultats révèlent une réponse ventilatoire hypercapnique diminuée par rapport aux souris WT qui semblerait dépendre en grande partie de mécanismes centraux. La comparaison de l'expression de *c-fos* observée chez les souris WT et *ob/ob* en normocapnie et en hypercapnie nous a permis par la suite d'identifier des groupes neuronaux pour lesquels une modification d'activité suggère leur implication dans le phénotype ventilatoire associé à un dysfonctionnement des systèmes leptinergiques. En effet, la déficience en leptine induit d'une part une élévation du nombre de neurones c-FOS positifs en normocapnie, dans le NTS, la VLM, le IPB et le ROb, et d'autre part provoque l'absence de l'augmentation d'expression de *c-fos* observée en présence de leptine lors d'une hypercapnie. Une des hypothèses est que cette absence d'activation participe au moins en partie à la réduction de la réponse respiratoire au CO₂ des souris déficientes en leptine.

Ces travaux permettent de caractériser l'activation du réseau neuronal respiratoire lors d'une hypercapnie en cas de déficience en leptine et donc de mieux comprendre les mécanismes d'action centraux des systèmes leptinergiques sur la ventilation. Cela pourrait permettre de dégager d'éventuelles cibles pour le traitement des patients qui souffrent de syndrome d'hypoventilation centrale dont certains sont caractérisés par une diminution de la chémosensibilité centrale au CO₂.

Ce travail donnera lieu à :

- 1 manuscrit à soumettre dans *Journal of Physiology*

Central involvement of leptin in the modulation of the ventilatory response to hypercapnia

Perrin-Terrin AS, Barka B, Hui M, Frugiere A, Voituron N*, Bodineau L*

*co-dernier auteurs

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce chapitre sera consacré à la discussion des résultats obtenus dans chacune des différentes parties. Nous y aborderons les limites de nos études, les mécanismes potentiellement à l'origine des effets observés ainsi que les perspectives utiles à la poursuite du travail entamé.

Considérations méthodologiques

I. La préparation de système nerveux central isolée, un modèle pour accéder à la CCR

La technique d'enregistrements électrophysiologiques sur des préparations de SNC isolé (Adrian & Buytendijk, 1931, Suzue, 1984) est une technique largement utilisée dans ce travail doctoral. Ces préparations constituent un modèle privilégié pour l'étude des mécanismes centraux impliqués dans l'adaptation de la CCR ; elles nous ont permis d'étudier les effets centraux de l'ETO, de l'Epo et de la leptine sur la CCR (Brockhaus *et al.*, 1993).

Dans le cadre de ce travail doctoral, nous avons utilisé des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris nouveau-nées qui présentent de nombreux avantages (Johnson *et al.*, 2012). Leur principal avantage est qu'elles préservent l'intégrité du réseau neuronal respiratoire bulbaire qui génère le rythme respiratoire. Ce rythme est directement enregistrable au niveau des 4^e racines cervicales ventrales (C4) et est classiquement assimilé à la CCR (Suzue, 1984, Johnson *et al.*, 2012). L'activité respiratoire produite par ces préparations demeure stable pendant plusieurs heures. Nos préparations ne contiennent pas les structures supra-bulbaires et périphériques, ce qui permet de restreindre toutes nos observations au réseau respiratoire bulbaire et de s'affranchir de l'influence des afférences périphériques et supra-bulbaires. Ainsi, l'interprétation des résultats est beaucoup plus aisée puisque les structures centrales que l'on souhaite étudier sont isolées et ne reçoivent plus aucune information afférente. Ces préparations permettent donc d'analyser l'effet direct d'un facteur sur les structures bulbaires qui participent à l'élaboration et la régulation de la CCR. En effet, il est possible de modifier la composition du LCRA dans lequel les préparations sont immergées afin de modéliser différentes situations expérimentales (*e.g.* acidose métabolique modélisant l'hypercapnie *in vivo*) et/ou de réaliser des applications pharmacologiques (*e.g.* ETO, leptine). La température du bain de superfusion fixée à 26 ± 1 °C n'est pas physiologique mais permet une conservation cellulaire optimale et donc une stabilité de la préparation qui permet d'étudier la CCR pendant plusieurs heures (Voituron *et al.*, 2011, Johnson *et al.*, 2012). Enfin, le modèle de préparation *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière est utilisé en routine au sein du laboratoire dans lequel les expérimentations de ce doctorat ont été réalisées. L'analyse de la f_R en normopH (modélisation de la normocapnie *in vivo*) a été réalisée en dehors de toute manipulation pharmacologique et a permis d'apprécier sa stabilité au cours du temps, un indice de maîtrise de l'approche chirurgicale et de non souffrance hypoxique. Nos valeurs de f_R étaient par ailleurs, conformes aux données de la littérature (Ren & Greer, 2006a, Voituron *et al.*, 2011, Joubert *et al.*, 2016).

Cependant ce modèle présente quelques limites. D'abord chez la souris nouveau-née il n'est possible d'ajouter en plus du bulbe rachidien, que la partie caudale du pont (Voituron *et*

al., 2011), alors que chez le rat nouveau-né l'extension rostrale à partir de la moelle épinière peut être bien plus importante en s'étendant jusqu'au diencéphale (Loiseau et al., 2014). En effet, l'inhibition qu'exercent les neurones noradrénergiques de la région A5 dans le pont caudal est connue pour exercer une influence modératrice sur le VRG en agissant par l'intermédiaire des récepteurs α_2 . Cette inhibition est assez forte chez la souris, ce qui rend l'élimination de la partie rostrale du pont nécessaire pour permettre une activité spontanée du réseau neuronal respiratoire (Hilaire et al., 1989, Errchidi et al., 1991, Smith *et al.*, 1990, Viemari et al., 2003, Hilaire et al., 2004, Viemari *et al.*, 2004b, Voituron et al., 2011). En outre, les données de la littérature suggèrent que des structures mésencéphaliques exercent également une influence modératrice sur le VRG (Okada *et al.*, 1998, Voituron et al., 2005). Il n'est donc pas possible sur nos préparations de bulbe rachidien-moelle épinières isolées d'apprécier l'influence de ces différentes subdivisions de l'encéphale (Okada et al., 1998, Voituron et al., 2005). Par ailleurs, il est important de préciser que le rythme généré par les préparations, assimilé à un rythme respiratoire (Suzue, 1984), n'est pas pour autant un rythme respiratoire physiologique. En effet, la fréquence respiratoire basale générée par cette préparation est d'environ 10 cycles/min tandis qu'*in vivo* elle est environ de 200 cycles/min (Mortola, 1984, Quindry *et al.*, 2016). Cette différence peut s'expliquer par l'absence de retour sensoriel périphérique, l'absence d'afférences diencéphaliques et corticales ou encore par le maintien de la préparation en hypothermie (LCRa maintenu à $26 \pm$ °C) (Peever *et al.*, 1999). De plus, l'absence de perfusion via le réseau vasculaire est un facteur limitant de cette préparation, puisque l'apport en dioxygène et l'élimination des déchets métaboliques (CO_2/H^+) ne s'effectuent que par diffusion. Il est donc possible qu'au fil du temps, la lenteur de cette diffusion provoque une hypoxie et/ou une acidose tissulaire au cœur du tissu nerveux perturbant le fonctionnement des neurones respiratoires (Brockhaus et al., 1993, Okada *et al.*, 1993). En effet, la technique de superfusion utilisée entraîne la formation d'un gradient de pression tissulaire d' O_2 , de K^+ et d' H^+ provoquant une hypoxie, une hyperkaliémie et une acidité au sein des tissus, occasionnant un dysfonctionnement cellulaire. Néanmoins, il est admis que les neurones respiratoires, localisés à une profondeur comprise en 300 et 600 μM chez le rongeur sont correctement dioxygénés et fonctionnent normalement (Johnson et al., 2012). Une autre limite de cette technique est l'âge auquel il est possible de l'utiliser, c'est-à-dire seulement des âges fœtaux tardifs et post-nataux précoces. En effet, ces préparations ne sont viables que pendant une période de temps limitée entre 0 et 5 jours post-natals. Au-delà, la maturation du SNC et en particulier sa myélinisation induit une réduction de la diffusion d' O_2 au sein des tissus qui génère un état hypoxique incompatible avec un bon fonctionnement des neurones respiratoires. De plus, il y a une meilleure tolérance à l'hypoxie du réseau respiratoire des nouveau-nés grâce à un plus grand métabolisme anaérobie, qui diminue durant le développement post-natal (Wong-Riley, 1989, Bomont *et al.*, 1992). Cela empêche malheureusement l'étude de la CCR par cette technique à des âges plus avancés. L'étude de l'effet d'une stimulation chronique d'Epo ou de leptine sur le tronc cérébral isolé ne peut donc pas être réalisée, et nécessiterait des

moyens d'étude permettant l'enregistrement du nerf phrénique *in situ* dans un animal où le bulbe rachidien ne reçoit aucune afférence périphérique. La préparation de tronc cérébral et cœur fonctionnel isolés, qui est valide à des âges plus avancés que le cinquième jour post-natal (Paton, 1997), pourrait ici être utile et envisagée par la suite. D'autre part, l'étude précise des neurones respiratoires dans le tronc cérébral, par la technique de patch-clamp, permettrait de déterminer l'effet de nos drogues, en visualisant la réponse directe des neurones respiratoires.

Malgré les intérêts de cette approche, des contraintes demeurent, imposant ainsi la nécessité d'une approche expérimentale alternative et complémentaire. Il faut aussi garder en mémoire lors de l'interprétation des résultats que ceux-ci ne sont pas directement applicables à l'animal entier et représentent précisément la réponse du réseau respiratoire bulbaire au stimulus directement appliqué.

II. La détection immunohistochimique de c-FOS comme marqueur d'activité neuronale

Lors de ce travail doctoral, l'étude des variables respiratoires a été associée à l'analyse de l'expression du proto-oncogène *c-fos* au niveau de neurones participant au contrôle respiratoire localisés à différents niveaux de l'encéphale. La mise en évidence de la protéine c-FOS par immunohistochimie dans les noyaux des neurones comme marqueur d'activité neuronale est largement admise au sein de la communauté scientifique depuis une trentaine d'années (Dragunow & Faull, 1989, Hughes & Dragunow, 1995, Herdegen & Leah, 1998, Kubik *et al.*, 2007). Ainsi, elle a été utilisée à de nombreuses reprises pour mettre en évidence une activation neuronale au sein des populations de neurones modulant la commande respiratoire dans des conditions physiologiques variées *i.e.* hypoxie, hypercapnie, application de substances pharmacologiques *in vivo* (Erickson & Millhorn, 1994, Teppema *et al.*, 1997, Berquin *et al.*, 2000a, Bodineau & Larnicol, 2001, Cayetanot *et al.*, 2002) et *ex vivo* (Bodineau *et al.*, 2001, Okada *et al.*, 2002, Saadani-Makki *et al.*, 2004).

Le gène *c-fos* est un gène d'expression précoce codant pour une protéine agissant comme facteur de transcription pour des gènes en aval (Dragunow *et al.*, 1989, Hughes & Dragunow, 1995, Perrin-Terrin *et al.*, 2016a). Ces gènes sont rapidement induits suite à une stimulation cellulaire. Une activité neuronale telle qu'un potentiel d'action ou la liaison d'un neurotransmetteur sur son récepteur déclenche une cascade cellulaire impliquant des seconds messagers, comme le Ca^{2+} , et l'activation de protéines kinases. Ceci mène à la phosphorylation de facteurs de transcription distincts comme CREB (cAMP Response-Binding Protein), induisant une transcription de gènes précoces tels que *c-fos*, suivie d'une traduction des protéines correspondantes telles que c-FOS. Gilman (Gilman *et al.*, 1986, Morgan & Curran, 1986, Greenberg *et al.*, 1987, Yamamoto *et al.*, 1988, Sheng *et al.*, 1990). La détection du produit des gènes d'expression précoces permet de visualiser post-mortem les zones

encéphaliques activées lors d'une stimulation effectuée en amont et ainsi de se focaliser sur l'ensemble des neurones de ces structures et plusieurs régions encéphaliques en même temps.

Cependant, l'interprétation des données fournies par la détection immunohistochimique de c-FOS doit tenir compte de certaines limitations. Le niveau basal de c-FOS est relativement faible et ne permet donc pas de manière optimale d'observer la diminution d'activité dans une structure, contrairement à d'autres marqueurs qui présentent un niveau basal plus important (Hughes & Dragunow, 1995, Herrera & Robertson, 1996, Buritova & Besson, 1999). De plus, cette technique ne permet pas en soi d'affirmer qu'une structure est nécessaire à la réponse aux stimuli. Par ailleurs, le désavantage majeur de l'utilisation des gènes d'expression précoces comme *c-fos* est le fait que l'activité neuronale visualisée n'est pas forcément spécifique à la stimulation effectuée en amont. En effet, la diversité des stimuli susceptibles d'induire des modifications de l'expression de *c-fos* peut être à l'origine d'erreurs d'interprétations. Par exemple, la protéine c-FOS ayant une durée de demi-vie de 90 à 100 minutes (Herdegen & Leah, 1998), le niveau d'expression basal peut être affecté par le passé récent de la préparation ou de l'animal, comme le changement d'environnement ou encore la procédure chirurgicale. Il est donc nécessaire de minimiser les manipulations pouvant induire des modifications de l'activité neuronale qui ne sont pas liées au stimulus étudié. Afin de parer à ce biais expérimental, il a été indispensable de standardiser rigoureusement les conditions expérimentales de façon à ce que seul le paramètre qui diffère entre les animaux témoins et exposés soit responsable des effets observés. Les préparations *ex vivo* consacrées à l'immunohistochimie étaient transférées vers la solution de fixateur dès la fin de la période de stimulation et/ou de maintien dans les conditions basales, sans retour aux conditions témoins car cette période de récupération étant, à elle seule, capable de modifier l'expression de *c-fos* au sein des populations neuronales étudiées. Les animaux *in vivo* dont nous avons prélevé les encéphales ont été stimulés et/ou maintenus dans les conditions basales dans le même environnement avant une période d'habituation. Ainsi, les modifications de l'expression de *c-fos* sont spécifiquement dues au stimulus appliqué. Enfin, une période de stimulation d'au moins 30 minutes a été choisie car elle est suffisamment longue pour induire des modifications détectables de l'expression de *c-fos* en réponse à l'activation neuronale ayant lieu durant les premières minutes de l'exposition (Morgan et al., 1987, Herdegen *et al.*, 1991, Okada et al., 2002, Bodineau *et al.*, 2004, Voituron et al., 2006, Voituron et al., 2011).

III. La technique de pléthysmographie corps entier comme mesure des variables ventilatoires

La technique de pléthysmographie sur corps entier est une technique qui permet l'enregistrement des variables ventilatoires sur des animaux éveillés, non anesthésiés et non contraints. Ces conditions expérimentales représentent un très grand avantage car après une

période d'habituation, le stress imposé aux animaux durant les manipulations est limité, or il pourrait être susceptible d'influencer grandement leurs variables ventilatoires. Ces variables ventilatoires enregistrées peuvent donc être associées à une respiration au repos de l'animal. Deux systèmes d'acquisition différents ont été utilisés en fonction du stade de développement de la souris :

- Chez le nouveau-né, en raison de la nécessité de maintenir l'animal dans des conditions de thermoneutralité, le pléthysmographe devait être placé dans une enceinte maintenue à $33 \pm 1^\circ\text{C}$ (Blumberg & Sokoloff, 1998, Matrot *et al.*, 2005, Gaultier *et al.*, 2006). Pour ce système d'acquisition, la mesure des variables respiratoires s'effectuait en discontinu : le flux d'air était arrêté pendant des sessions de 15 secondes permettant l'enregistrement. La possibilité qu'une hypercapnie se développe pendant cette session de mesure ne peut être exclue. Cependant, les valeurs de f_R de base en normocapnie des nouveau-nés sont conformes aux données de la littérature (Bissonnette & Knopp, 2004a, Tree *et al.*, 2014), un élément en faveur du non-développement d'une hypercapnie. D'autre part, cette hypothétique hypercapnie induite par le dispositif serait similaire entre les mesures effectuées chez les animaux témoins et exposés, dans les conditions de normocapnie et d'hypoxie. De plus, chez le nouveau-né, la précision des calculs du V_T basée sur les données de pléthysmographie corps entier est contestée (Enhorning *et al.*, 1998, Mortola & Frappell, 1998). En effet, la température du corps ainsi que l'humidité et la température de la chambre d'enregistrement sont difficiles à contrôler. Ces éléments conduisent à une grande variabilité des données obtenues dans des études effectuées chez des rongeurs nouveau-nés. Par conséquent, chez le nouveau-né, seule la f_R a été analysée.
- Chez l'adulte, le système d'acquisition utilisé (EMKA Technologies) permet de réaliser une mesure en continu des variables ventilatoires. La réponse ventilatoire de l'animal peut alors être directement visualisée et étudiée à travers les valeurs des variables f_R et V_T obtenues. Il a été possible de distinguer la part des chémorécepteurs périphériques de celle de chémorécepteurs centraux dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. En effet, lors de nos expérimentations, la part de la chémosensibilité périphérique de celle centrale a été déterminée en mettant au silence l'activité des chémorécepteurs périphériques par l'hyperoxie (Dejours, 1962). Ainsi lors d'un mélange gazeux hypercapnique-hyperoxique, la réponse ventilatoire observée sera due à la modulation des chémorécepteurs centraux, l'activité des chémorécepteurs périphériques étant supprimée par l'hyperoxie. En comparant les variables ventilatoires obtenues sur les souris soumises à un mélange hypercapnique-normoxique et hypercapnique-hyperoxique, il est possible d'appréhender la part centrale de la part périphérique dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. D'autres avantages de cette technique résident dans la facilité à soumettre l'animal étudié à différents environnements gazeux permettant d'explorer le chémoréflexe périphérique et central. Enfin, la

pléthysmographie permet d'enregistrer la réaction physiologique de l'organisme entier face à un stimulus contrôlé. Même s'il est très intéressant d'aller étudier le SNC *ex vivo*, il faut replacer les données obtenues dans le contexte d'un animal entier *in vivo*, la réaction d'un organe isolé ne caractérisant pas celle de l'organisme. Cependant, si l'aspect physiologique est des plus importants, une limite de cette technique serait de ne pas pouvoir considérer précisément les mécanismes mis en jeu de nos molécules d'intérêt (ETO, Epo, leptine).

IV. L'utilisation de souris transgéniques Epo-Tag^h et *ob/ob*

Les possibilités de manipulations sélectives du génome de la souris ont permis d'avancer dans la connaissance des gènes intervenant dans la genèse et la modulation de la CCR en renseignant sur le rôle du gène étudié en particulier. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés en partie à l'implication de l'Epo et de la leptine sur la ventilation en hypercapnie. Pour cela, nous avons étudié les phénotypes ventilatoires et/ou la CCR sur des souris Epo-Tag^h sous-exprimant l'Epo de manière systémique due à une perturbation ciblée dans la région 5' non traduite du gène codant l'Epo (Pichon et al., 2016) et sur des souris *ob/ob* déficientes en leptine fonctionnelle due à une mutation non-sens du gène codant la leptine (Zhang et al., 1994). Les souris transgéniques ont été comparées à des souris sauvages de même fonds génétique. L'interprétation des résultats sur ces souris transgéniques présente un certain nombre de limitations. Le gène étudié peut être exprimé dans les structures neuro-anatomiques du contrôle respiratoire mais également dans d'autres structures encéphaliques et organes, ce qui rend plus complexe l'interprétation du phénotype dont les causes peuvent donc être multifactorielles. Par ailleurs, la sous-expression ou la déficience des protéines Epo et leptine est permanente et non limitée dans le temps, ce qui permet la possibilité d'intervention de phénomènes compensateurs pouvant être responsables pour une part du phénotype observé et donc biaiser l'interprétation des résultats visant à attribuer un rôle à la protéine étudiée (Nadeau, 2001). Enfin, la principale interrogation dans l'interprétation des résultats est la validité de la transposition à l'Homme des résultats obtenus chez le rongeur en dépit d'un haut degré de conservation du génome, 99% des gènes de la souris ont un homologue chez l'Homme (Guenet, 2005). La méthode reste néanmoins valable, à condition de ne pas en attendre ce qu'elle ne peut donner. Ces modèles de souris transgéniques contribuent à l'étude des différents fils de l'écheveau entremêlé de la modulation de la CCR en hypercapnie mais ne sauraient suffire à donner une vision physiologique de la fonction de la protéine étudiée.

V. Expositions pharmacologiques : de la physiologie à l'expérimentation

1. Exposition au désogestrel et à l'ETO, principal métabolite actif

Après une prise orale d'une pilule contraceptive contenant la dose quotidienne de 75µg de désogestrel, celui-ci est absorbé et converti au niveau hépatique en ETO, son principal métabolite actif. Sa concentration plasmatique maximale est atteinte au bout de 2 heures et sa biodisponibilité est de 76%, soit 57µg dans le sang (Timmer et al., 1999). Les progestatifs et leurs métabolites retrouvés sous forme libre dans le plasma sont capables de traverser la barrière-hémato-encéphalique (Pardridge & Mietus, 1979). En prenant en considération la proportion libre d'ETO plasmatique (2%) (Schindler et al., 2003), théoriquement, 1,14µg d'ETO correspondant à 3,5nmol est susceptible de traverser la BHE. Si l'on considère la masse moyenne d'une femme adulte comme étant d'environ 60kg, cette exposition à l'ETO correspond à une concentration d'environ 0,019ng/g au sein du SNC. Les données de la littérature montrent que la concentration plasmatique maximale d'ETO est similaire après une administration aiguë et chronique de DSG (Timmer et al., 1999). Lors de ce travail doctoral, nous avons testé des concentrations d'ETO allant de 0,05 à 2µM (0,05, 0,5, 1 et 2µM) sur nos préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolées. En prenant en considération le volume de la cuve de superfusion des préparations, la quantité molaire d'ETO présente dans la cuve varie donc de 0,5 à 20nmol (0,5, 5, 10 et 20nmol).

La prise en compte de l'ensemble de ces informations suggère que les fourchettes testées sont dans le même ordre de grandeur que ce qui se passe physiologiquement chez la femme adulte au sein du SNC (3,5nmol) et que la concentration de 0,5µM (correspondant à 5nmol) semble être la concentration qui se rapproche le plus de la quantité théorique d'ETO ayant traversé la BHE chez la femme adulte (3,5nmol).

2. Exposition à la leptine

Lors de ce travail doctoral, nous avons testé des concentrations de leptine allant de 10^{-16} M à 10^{-8} M (10^{-16} , 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} M) sur nos préparations de bulbe rachidien-moelle épinière. Ces travaux ne sont pas présentés dans la partie 3 des résultats « Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie » par manque de temps mais ils sont évoqués dans la partie 4 de la discussion « Modulation de la ventilation en normocapnie et en hypercapnie par la leptine ». Nous sommes partis des concentrations physiologiques, plasmatiques et cérébrale de leptine chez la souris rapportées dans plusieurs études comme étant respectivement d'environ de 12ng/mL soit $7,5 \cdot 10^{-10}$ M et de 0,018ng/mL soit $1,125 \cdot 10^{-12}$ M (Van Heek et al., 1997, Li *et al.*, 2013c, Hart *et al.*, 2016, Hart *et al.*, 2017). Il semblerait que seulement 0,15% de la concentration de leptine plasmatique totale soit retrouvés dans le SNC après 5 minutes (Hart et al., 2017). Considérant un ordre de grandeur physiologique de 10^{-12} M pour la concentration endogène de leptine dans le LCR, nous avons décliné autour de cette

valeur, de manière croissante et décroissante, des concentrations de leptine dans le LCRa en immergeant nos préparations *ex vivo* afin de pas nous éloigner de la concentration de leptine cérébrale endogène observée *in vivo* et d'être dans des conditions se rapprochant de la physiologie de l'animal entier. Par ailleurs, les études antérieures à la nôtre s'intéressant à l'effet central de la leptine sur la ventilation ont testé soit par micro-injections au sein de structures cérébrales respiratoires comme le NTS et le RTN/pFRG chez le rat et la souris (Inyushkin et al., 2009, Inyushkina et al., 2010, Bassi et al., 2014), soit par bain sur des tranches bulbaires de rat (Bassi et al., 2013), des applications de leptine allant de 10^{-4} M à 10^{-8} M.

Partie 1: Modulation de la ventilation en normocapnie par l'ETO

Un des objectifs de ce doctorat était de déterminer l'effet du désogestrel sur la ventilation de base en analysant de manière rétrospective les variables respiratoires de base des deux patientes CCHS pour lesquelles une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ a été observée (Straus et al., 2010) et de déterminer chez l'animal les mécanismes impliqués dans l'effet de l'ETO, principal métabolite actif du désogestrel, au niveau du bulbe rachidien, région encéphalique qui contient une partie des structures essentielles à la genèse de la CCR.

Les résultats obtenus, présentés dans la partie 1 des résultats, ont mis en évidence que l'étonogestrel, métabolite du désogestrel induit une augmentation de la CCR en conditions basales sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière par une action bulbaire et également une augmentation de la ventilation des souris nouveau-nées *in vivo* d'une amplitude comparable à ce que nous avons observé chez les patientes Ondine. Les investigations d'histologie fonctionnelle et pharmacologiques suggèrent que ces effets seraient médiés par des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé RPa et ROB et notamment en modulant les effets qu'exercent les récepteurs GABA_A et NMDA sur la f_R (Joubert et al., 2016). Une autre étude, réalisée au sein du laboratoire, menée sur des préparations *ex vivo* de SNC isolé de rats nouveau-nés entre de 0 à 4 jours, a permis de mettre en évidence que l'ETO augmentait la réponse respiratoire au CO_2/H^+ par un ou plusieurs mécanismes dépendant des structures supra-bulbaires (Loiseau et al., 2014). Par ces actions, ce progestatif pourrait donc être responsable d'une élévation de la CCR impliquée dans les effets observés chez les patients atteints du syndrome d'Ondine placés sous désogestrel.

I. Le désogestrel améliore la ventilation de base chez des patientes CCHS

Aucune étude n'était disponible dans la littérature concernant l'effet de ce progestatif sur les variables ventilatoires de base et sur l'adaptation de la ventilation à l'hypercapnie, que ce soit chez des sujets sains ou atteints d'hypoventilation centrale avant l'observation clinique de Straus et collaborateurs qui nous a conduit à réaliser ce travail en reportant une récupération de la chémosensibilité au CO_2/H^+ chez deux patientes CCHS après exposition au désogestrel (Straus et al., 2010). L'étude rétrospective que nous avons réalisée chez les deux patientes CCHS a montré une corrélation entre la prise du progestatif et une augmentation de la f_R de base. Cette dernière était accompagnée d'une diminution de la PETCO_2 , reflet d'une meilleure efficacité de la ventilation. Cette observation est importante au regard de certains patients CCHS qui présentent à l'éveil une PETCO_2 trop élevée. C'est à la suite de ces observations,

qu'une étude clinique, mise en place en 2010 par le Pr Straus³, a testé l'effet du progestatif sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de patientes CCHS. Les résultats préliminaires ont montré une grande hétérogénéité en termes de réponse ventilatoire à l'hypercapnie après exposition au progestatif à savoir que certaines patientes répondent au progestatif et d'autres non. De plus, une autre étude a montré qu'une patiente CCHS placée sous désogestrel ne présente pas de récupération de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ (Li et al., 2013a). Ces résultats contradictoires suggèrent un effet idiosyncrasique et/ou un mécanisme d'action complexe de la molécule. Ainsi identifier et comprendre les bases physiologiques de la récupération de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ induite par l'ETO est une condition préalable importante afin d'évaluer les conditions dans lesquelles ce progestatif pourrait constituer une piste thérapeutique pour le traitement de 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 neuro-actifs car ils ont la capacité de passer la BHE (Pardridge & Mietus, 1979) et d'initier des voies génomiques et non génomiques influençant les fonctions neuronales (Baulieu, 1991, Barann et al., 1999, Behan & Wenninger, 2008, Brinton et al., 2008, Behan & Kinkead, 2011). De plus, il est admis que la chémosensibilité au CO₂/H⁺ est principalement sous-tendue par des mécanismes centraux (Nattie, 1999, Lahiri & Forster, 2003, Chernov et al., 2010, Guyenet et al., 2010b, Guyenet et al., 2010a, Guyenet, 2014, Guyenet & Bayliss, 2015b).

II. L'ETO exerce un effet facilitateur sur la f_R de base par des mécanismes bulbaires

L'utilisation de la préparation isolée de bulbe rachidien-moelle épinière nous a permis de restreindre nos observations aux effets bulbaires de l'ETO et d'apporter des éléments de réponse concernant les mécanismes associés à l'effet facilitateur du progestatif sur la f_R de base. Nos résultats, en accord avec les observations obtenues par notre analyse rétrospective chez les deux patientes CCHS de l'étude de Straus et collaborateurs (Straus et al., 2010), suggèrent que l'augmentation de la f_R observée chez ces patientes dépende au moins en partie de mécanismes bulbaires. En effet, l'exposition de préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière à l'ETO a montré que le progestatif induisait une élévation dose-dépendante de la f_R pour des concentrations allant de 0,05 à 2µM.

L'utilisation de la détection immunohistochimique de c-FOS sur les bulbes rachidiens issus de préparations *ex vivo* nous a permis d'identifier des structures bulbaires dont les neurones présentaient une modification de leur activité en réponse à l'exposition à l'ETO et qui pourraient donc potentiellement être impliquées dans l'effet facilitateur de l'ETO observé sur

³ Etude « RespirOndine » ([NCT01243697](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01243697)) mise en place en 2010 par le Pr Christian Straus

la f_R *ex vivo*. Parmi ces structures, les noyaux des raphés semblent tenir une place importante. Ces noyaux, impliqués dans le contrôle de la respiration (Cao et al., 2006a, Depuy et al., 2011, Cerpa *et al.*, 2015), contiennent différents neurotransmetteurs ou neuromodulateurs telle que la sérotonine ou encore le GABA (Kachidian *et al.*, 1991, Stamp & Semba, 1995). Les données de la littérature suggèrent que le RPa et le ROb exercent un effet facilitateur sur la ventilation via une signalisation sérotoninergique (Lalley, 1986b, Cao et al., 2006a, Cao et al., 2006b). Nos résultats nous ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle les neurones sérotoninergiques de ces deux structures pourraient participer en partie à l'effet facilitateur bulbaire de l'ETO. En effet, nous avons pu déterminer qu'une forte proportion des neurones c-FOS-positifs après exposition à l'ETO étaient sérotoninergiques et que l'effet facilitateur induit par l'ETO *ex vivo* était supprimé lorsque les systèmes sérotoninergiques étaient pharmacologiquement bloqués. En plus de nos résultats, notre hypothèse peut être corroborée par certaines données de la littérature qui ont mis en évidence une augmentation de la fréquence de décharge de neurones sérotoninergiques corrélée à une augmentation du niveau plasmatique de progestérone (Klink *et al.*, 2002). Par ailleurs, la participation des neurones sérotoninergiques des noyaux des raphés caudaux peut impliquer les connexions excitatrices entre le ROb et la VLM, et plus particulièrement avec le PréBötC (Ptak et al., 2009). Outre les neurones sérotoninergiques des noyaux des ROb et RPa, les neurones du NTS_{c/m} et de la VLM ont montré également une modification de leur activité révélée par l'expression de *c-fos*.

Les mécanismes enclenchés par l'ETO pourraient dépendre de son interaction avec des récepteurs spécifiques ou non à la progestérone qu'ils soient membranaires ou nucléaires mais aussi à des récepteurs appartenant à un autre système de neurotransmission. Parmi ces acteurs moléculaires qui pourraient être la cible de l'ETO, les récepteurs membranaires à actions non-génomiques semblent être tout à fait appropriés au regard de nos conditions expérimentales. En effet, dans notre étude, le temps d'exposition à l'ETO est relativement court (30minutes). Il semble donc peu probable que les effets observés sur la f_R soient sous-tendus par des effets génomiques, même si l'hypothèse ne peut pas être exclue. Les données de la littérature nous ont conduit à examiner une possible interaction avec le récepteur GABA_A (Park-Chung et al., 1999, Belelli & Lambert, 2005). En effet, les stéroïdes endogènes et synthétiques sont des modulateurs allostériques du récepteur GABA_A. Les résultats obtenus au cours des investigations de co-applications pharmacologiques suggèrent effectivement l'implication d'une interaction avec le récepteur GABA_A dans l'effet de l'ETO. L'influence de l'ETO sur les récepteurs GABA_A est différente selon la concentration du progestatif. En effet, le blocage des systèmes GABA_Aergiques modifie l'effet de l'ETO de manière dose-dépendante à savoir une suppression partielle de l'effet facilitateur à 0,05 μ M d'ETO alors qu'elle est totale à 2 μ M. Il est possible que cette action non linéaire de l'ETO sur le récepteur GABA_A s'explique par l'activation de différents types de récepteurs GABA_A en fonction de la concentration du progestatif (Belelli et al., 2002, Belelli & Lambert, 2005). En effet, certains neurones exprimant les récepteurs GABA_A sont plus sensibles que d'autres aux neurostéroïdes. Ainsi, à faible

concentration de neurostéroïdes, certains neurones réagissent alors qu'il faut une plus forte concentration pour observer le même effet sur d'autres neurones (Belelli & Lambert, 2005). En effet, bien que peu de données soient disponibles concernant l'effet de progestatifs de la famille des gonanes sur les récepteurs GABA_A, des études réalisées sur des progestatifs de la famille des prégnes ont montré qu'en fonction de la concentration du stéroïde, des récepteurs de composition en sous-unités différente pouvaient être activées. Par exemple, les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont activés par de faibles concentrations d'allopregnanolone alors que l'activation de récepteurs qui contiennent les sous unités $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ nécessite des concentrations 3 à 10 fois plus élevées (Belelli et al., 2002). De même, les récepteurs qui contiennent les sous unité $\gamma 1$ sont moins sensibles à l'allopregnanolone que les récepteurs qui expriment les sous unités $\gamma 2$ ou $\gamma 3$ (Belelli et al., 2002). Au regard de nos résultats, une hypothèse possible est qu'à une concentration de $2\mu\text{M}$, l'ETO agirait sur des récepteurs GABA_A contenant des sous unités $\alpha 1$ et 3 alors qu'à $0,05\mu\text{M}$, il interagirait avec des récepteurs GABA_A contenant des sous unités $\alpha 2, 4, 5$ ou 6.

Par ailleurs il a été montré que des métabolites de la progestérone appliqués en aiguë influençaient la CCR et en particulier la f_R en modulant négativement ou positivement les récepteurs GABA_A ; sur des préparations de bulbe rachidien-moelle épinière de rat nouveau-né il a été mis en évidence que l'allopregnanolone module positivement les récepteurs GABA_A et induit une diminution de la f_R alors que la DHEA module négativement les récepteurs GABA_A et induit une augmentation de la f_R (Ren & Greer, 2006b). Ainsi, au même titre que ces neurostéroïdes, l'étonogestrel pourrait exercer son action facilitatrice sur la f_R en modulant négativement l'activité du récepteur GABA_A. Or, dans nos expériences de co-applications pharmacologiques sur les préparations *ex vivo*, nous observons une potentialisation par l'ETO de l'effet du muscimol sur le récepteur GABA_A. Ceci suggère que l'ETO soit un modulateur positif de GABA_A. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la testostérone, molécule à partir de laquelle dérive l'ETO, est un modulateur positif de GABA_A (Park-Chung et al., 1999) et que les modulateurs négatifs de GABA_A sont caractérisés par une charge négative au niveau du carbone C3 (Park-Chung et al., 1999), ce qui n'est pas le cas de l'ETO qui y présente un groupe cétone (Grandi et al., 2014). En prenant en considération le fait que l'ETO exerce un effet facilitateur sur la f_R , un effet potentialisateur de GABA sur GABA_A, et que la liaison de GABA sur son récepteur engendre une inhibition du neurone au stade de développement étudié, notre hypothèse est que l'ETO exerce un effet indirect via une levée d'inhibition GABA_Aergique. En effet, nous suggérons que le progestatif entraîne un renforcement de l'hyperpolarisation d'un neurone lui-même inhibiteur de la f_R induisant une diminution de l'inhibition qu'il exerçait sur la f_R et donc aboutissant à une élévation de la f_R . Les données de la littérature suggèrent que ces neurones inhibiteurs de la f_R pourraient être localisés en partie au niveau du RMg. En effet, sa stimulation induit un effet modérateur sur la ventilation (Lalley, 1986b, Aoki & Nakazono, 1992, Cao et al., 2006a) via une signalisation GABA_Aergique (Cao et al., 2006b). Nos données immunohistochimiques ne montrent pas de différences en termes

de nombre de neurones activés dans cette structure en présence ou en absence d'ETO, ce qui n'est pas en désaccord avec notre hypothèse. Cependant, l'immunoréactivité de la protéine c-FOS ne constitue pas un bon outil pour identifier ces neurones inhibiteurs en raison de la faible expression basale de *c-fos* rendant difficile l'observation d'une diminution du nombre de neurones activés (Kovacs, 1998).

A la concentration de 0,05 μ M d'ETO, le blocage des récepteurs GABA_A n'abolit pas complètement la facilitation induite par l'ETO suggérant l'implication d'autres cibles. Le récepteur NMDA est un bon candidat puisqu'il est impliqué dans le contrôle de la ventilation (Greer *et al.*, 1991, Funk *et al.*, 1997) et est connu pour être modulé par les neurostéroïdes (Korinek *et al.*, 2011). Nos résultats de co-application pharmacologique suggèrent que l'ETO potentialise l'effet du NMDA sur le récepteur NMDA à 0,05 μ M et que l'effet facilitateur induit par l'ETO est supprimé après le blocage des récepteurs NMDA. Nos résultats d'immunohistochimie montrent quant à eux une augmentation de l'expression de *c-fos* au niveau du NTSc/m uniquement à 0,05 μ M d'ETO sans qu'il y ait de neurones TH-positifs activés. En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, notre hypothèse est qu'à cette concentration, l'ETO modulerait les récepteurs NMDA localisés au niveau de neurones du NTSc/m (Lin *et al.*, 2008), dont la modulation par certains stéroïdes a déjà été démontrée (Xue & Hay, 2003).

L'utilisation d'animaux nouveau-nés *in vivo* nous a permis de déterminer l'effet facilitateur de l'ETO sur la f_R sur l'animal en entier. L'ETO augmente la fréquence de base *in vivo* chez la souris nouveau-née dans des proportions similaires à ce qui est observé sur les préparations *ex vivo*. Bien que le stade de développement soit différent, cette augmentation est similaire à celle observée chez les patientes adultes CCHS et confirme nos résultats obtenus *ex vivo* sur le rôle facilitateur de l'ETO sur la f_R .

III. Perspectives

Cette partie du 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 son influence sur la CCR en conditions basales de patientes Ondine exposées au désogestrel et ainsi plus généralement de déterminer si les mécanismes enclenchés par les progestatifs de la famille des gonanes visant à moduler la CCR pourraient être utilisés comme une alternative thérapeutique pertinente pour le traitement des troubles respiratoires rencontrés chez des patients souffrant de syndrome d'hypoventilation centrale. Ce travail a été essentiellement focalisé sur les mécanismes centraux mis en jeu par l'ETO en normocapnie. L'étude rétrospective nous a permis de révéler un effet facilitateur du désogestrel sur la f_R de base chez les deux patientes CCHS ayant présenté une récupération de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ après exposition au DSG (Straus *et al.*, 2010). Les données obtenues chez l'animal grâce à des approches *ex vivo* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence

un effet dose-dépendant de l'ETO sur la f_R de base en normocapnie. L'effet global du progestatif semble résulter de la sommation d'un effet facilitateur bulbaire dépendant d'interactions avec des récepteurs GABA_A et NMDA et de l'activation des systèmes sérotoninergiques. D'autres données du laboratoire obtenues dans le cadre des doctorats de Camille LOISEAU et Fanny JOUBERT ont également permis de caractériser certains aspects relatifs à l'effet sur la CCR du progestatif dans des conditions d'hypercapnie. Là encore, les résultats obtenus soulignent la complexité d'action de ce progestatif avec une potentialisation de l'augmentation de la f_R induite par l'acidose métabolique dépendant de structures supra-bulbaires observée dans une gamme de concentration bien particulière.

La complexité apparente de l'action ventilatoire du désogestrel et plus particulièrement de son métabolite actif l'ETO est sans doute au moins en partie liée à la diversité des cibles moléculaires du stéroïde et de la dose administrée. Cette complexité pourrait expliquer le caractère sensible ou résistant des patientes CCHS au désogestrel (Straus et al., 2010, Li et al., 2013a). La dose à administrer pour chaque patiente pourrait dès lors être évaluée au cas par cas, en fonction de la présence, par exemple, de troubles du métabolisme hépatique qui entraînerait des variations de la concentration sérique en désogestrel.

La caractérisation précise des mécanismes à l'origine de la potentialisation de la ventilation basale et de la réponse respiratoire à l'hypercapnie induit par l'ETO est bien évidemment fondamentale au regard de notre problématique générale. D'autres expériences sont à réaliser *in vivo* à des stades de développement plus avancés afin d'intégrer les résultats *ex vivo* dans un organisme entier. D'autre part, les pistes actuellement envisagées en poursuite de ce travail consistent chez le rongeur sauvage à moduler, grâce des agonistes et antagonistes, les différents systèmes de neurotransmission identifiés comme cible de l'action du progestatif et à enregistrer la CCR *ex vivo* et la ventilation *in vivo* par pléthysmographie à différents stades de développement. Il sera intéressant dans ces différentes conditions, de cartographier les structures neuronales impliquées dans les effets respiratoires observés par la détection immunohistochimique de c-FOS. Les bénéfices ventilatoires observés en normocapnie comme en hypercapnie semblent, au moins pour leur origine, ne pas dépendre de la région du RTN/pFRG. C'est l'absence de neurones PHOX2B-positifs au niveau de cette région qui est à l'origine des déficits ventilatoires observés chez les patients CCHS. Ainsi, les éléments que nous avons pu obtenir dans le cadre de ce travail doctoral suggèrent que l'action du progestatif puisse s'exercer en absence des neurones PHOX2B-positifs du RTN/pFRG. Cette idée est par ailleurs en accord avec l'observation d'une récupération de la réponse respiratoire à une élévation du CO₂ chez deux patientes exposées au désogestrel (Straus et al., 2010). Ainsi, les conditions les plus favorables à l'action du progestatif déterminées, il s'agira alors de d'apprécier la capacité de ces associations pharmacologiques à corriger les perturbations respiratoires de souris mutantes *Phox2b* qui modélisent le syndrome d'Ondine (Ramanantsoa et al., 2011). Cela permettra de caractériser au mieux les conditions dans lesquelles le progestatif pourrait être utilisé chez les patientes CCHS.

Pour conclure sur cette partie, les résultats obtenus ouvrent la voie à de nouvelles perspectives 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 mais aussi de déterminer les conditions dans lesquelles les progestatifs de la famille des gonanes peuvent constituer un traitement en nous permettant par exemple de comprendre comment solliciter à la fois les mécanismes facilitateurs bulbaires activés en normocapnie et supra-bulbaires activés en hypercapnie sans activer les mécanismes qui s’y opposent ou encore de mettre en lumière l’importance d’explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Partie 2: Implication de l'Epo dans la ventilation en hypercapnie

Un des objectifs de ce doctorat était de déterminer d'une part l'effet d'une déficience en Epo sur la ventilation lors d'une hypercapnie en analysant les variables ventilatoires de souris adultes déficientes en Epo (Epo-TAg^h). D'autre part, nous avons cartographié les structures encéphaliques impliquées dans les réponses ventilatoires que nous avons observées *in vivo* à l'aide de l'analyse immunohistochimique de l'expression de *c-fos* sur les encéphales de ces souris et enfin nous avons analysé la CCR de préparations *ex vivo* de moelle épinière-bulbe rachidien sur des souris nouveau-nées Epo-TAg^h et Tg21 à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques au niveau de C4.

Même si ce rôle ne semble pas être indispensable à l'obtention d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie suffisante, les résultats obtenus, présentés dans la partie 2 des résultats, suggèrent un rôle de l'Epo dans la mise en place du patron ventilatoire en réponse à l'hypercapnie.

I. La déficience chronique en Epo modifie la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez l'adulte

La réponse ventilatoire à l'hypercapnie de souris sauvages a montré une augmentation de la ventilation via une augmentation du V_T , sans modification de la f_R . Ces observations concordent avec des études précédentes qui avaient suggéré une régulation de l'homéostasie au CO_2 majoritairement par le V_T (Ohashi et al., 2013, Wakai et al., 2015). Contrairement aux souris sauvages, les souris Epo-TAg^h ont présenté lors d'une hypercapnie une augmentation plus importante du \dot{V}_E consécutive à une augmentation du V_T et également de la f_R . Il semblerait à la lumière de ces résultats que l'Epo ne soit pas nécessaire à l'obtention d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie suffisante, ce qui a également été suggéré lors d'une étude antérieure (Ballot et al., 2015b). En effet lors de cette étude, des souris adultes et nouveau-nées (10 jours post-natales) ont reçu une injection intra-cisternale de sEpo-R (récepteur soluble à l'Epo jouant le rôle d'antagoniste naturel de l'Epo) ou de sérum physiologique. Vingt-quatre heures plus tard les variables ventilatoires évaluées par pléthysmographie, après une normocapnie ou une hypercapnie, ne montrent pas de différence entre les souris, adultes ou nouveau-nés, injectées avec du sEpo-R et du sérum physiologique. Les auteurs de l'étude concluent que l'Epo endogène ne contribue pas à la modulation centrale de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Cependant, nos résultats suggèrent un effet de l'Epo sur le contrôle du patron ventilatoire en réponse à l'hypercapnie car la manière de répondre des souris Epo-TAg^h à l'hypercapnie est différente des souris sauvages. En effet, l'hyperventilation plus importante chez ces souris Epo-TAg^h peut s'expliquer par une augmentation de la f_R en plus de

celle du V_T . Cette augmentation de la f_R , reflet du rythme de la commande respiratoire, laisse supposer que la déficience chronique en Epo a entraîné une modulation de la CCR. En effet, étant donné la nature permanente de la déficience due à une mutation constitutive, il est tout à fait possible que des mécanismes compensatoires aient été mis en place par les souris Epo-TAg^h afin de pouvoir faire face à l'hypercapnie malgré leur déficience en Epo. Une des hypothèses avancées serait que la déficience chronique en Epo entraîne un remaniement du réseau neuronal respiratoire activé par une élévation de CO_2/H^+ .

D'autres hypothèses pourraient expliquer ces résultats. L'une d'elle consiste à imaginer que les souris Epo-TAg^h anémiques auraient pu développer différentes stratégies afin d'augmenter le transport de dioxygène. Il a été montré dans une étude qu'une hémodilution chez le lapin avait pour effets d'augmenter le débit cardiaque et sanguin au niveau cérébral, sans aucun changement au niveau de la ventilation (Deem *et al.*, 1999). Ces adaptations pourraient empêcher l'apparition d'une hypercapnie au niveau artériel, ce qui aurait pour effet de stimuler les chémorécepteurs périphériques et centraux et ainsi augmenter la ventilation. Chez ces animaux anémiques, une augmentation basale de la ventilation serait contreproductive de par la forte demande en énergie et en dioxygène des muscles respiratoires chez des animaux pour lesquels le transport d' O_2 est déjà limité. Pris ensemble, ces résultats suggèrent un rôle de l'Epo dans l'adaptation des souris Epo-TAg^h à la déficience en Epo. Une approche d'immunohistochimie fonctionnelle nous a permis de cartographier les structures respiratoires bulbaires activées durant l'hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h et les souris sauvages.

II. Mécanismes sous tendant les effets de l'Epo sur la chémosensibilité au CO_2/H^+ chez l'adulte

Nos investigations d'histologie fonctionnelle basées sur l'analyse de l'expression de *c-fos* sur le bulbe rachidien de souris adultes Epo-TAg^h et sauvages soumis à une hypercapnie ont montré d'une part chez les souris sauvages une augmentation de l'expression de *c-fos* dans les zones du bulbe rachidien déjà décrites dans la littérature, comme le *c/mNTS*, la *VLM* et le *RTN/pFRG* (Okada *et al.*, 2002, Tankersley *et al.*, 2002, Teppema *et al.*, 1997). D'autre part, chez les Epo-TAg^h, nous n'avons pas observé d'augmentation d'expression de *c-fos* au niveau du *NTS*, de la *VLM* mais une augmentation significative des neurones *c-FOS*-positifs au sein du *RTN/pFRG* même si elle est significativement réduite en regard de celle des souris sauvages et enfin une augmentation d'expression de *c-fos* au niveau des raphés pallidus et magnus qui n'était pas retrouvée chez les souris sauvages.

L'activation de cellules au niveau du *NTS* chez les souris sauvages pourrait être due à l'augmentation d'activité des corps carotidiens (Fitzgerald & Dehghani, 1982) qui, comme déjà décrit, projettent au niveau du *c/mNTS* (Torrealba & Claps, 1988a, Finley & Katz, 1992). En revanche, l'absence d'augmentation de neurones *c-FOS* positifs dans cette structure chez les

souris Epo-TAg^h témoigne soit d'une altération du fonctionnement des corps carotidiens, soit d'un dysfonctionnement des neurones du NTS, les rendant incapables d'intégrer les informations provenant des corps carotidiens. L'effet de l'Epo sur les corps carotidiens a été étudié notamment pendant la réponse à l'hypoxie (Soliz et al., 2005). Dans cette étude, l'injection intra-veineuse d'Epo avait entraîné une augmentation de la ventilation chez des souris sauvages. Différentes études démontrent que la signalisation érythropoïétinergique était indispensable au développement cérébral ainsi qu'à la prolifération des cellules progénitrices neuronales (Chen et al., 2007, Yu et al., 2002). Il a aussi été démontré que l'Epo était non seulement capable de stimuler la prolifération des cellules progénitrices neuronales mais également d'empêcher l'apoptose de ces cellules via le maintien de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL (Silva *et al.*, 1996, Sola *et al.*, 2005). Il est possible que la déficience en Epo aurait pu avoir pour effet de perturber in utero la mise en place du réseau neuronal, notamment au niveau du NTS, ou alors d'altérer son fonctionnement, sans perturber le nombre de neurones mis en place.

L'absence d'augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs au sein de la VLM n'était pas attendue alors que nous observons une augmentation de la ventilation en hypercapnie. En effet, l'activation des neurones de cette structure devrait constituer en partie le reflet d'une augmentation de la f_R car la VLM contient en partie le complexe de pré-Bötzinger, générateur essentiel à la genèse du rythme respiratoire. Il a été mis en évidence que les récepteurs de l'Epo sont présents dans différents groupes neuronaux dont le complexe de pré-Bötzinger (Soliz et al., 2005). En particulier, il a été montré que l'Epo s'exprime dans des neurones glutamatergiques (Xu *et al.*, 2009) ainsi que dans des neurones synthétisant de la somatostatine ou exprimant un récepteur de la substance P (NK1R), qui sont des marqueurs trouvés également dans le complexe de pré-Bötzinger (Guyenet *et al.*, 2002). L'Epo pourrait donc agir directement sur le complexe de pré-Bötzinger. Dans ce contexte, il n'est donc pas invraisemblable qu'en cas de déficience en Epo, nous n'observions pas de marquage *c-fos* au niveau des neurones de la VLM et que l'augmentation de la f_R soit relayée par d'autres structures du réseau neuronal respiratoire telles que le RTN/pFRG où nous avons pu observer une augmentation d'expression de *c-fos* ou encore le RPa et le RMg qui contiennent des neurones sérotoninergiques.

L'étude de l'expression de *c-fos* en hypercapnie nous a aussi permis d'observer une augmentation du nombre de cellules marquées au niveau du RTN/pFRG mais nettement moins importante chez les Epo-TAg^h que chez les sauvages, suggérant ainsi une altération du bon fonctionnement de la chémoréception centrale chez les Epo-TAg^h. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le nombre de neurones exprimant *Phox2B*, ces neurones étant connus pour jouer un rôle majeur dans la chémoréception centrale au CO₂ au niveau du RTN/pFRG (Wang et al., 2013c, Ruffault et al., 2015). Nous avons alors observé un nombre global de neurones marqués similaire entre les souris sauvages et les souris Epo-TAg^h. La faible proportion de neurones exprimant *c-fos* chez les Epo-TAg^h ne peut donc pas être associée à un

déficit de neurones exprimant *Phox2B*, ce qui suggère plutôt une modification dans leur fonctionnement comme par exemple une réduction de leur sensibilité au CO_2/H^+ . Cela pourrait là aussi être expliqué comme nous l'avons évoqué pour le NTS, par une altération dans la mise en place du RTN/pFRG pendant le développement embryonnaire, induite par la déficience en Epo. Cependant, une autre théorie mettant en jeu un mécanisme de stimulation paracrine des neurones RTN/pFRG par les astrocytes pourrait expliquer les modifications de fonctionnement du RTN/pFRG (Gourine et al., 2010). En effet, les cellules gliales présentes à la surface ventrale du bulbe peuvent être dépolarisées par une acidification et seraient ensuite capables d'activer les neurones du RTN/pFRG via une libération d'ATP entraînant la propagation des vagues calciques astrocytaires (Gourine et al., 2010). Les cellules c-FOS-positives du RTN/pFRG n'ont pas exprimé de GFAP chez les souris WT et Epo-TAgh et ne sont donc pas des cellules gliales. Cependant, les astrocytes étant une source de production d'Epo et exprimant les Epo-R (Marti, 1996), ils pourraient avoir été affectés par une déficience en Epo qui pourrait les rendre moins actifs. De plus, il a été démontré que l'Epo régule la propagation de l'influx calcique dans les cellules (Korbel et al., 2004). La déficience en Epo pourrait affecter le couplage entre les astrocytes et les neurones du RTN/pFRG en réduisant la capacité des astrocytes à exciter les neurones du RTN/pFRG. Une autre hypothèse pourrait expliquer une modification du fonctionnement des neurones du RTN comme par exemple une réduction de leur sensibilité au CO_2/H^+ . Parmi les mécanismes moléculaires de la chémoréception des neurones du RTN/pFRG, certains impliquent en partie les canaux TASK-2 et le récepteur GPR4 (Kumar et al., 2015). L'Epo pourrait interagir avec ces acteurs de la chémoréception même s'il n'existe à ce jour pas de données de la littérature sur l'interaction entre l'Epo et les détecteurs de protons moléculaires GPR4 ou TASK.

La mise en évidence d'une augmentation significative de l'expression de *c-fos* au niveau du RPa et du ROB chez les souris Epo-TAgh^h en réponse à l'hypercapnie alors que les souris WT n'ont pas montré une telle augmentation, suggère le rôle important de ces structures dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie lors d'une déficience en Epo. En effet, malgré la diminution ou l'absence d'implication de structures majeures de la chémosensibilité centrale décrites précédemment, nous avons observé chez toutes les souris Epo-TAgh une hyperventilation supérieure à celle des individus WT en réponse à l'hypercapnie. Cela suggère donc l'implication d'autres zones chémosensibles du bulbe rachidien. Le RPa et le ROB sont connus pour être aussi des structures importantes dans la chémosensibilité centrale au CO_2/H^+ . Dans le RPa, une partie importante des neurones c-FOS-positifs était sérotoninergique et il a été montré que les neurones sérotoninergiques des raphés bulbaires jouent un rôle important dans la chémosensibilité centrale au CO_2/H^+ (Iceman et al., 2013, Teran et al., 2014). En revanche, les cellules c-FOS positives du RMg n'étaient pas sérotoninergiques. Cependant il a été démontré qu'un groupe de neurones non sérotoninergiques était stimulé par le CO_2 dans les raphés bulbaires (Iceman & Harris, 2014). Ainsi, il est aussi possible que les neurones des raphés bulbaires non sérotoninergiques soient impliqués dans la réponse ventilatoire à

l'hypercapnie des souris Epo-TAg^h. De plus, ces neurones non sérotoninergiques expriment le récepteur NK1-R, dont on sait qu'il joue un rôle dans la modulation de la ventilation. L'effet d'une exposition au ligand endogène des récepteurs NK1-R sur l'activité respiratoire a été observé, cet effet est excitateur (Von Euler & Pernow, 1956) et induit une accélération de la fréquence respiratoire. Chez le rat adulte, la destruction quasi-totale des neurones du préBötC exprimant NK1R entraîne une irrégularité importante du rythme respiratoire sans pour autant induire un arrêt respiratoire (Gray et al., 2001, McKay et al., 2005). Ainsi, la signalisation dépendante des récepteurs NK1R semble exercer un puissant rôle modulateur même si elle n'est pas indispensable à la rythmogenèse proprement dite et pourrait être impliquée au niveau des raphés bulbaires dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris déficientes en Epo. L'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie observée chez les souris Epo-TAg^h par rapport aux souris sauvages impliquerait donc le recrutement de zones chémosensibles silencieuses chez les sauvages comme les neurones sérotoninergiques et non sérotoninergiques chémosensibles des noyaux des raphés bulbaires pallidus et magnus. Ce recrutement serait suffisant pour contrer d'une part une diminution de l'activation de la région du RTN/pFRG, site principal de chémoréception centrale au CO₂/H⁺, et d'autre part l'absence d'activation du NTS, principal lieu d'intégration des afférences périphériques traduisant l'inactivation de la voie impliquant les chémorécepteurs périphériques. Cependant, même si la déficience en Epo semble entraîner un remodelage au niveau du bulbe rachidien, nous ne pouvons pas exclure l'implication de structures supra-bulbaires dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les Epo-TAg^h, comme notamment le LC, la PAG au niveau du mésencéphale ou encore l'hypothalamus caudal, qui sont des structures connues pour être impliquées dans la chémosensibilité centrale (Fink et al., 1962, Horn & Waldrop, 1998, Nattie, 1999, Nattie & Li, 2006).

L'ensemble de nos résultats montre que la déficience chronique en Epo chez l'adulte entraîne une réorganisation du réseau neuronal bulbaire impliqué dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Ce remodelage du réseau respiratoire bulbaire pourrait être lié à un phénomène de plasticité neuronale induit par l'Epo, comme cela a déjà été montré lors la sous- ou sur-expression chronique d'Epo (Kamal et al., 2011, Voituron et al., 2014, Almaguer-Melian et al., 2015, Kimakova et al., 2017). Cette plasticité du réseau neuronal respiratoire induite par la déficience en Epo pourrait aider à décortiquer plus encore les mécanismes de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ et mettre en avant des cibles thérapeutiques potentielles. Cette hypothèse est particulièrement intéressante en ce qui concerne les pathologies neuro-respiratoires telle que le CCHS caractérisée par une perte ou une diminution importante de la sensibilité au CO₂/H⁺ et soutient la poursuite des investigations au niveau central sur de l'implication de l'Epo dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

III.L'excès ou la déficience chronique d'Epo ne modifie pas la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ au 4^e jour post-natal (P4)

Nos données obtenues sur les préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris nouveau-nées Epo-TAg^h et Tg21 démontrent que la chémosensibilité centrale au CO₂/H⁺ n'est pas modifiée au stade P4. Il semble donc qu'à ce stade de développement, le niveau d'Epo qu'il soit plasmatique ou cérébral n'intervienne pas dans la modulation centrale de la réponse à l'hypercapnie. Des études antérieures ont été obtenues chez des souris Tg21 adultes (Laouafa et al., 2016) et des souris WT adultes et au stade P10 recevant une injection intra-cisternale de sEpo-R, l'antagoniste naturel d'Epo (Ballot et al., 2015b), et ne révèlent aucun changement dans la réponse au CO₂/H⁺ par rapport aux animaux témoins. Nos résultats, obtenus dans les préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris au stade P4, semblent conformes à ces précédents résultats. L'ensemble de ces résultats démontre que l'excès ou la diminution d'Epo endogène cérébral ne semble pas nécessaire à l'obtention d'une réponse ventilatoire au CO₂/H⁺ au moins équivalente à celle des souris sauvages. Cependant notre étude décrite précédemment sur des souris Epo-TAg^h adultes montre que la déficience chronique en Epo potentialise la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et modifie l'activation du réseau neuronal respiratoire normalement associé à une élévation de CO₂/H⁺. Ces derniers résultats sont par ailleurs en accord avec des études qui montrent qu'une sur-expression d'Epo centrale ou systémique diminue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Menuet et al., 2016, Silva et al., 2017). Pris ensemble, nos résultats *ex vivo* et *in vivo* nous indiquent que l'impact de la déficience en Epo sur la ventilation en hypercapnie pourrait être différent selon l'âge. Il est possible que les mécanismes compensatoires mis en place chez l'adulte ne soient pas encore opérant à des stades plus précoces. Aussi, l'étude chez l'adulte est réalisée *in vivo* sur l'animal entier alors que l'étude à P4 est réalisée sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière. Nous n'avons pas de renseignement sur le rôle que pourraient jouer les structures surpa-pontiques et/ou périphériques à ce stade post-natal. Il pourrait donc être intéressant de réaliser une mesure *in vivo* des variables ventilatoires en hypercapnie chez le nouveau-née Epo-TAg^h et de cartographier son réseau neuronal en hypercapnie comme cela a été fait dans notre étude *in vivo* sur les souris Epo-TAg^h adultes. De plus l'Epo a un impact important sur le développement et la maturation du SNC (Juul et al., 1998, Kumral et al., 2011). Par ailleurs, la sensibilité centrale au CO₂/H⁺ des mammifères dépend de la maturation du réseau neuronal respiratoire et donc de l'âge (Rigatto et al., 1975, Frantz et al., 1976, Bissonnette & Knopp, 2004a, Putnam et al., 2005).

Le second résultat important de notre étude montre que l'antagonisation de l'Epo endogène par sEpo-R ou par le blocage de la voie de signalisation moléculaire de l'Epo par des inhibiteurs d'ERK et d'Akt diminuent de manière significative la CCR en réponse à une élévation de CO₂/H⁺ des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière de souris Tgg21. Ces résultats suggèrent que le rapport Epo/sEpo-R est un facteur modulant important

pour la régulation de la respiration. Villafuerte et collaborateurs ont également démontré l'importance de ce rapport dans le cas de patients souffrant de mal chronique des montagnes (Villafuerte et al., 2014). Alors même que la concentration plasmatique en Epo est normale, la variation du sEpo-R fait varier la disponibilité de l'Epo et donc ses effets. De plus, ces résultats et ceux précédemment rapportés (Ballot et al., 2015b, Laouafa et al., 2016) impliquent que l'impact de la modification du rapport Epo/sEpo-R chez la souris dépend de l'âge, avec un impact à P4, mais pas à P10 ou chez les adultes. Ces résultats suggèrent également que lorsque le niveau d'Epo cérébrale est génétiquement modifié comme cela est le cas chez les souris Tg21 et Epo-TAg^h, il est possible que ce changement induise un changement compensatoire dans les niveaux d'expression du sEpo-R, au moins en partie, ce qui pourrait masquer l'impact réel de l'Epo dans la régulation centrale de la ventilation. Nos résultats montrent également que l'inhibition de ERK/Akt diminue la CCR en hypercapnie en atténuant l'amplitude plutôt que la fréquence respiratoire. Cependant, outre l'implication dans la voie moléculaire activée par l'Epo (Caravagna & Soliz, 2015), ERK et Akt sont également des molécules impliquées dans des processus majeurs accomplissant une grande variété de tâches neuronales, dont l'apoptose et la survie cellulaire (Teng *et al.*, 2014), la différenciation (Chan *et al.*, 2013), la prolifération et la migration neurales (Dey *et al.*, 2005), la neuroprotection (Zhang *et al.*, 2015), la neurodégénérescence (Fang *et al.*, 2015) et la signalisation synaptique (Yoshii & Constantine-Paton, 2014). De plus, ERK/Akt au niveau encéphalique participe à la neurotransmission dopaminergique (Beaulieu et al., 2006), adrénergique (Taraviras *et al.*, 2002), sérotoninergique (Cowen, 2007) et GABAergique (Balasubramanian *et al.*, 2004). ERK/Akt pourrait donc moduler la CCR en affectant d'autres mécanismes que la voie de signalisation érythropoïétinergique, nos résultats ne nous permettant pas de trancher en faveur d'une des hypothèses.

En conclusion, nos résultats montrent que la stimulation de la CCR par une élévation de CO₂/H⁺ n'est pas affectée chez les souris nouveau-nées transgéniques Tg21 ou Epo-TAg^h, mais que l'augmentation pharmacologique de sEpo-R réduit la réponse induite par le CO₂/H⁺ dans les préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière. Ces résultats suggèrent que plus que la variation des niveaux d'Epo, le rapport Epo/sEpo-R soit un facteur de régulation important de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

IV. Perspectives

L'ensemble de nos expériences réalisées sur des souris sauvages et transgéniques Tg21 et Epo-TAg^h a permis de conclure que l'Epo n'était pas nécessaire à l'obtention d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie mais qu'un déficit en Epo induisait une modification du patron ventilatoire au niveau bulbaire suite certainement à une plasticité neuronale importante chez les souris Epo-TAg^h. Par ailleurs, nos travaux expérimentaux mettent en évidence l'importance du ratio Epo/sEpo-R dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez le nouveau-né. Dans des

pathologies étant caractérisées par une insensibilité au CO₂ à la naissance comme certains CHS tel que le CCHS, nos études pourraient ouvrir de nouvelles perspectives cliniques. Pour cela, le rôle précis de l'Epo dans la régulation de la réponse ventilatoire reste encore à explorer.

Dans la poursuite de ce but, il serait donc intéressant de continuer la cartographie cellulaire supra-bulbaire afin de savoir si d'autres zones sont activées chez les Epo-TAg^h, notamment le locus coeruleus et l'hypothalamus caudal qui sont des structures majeures impliquées dans la chémoréception centrale au CO₂/H⁺. La caractérisation phénotypique des cellules activées par l'hypercapnie dans certaines régions pourrait être aussi poursuivie. Comme nous avons émis l'hypothèse que l'Epo pourrait donc agir directement sur le complexe de pré-Bötzinger, nous pourrions envisager de caractériser les neurones de la VLM avec un marquage NK1R spécifique du préBötC. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier la mise en place des structures du SNC lors du développement embryonnaire chez les souris Epo-TAg^h, afin de voir si la déficience en Epo a un impact sur le l'apoptose neuronale. L'absence de mesure des variables métaboliques, soit la consommation d'O₂ et la production de CO₂ chez les souris Epo-TAg^h pendant la mesure des variables ventilatoires, constitue une limite de notre étude. Ainsi, nous ne pouvons pas être certains que les ventilations soient aussi efficaces quand elles sont égales. En effet l'Epo pourrait impacter la demande métabolique en O₂ dont la diminution permet de diminuer l'apport en O₂ à l'organisme (Mortola *et al.*, 1989). A la suite de notre étude, nous avons donc associé à la mesure des variables ventilatoires en hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h une mesure du métabolisme énergétique par calorimétrie indirecte. Nous avons observé chez les souris Epo-TAg^h une $\dot{V}CO_2$ plus élevée que chez les souris WT, ce qui est probablement dû au fait que la réponse ventilatoire à l'hypercapnie est plus grande chez les souris Epo-TAg^h au regard des WT. De plus, nous avons observé chez les souris Epo-TAg^h une $\dot{V}O_2$ plus faible que chez les souris WT, là encore cela pourrait être dû à l'hyperventilation hypercapnique plus importante chez ces souris par rapport aux WT. Ce dernier résultat avait déjà été observé chez des souris présentant une restriction de l'expression de l'Epo-R (Teng *et al.*, 2011). Dans cette même étude, un traitement des souris WT par de l'Epo avait entraîné une augmentation de la $\dot{V}O_2$. Les effets de l'anémie sur le métabolisme avaient déjà été étudiés chez le rat ainsi que chez des patients atteints de diverses pathologies comme la thalassémie, qui est une forme d'anémie héréditaire. Chez le rat et le chien, des expériences consistant à diluer le sang de l'animal par hémodilution avaient induit une diminution de la $\dot{V}O_2$ (Cilley *et al.*, 1991, Matsuoka *et al.*, 1994). De manière intéressante, il a également été mis en évidence dans les expériences de Matsuoka et collaborateurs une augmentation significative du \dot{V}_E suite à une hémodilution (Matsuoka *et al.*, 1994). Pris ensemble, ces résultats suggèrent un rôle de l'Epo dans la régulation des dépenses énergétiques ainsi qu'une potentielle adaptation des souris Epo-TAg^h à la déficience en Epo et/ou à l'anémie. Une expérience d'ablation des corps carotidiens chez des souris sauvages et Epo-TAg^h suivie de mesures ventilatoires et métaboliques a aussi été ajoutée à la suite de notre étude initiale afin de savoir si la déficience en Epo congénitale a eu un effet sur la structure et/ou le fonctionnement des corps carotidiens. La différence selon le

stade de développement pourrait être attribuée à une diminution de l'efficacité de l'Epo en fonction du stade développemental considéré. En effet, l'Epo et l'Epo-R sont régulés au cours du développement pré et post-natal. Leur expression est maximale pendant le développement embryonnaire et diminue après la naissance pour se stabiliser à des niveaux faibles chez l'adultes (Liu et al., 1997, Juul et al., 1998). Pour confirmer cette hypothèse, il est indispensable de mesurer les niveaux d'Epo, d'Epo-R et du sEpo-R à différents âges et corrélés ces niveaux aux observations des variables ventilatoires. Par ailleurs, notre étude chez les souris adultes Epo-TAg^h a été réalisée uniquement chez les mâles, il serait donc intéressant d'aller explorer les variables ventilatoires ainsi que les structures neuronales chez des souris Epo-TAg^h femelles lors d'une hypercapnie afin de déterminer si les effets de la déficience en Epo est sexe-spécifique comme c'est le cas pour la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Jeton et al., 2017). Les premiers éléments que nous pouvons rapporter mettent en évidence une implication de la progestérone dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez les souris Epo-TAg^h. En effet, l'injection de mifépristone, un antagoniste de la progestérone, chez les Epo-TAg^h suggère un lien entre Epo et progestérone puisque la ventilation des souris Epo-TAg^h n'a pas été affectée contrairement aux souris WT ayant une concentration normale d'Epo pour qui un rôle facilitateur de la progestérone sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie a été observé.

L'ensemble des expériences complémentaires pourra permettre de comprendre de manière plus précise les mécanismes impliqués dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et notamment ceux mettant en jeu l'Epo. *In fine*, les résultats obtenus pourraient permettre d'ouvrir des pistes thérapeutiques pour des pathologies caractérisées par une insensibilité au CO₂ telle que les CHS.

Partie 3: Implication de la leptine dans la ventilation en normocapnie et en hypercapnie

Un des objectifs de ce doctorat était de déterminer l'effet d'une déficience en leptine sur la ventilation lors d'une hypercapnie en analysant les variables ventilatoires de souris adultes déficientes en leptine (*ob/ob*). D'autre part, nous avons cartographié les régions encéphaliques impliquées dans la régulation ventilatoire hypercapnique que nous avons observée *in vivo* à l'aide de l'analyse immunohistochimique de l'expression de *c-fos* sur les encéphales de ces souris.

Les résultats obtenus, présentés dans la partie 3 des résultats, suggèrent que l'effet facilitateur de la leptine sur la ventilation en condition hypercapnique serait plutôt médié par des mécanismes centraux. D'autre part, la comparaison de l'expression de *c-fos* observée chez les souris sauvages et *ob/ob* nous a permis d'identifier des groupes neuronaux pour lesquels une modification d'activité suggère leur implication dans le phénotype ventilatoire associé à un dysfonctionnement des systèmes leptinergiques. Nos données permettent également d'identifier, comme notre précédente étude sur l'Epo, chez la souris sauvage adulte les groupes neuronaux dont l'activité est modulée par l'hypercapnie à savoir le NTS, la VLM, le LC, le IPB, le RDo, la vIPAG.

I. Les souris *ob/ob* présentent une hypoventilation basale

Les mesures des variables ventilatoires en normocapnie ont révélé une diminution significative de la \dot{V}_E via une diminution du V_T chez les souris *ob/ob* par rapport au WT. Nos observations sont en accord avec des études antérieures relatant la présence d'une hypoventilation métabolique en condition basale chez les souris *ob/ob* (O'Donnell et al., 1999, O'Donnell et al., 2000). En effet, l'étude de O'Donnell et collaborateurs rapporte une $PaCO_2$ significativement élevée et une PaO_2 significativement basse, reflet d'une hypoventilation alvéolaire, chez les souris *ob/ob* par rapport au souris WT bien que ces souris ne présentent pas de diminution drastique de la ventilation comme nous l'avons observé. De la même façon que O'Donnell et collaborateurs, d'autres études qui se sont intéressées au phénotype ventilatoire des souris *ob/ob* ne rapportent pas une telle diminution de la ventilation en regard de souris WT (Tankersley et al., 1996, Bassi et al., 2012). En effet, dans ces études, la ventilation de base était quasiment similaire entre les souris *ob/ob* et WT même si l'on pouvait noter une légère tendance à la diminution de la \dot{V}_E et du V_T pour les souris *ob/ob*. Cependant dans ces études, ce sont les variables ventilatoires de souris *ob/ob* avant l'installation d'une obésité qui étaient comparées à celles de souris WT alors que les souris *ob/ob* que nous avons étudiées présentaient une obésité majeure (Tankersley et al., 1996, Bassi et al., 2012). De plus, dans l'étude de Bassi et collaborateurs, les variables respiratoires de souris *ob/ob* obèses en plus de celles de souris

ob/ob non obèses ont aussi été comparées à des souris WT et là aussi les auteurs n'ont pas constaté de variations significatives de la ventilation par rapport aux souris WT. Cependant, les variables ventilatoires dans cette étude ne sont pas rapportées à la masse de l'animal - ce qui est le cas dans notre étude - et les souris *ob/ob* utilisées lors des mesures ventilatoires sont plus jeunes (6-10 semaines) que celles utilisées dans notre étude (9-12 semaines) et donc nécessairement moins obèses puisque l'obésité des souris *ob/ob* s'installe progressivement au cours de leur croissance (Zhang et al., 1994, Tankersley et al., 1996). Ainsi, il est difficile de déterminer si la diminution de la ventilation en condition basale des souris *ob/ob* que nous avons observée est provoquée par une déficience en leptine ou si cela est dû à l'obésité secondaire à l'hyperphagie. Il est en effet possible que dans notre étude, en plus des conséquences de la déficience en leptine sur le réseau respiratoire, facteur d'hypoventilation métabolique tel que démontré par O'Donnell et collaborateurs (O'Donnell et al., 2000), le facteur obésité conduise à une diminution significative de la ventilation basale des souris *ob/ob*. A l'appui de cette hypothèse, Tankersley et ses collaborateurs démontrent que la déficience génétique en leptine influence la ventilation hypercapnique avant l'apparition d'une obésité prononcée, alors que les changements dans la respiration de base semblent dus à une augmentation de la masse corporelle en fonction de l'âge (Tankersley et al., 1996).

II. Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie à un seuil de CO₂ plus bas par rapport aux souris WT

Nous avons pu également observer que les souris *ob/ob* conservaient une réponse ventilatoire à l'hypercapnie et qu'elles répondaient à une fraction de CO₂ plus basse (3% CO₂) que les souris WT. Une hypothèse possible serait que les souris *ob/ob* aient un seuil de sensibilité au CO₂ plus bas que les souris WT. La déficience en leptine chez les souris *ob/ob* pourrait occasionner la mise en place de mécanismes activés pour des valeurs de CO₂ plus faibles afin de compenser à la fois l'impact de l'obésité sur la mécanique ventilatoire et le déficit en leptine, peptide dont on sait qu'il stimule la ventilation en conditions basale et hypercapnique. Par ailleurs, les souris *ob/ob* présentent des apnées obstructives (Yao *et al.*, 2016, Imayama & Prasad, 2017), ce qui pourrait contribuer à une élévation de leur PaCO₂ puisque la présence d'apnées répétées provoque une hypersensibilité au stimulus CO₂ en favorisant l'installation d'une hypoventilation diurne (Lopata & Onal, 1982). Dans cette même idée, les souris *ob/ob* qui hypoventilent en normocapnie comme le démontrent O'Donnell et collaborateurs par la mesure de la PaCO₂ et de la PaO₂ (O'Donnell et al., 1999), accumulent le CO₂, ce qui résulte en une PaCO₂ augmentée par rapport aux souris WT. Ainsi ce n'est pas la sensibilité intrinsèque au CO₂ qui est modulée mais le stimulus CO₂ appliqué qui se retrouve automatiquement augmenté, provoquant donc une hyper-réaction pour une même fraction de CO₂ imposée par rapport aux souris WT. En faveur de ces deux dernières hypothèses non

exclusives, qui font intervenir une augmentation de la PaCO_2 chez les souris *ob/ob* par rapport aux WT, Duffin et Collaborateurs ont montré une réponse ventilatoire à l'hypercapnie en deux temps (Duffin et al., 2000). En effet, à partir d'un certain seuil de PaCO_2 , la \dot{V}_E augmente via une augmentation majeure du V_T en regard de celle de la f_R puis au-delà d'un second seuil de PaCO_2 plus élevé, l'augmentation de la \dot{V}_E se caractérise par une augmentation de la f_R en plus de celle du V_T . Chez les souris *ob/ob*, la participation de la f_R à l'élévation de la \dot{V}_E intervient dès 5% de CO_2 en normoxie alors qu'il faut attendre un stimulus à 8% de CO_2 chez les souris WT pour observer une augmentation significative de la f_R . Ainsi, le second seuil de PCO_2 décrit par Duffin et Collaborateurs semble atteint dès 5% de CO_2 chez les souris *ob/ob* contre 8% de CO_2 chez les souris WT. Notre hypothèse est que l'hypoventilation en normocapnie conduirait à une élévation de la PaCO_2 des souris *ob/ob*. Par conséquent, il est possible qu'une exposition à 5% de CO_2 chez les souris *ob/ob* soit suffisante pour atteindre un seuil de sensibilité qui serait finalement identique à celui des souris WT, permettant ainsi une augmentation de la f_R dès ce seuil de capnie.

III. Les souris *ob/ob* ont une réponse ventilatoire à l'hypercapnie diminuée par rapport aux souris WT

En plus d'un profil ventilatoire basal caractérisé par une diminution de la ventilation et malgré la persistance d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie, les souris *ob/ob* présentent une réponse ventilatoire à l'hypercapnie diminuée par rapport aux souris WT, essentiellement par une moindre augmentation du V_T . Nos données sont conformes aux études antérieures qui montrent également une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et cela est principalement dû au fait de la diminution de l'augmentation du V_T chez les souris *ob/ob* lors d'une hypercapnie (Tankersley et al., 1996, O'Donnell et al., 2000). Ainsi, l'absence de leptine semble provoquer une dépression de la CCR et de sa régulation lors d'une élévation de la capnie. Il est important de rappeler que la diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie observée chez les souris *ob/ob* est présente avant l'apparition de l'obésité (Tankersley et al., 1996). Il semblerait donc que la déficience génétique en leptine influence la réponse ventilatoire à l'hypercapnie indépendamment de la masse corporelle. De la même façon, il a été démontré que la supplémentation aiguë en leptine entraîne une augmentation significative de la ventilation de base mais aussi de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie indépendamment de la prise de poids, ce qui est plus en faveur d'un effet ventilatoire direct de la leptine (O'Donnell et al., 1999). La conséquence mécanique de l'obésité sur le système ventilatoire ne semblerait donc pas jouer un rôle fondamental dans le développement du phénotype ventilatoire altéré des souris *ob/ob* même s'il tout à fait possible que l'obésité, une fois mise en place, participe à l'exacerbation des altérations ventilatoires comme discuté précédemment. En effet, la diminution de la compliance thoraco-pulmonaire (Naimark & Cherniack, 1960) et des volumes

pulmonaires en fonction de la répartition de la masse grasse, l'excès de travail des muscles respiratoires, la faiblesse des muscles respiratoires (Rochester & Enson, 1974) ou encore la présence d'apnées obstructives du sommeil (Lopata & Onal, 1982), peuvent participer au développement d'une hypoventilation et d'une diminution de la réponse ventilatoire au CO₂.

IV. La diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie observée chez les souris *ob/ob* ne semble pas dépendre de mécanismes périphériques

L'étude des variables ventilatoires en hypercapnie normoxique et hyperoxique avait pour but de discriminer les effets centraux des effets périphériques de la déficience en leptine sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Il semblerait que les chémorécepteurs périphériques interviennent peu dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris *ob/ob* et WT. Cela semble en accord avec la littérature qui admet généralement une moindre implication des chémorécepteurs périphériques dans la chémosensibilité au CO₂/H⁺ (Heeringa et al., 1979, Lahiri & Forster, 2003, Forster & Smith, 2010). Des études faites chez le chien ont montré que les chémorécepteurs périphériques interviendraient cependant sur le seuil de sensibilité des chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺ (Blain et al., 2010, Smith et al., 2015). L'inhibition des chémorécepteurs périphériques par l'hyperoxie ne change pas significativement la réponse ventilatoire à l'hypercapnie des souris *ob/ob* et WT de celle développée lors de l'hypercapnie normoxique bien qu'elle tende à être diminuée. Des résultats récents confirment nos observations en indiquant que l'effet stimulant de la leptine sur la ventilation ne s'exerce pas par des mécanismes périphériques impliquant les corps carotidiens (Olea *et al.*, 2015). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la leptine exerce ses effets ventilatoires directement au niveau central. De surcroît, les récepteurs à la leptine sont présents dans plusieurs régions encéphaliques connues pour avoir un rôle dans l'élaboration et la régulation de la CCR, notamment le NTS, LC, la rVLM, IPB, LH (Mercer et al., 1996, Mercer et al., 1998, Elias et al., 2000, Hosoi et al., 2002, Grill & Hayes, 2009, Bassi et al., 2012, Ciriello & Moreau, 2013). C'est donc en agissant sur les structures encéphaliques impliquées dans la CCR et sa modulation qui présentent des récepteurs à la leptine que celle-ci pourrait moduler la ventilation basale et la chémoréception centrale au CO₂/H⁺. De plus, il a été également démontré que des micro-injections de leptine dans le cNTS chez le rat (Inyushkin et al., 2009), dans le RTN/pFRG chez la souris *ob/ob* (Bassi et al., 2014) ou encore au niveau du ventricule latéral chez le rat (Bassi et al., 2014, Bassi et al., 2012) sont associées à une augmentation de la \dot{V}_E basale et en réponse à un stimulus CO₂, ce qui suggère des effets directs au niveau central de la leptine sur la CCR. Cependant, nous avons observé une perte de l'augmentation de la f_R lors de l'hypercapnie hyperoxique par rapport à l'hypercapnie normoxique pour les différents challenges hypercapniques chez les souris *ob/ob* et WT. Les chémorécepteurs périphériques

projetent sur le c/mNTS (Finley & Katz, 1992) qui lui-même projette sur des structures importantes dans la rythmogenèse respiratoire comme la VLM qui contient le préBötC (Norgren, 1978, Ross et al., 1985). Ainsi lorsque les chémorécepteurs périphériques sont au silence, l'absence d'activation du c/mNTS, principal lieu d'intégration des informations issues des afférences périphériques, peut se traduire par une diminution de la f_R et donc de la \dot{V}_E . La présence de récepteurs à la leptine au niveau des corps carotidiens (Porzionato et al., 2011, Messenger et al., 2013) pourrait laisser penser qu'une petite partie des effets ventilatoires de la leptine est médiée par des mécanismes périphériques et qu'en conséquence l'absence de leptine chez les *ob/ob* participe à diminuer dans une moindre mesure la \dot{V}_E de ces souris entre l'hypercapnie normoxique et l'hypercapnie hypercapnique mais aussi par rapport aux souris WT en hypercapnie hyperoxique à 8% de CO₂. Cela peut également appuyer l'hypothèse du rôle des chémorécepteurs périphériques dans la sensibilité des chémorécepteurs centraux au CO₂/H⁺.

V. Cartographie des régions encéphaliques de souris *ob/ob* en hypercapnie

L'étude immunohistologique basée sur l'expression de *c-fos* sur des souris *ob/ob* montre que la déficience en leptine, de façon directe ou indirecte, induit d'une part une élévation du nombre de neurones c-FOS positifs en normocapnie, dans le c/mNTS, la VLM, le IPB et le ROb, et d'autre part provoque l'absence de l'augmentation d'expression de *c-fos* observée en présence de leptine lors d'une hypercapnie.

- Description du réseau neuronal activé par l'hypercapnie chez les souris WT

Les résultats obtenus permettent de délimiter le réseau neuronal activé par l'hypercapnie à 8% de CO₂ chez la souris adulte WT alors que la plupart des données de la littérature utilisant la même approche, au même stade de développement, ont été obtenues chez le rat. En effet, peu d'études chez la souris sont concernées (Bravo *et al.*, 2016) et nous pouvons compter dans celles-ci notre étude sur l'implication du réseau neuronal respiratoire bulbaire dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie de souris Epo-TAgh adulte. En effet, dans l'étude sur les souris Epo-TAgh adultes présentée dans la partie 2, nous avons également identifié une augmentation de l'activité neuronale chez les souris WT à 4% de CO₂ dans le c/mNTS, la rVLM et le RTN/pFRG. De façon similaire à ce qui est décrit chez le rat, nos résultats montrent une élévation du nombre de neurones c-FOS positifs induite par l'hypercapnie dans le c/mNTS, la VLM, le LC, le IPB, le RDo et la vIPAG (Berquin et al., 2000a, Teppema et al., 1997). Le c/mNTS, le IPB et le LC projettent sur le complexe de PréBötC et la VLM et sont des acteurs majeurs de la chémosensibilité au CO₂. En effet, le c/mNTS est une structure bulbaire impliquée dans la modulation du rythme respiratoire au cours d'un challenge hypercapnique qui reçoit les afférences chémosensorielles provenant de la périphérie (Claps & Torrealba, 1988, Finley & Katz, 1992). La VLM contient le complexe de pré-Bötzinger qui est le générateur de

l'inspiration. Le LC, quant à lui, est considéré comme la principale source d'innervation noradrénergique dans l'encéphale, et des neurones du LC sont sensibles au CO_2/H^+ (de Carvalho et al., 2014). Cependant, il a été publié dans la littérature une augmentation du nombre de neurones *c-FOS* positifs dans le RTN/pFRG et le ROb (Teppema et al., 1997, Pete *et al.*, 2002), populations cellulaires pour lesquelles il est clairement admis qu'elles soient chémosensibles au CO_2/H^+ (Guyenet & Bayliss, 2015b, Severson et al., 2003). De façon surprenante, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de *c-fos* dans ces régions chez les souris témoins. Dans notre étude sur les souris Epo-TAg^h adultes (Partie 2 des résultats) nous n'avons également pas observé d'élévation du nombre de neurones *c-FOS* positifs dans le Rob, toutefois concernant le RTN/pFRG nos résultats concordaient avec ceux de la littérature. Le RTN est considéré comme étant un site important de la chémoréception centrale et d'intégration de signaux issus de chémorécepteurs périphériques qui projettent sur le cNTS (Takakura et al., 2006a). Il apparaît donc nécessaire de procéder à une vérification des comptes histologiques pour tenter d'expliquer pourquoi nous ne retrouvons pas ce qui est décrit dans la littérature ainsi que ce que nous décrivons dans notre étude sur les souris Epo-TAg^h adultes. Une des pistes explicatives pourrait être qu'il s'agisse d'une erreur quant à la localisation rostro-caudale du RTN/pFRG. Concernant le Rob, comme nos deux études sont concordantes et que les résultats de la littérature qui attestent d'une augmentation d'activité des neurones du ROb en terme d'expression de *c-fos* ont été obtenus chez le rat, il est possible que la différence d'espèce soit à l'origine de cet effet différent de l'hypercapnie sur les neurones du ROb (Teppema et al., 1997). De plus, dans les études menées chez le rat pour lesquelles une telle observation a été réalisée, la stimulation était plus importante (10-15% de CO_2). Il est possible que 4 et 8% de CO_2 ne soient pas des stimuli suffisant pour induire une élévation du nombre de neurones positifs dans cette région (Teppema et al., 1997, Pete et al., 2002). En effet, Teppema et collaborateurs stipulent dans leur étude que l'hypercapnie provoque l'expression de *c-fos* de manière dose dépendante de la dose.

- Conséquence de l'absence de leptine sur l'expression de *c-fos* en normocapnie

La comparaison du niveau d'expression basal entre les souris WT et les souris *ob/ob* suggère que la déficience des systèmes leptinergiques ait des conséquences sur le niveau d'activité de plusieurs structures respiratoires. Nos résultats montrent une élévation du nombre de neurones *c-FOS* positifs au niveau du c/m et vlNTS, de la VLM, du IPB, et du ROb. Cette suractivité suggérée par l'expression de *c-fos* pourrait être causée directement par l'absence de leptine qui selon cette hypothèse exercerait un effet modérateur lorsqu'elle est présente. Cependant, dans la mesure où l'influence de la leptine sur la commande respiratoire est facilitatrice (Bassi et al., 2016), et que ces structures sont elles aussi à l'origine d'une facilitation de la ventilation, cela est peu probable. Une autre possibilité serait que cette augmentation soit en relation avec la situation physiologique d'hypoventilation dans laquelle se trouvent les souris *ob/ob* (O'Donnell et al., 1999). En effet, l'hypoventilation constatée chez ces souris diminue la

PaO₂ et augmente la PaCO₂ de manière chronique (O'Donnell et al., 1999). L'augmentation de CO₂ et la diminution d'O₂ doivent être détectées et conduire à l'activation directe ou indirecte de tout ou partie des structures centrales impliquées dans la modulation réflexe de la commande respiratoire. En effet, le c/mNTS, la VLM, le ROb et le IPB font partie de ces voies nerveuses (Berquin et al., 2000a, Teppema et al., 1997, Yokota *et al.*, 2015). Une hypothèse plausible est donc que la suractivité observée au sein de ces structures chez les souris *ob/ob* soit liée à ce phénomène. Au regard de l'hypoventilation constante chez ces souris, cette suractivité n'apparaît pas être en mesure d'exercer une facilitation suffisante pour une ventilation optimale. Cependant le marqueur d'activité neuronale à court terme (*c-fos*) que nous avons utilisé n'est pas optimal lorsqu'il s'agit d'observer des effets à long terme et donc la plasticité neuronale que pourrait induire la déficience en leptine sur le réseau neuronal impliqué dans la ventilation en condition basale. Une hypothèse alternative expliquant cette élévation de l'expression de *c-fos* serait que l'activité neuronale à court terme que nous observons dans certaines régions du tronc cérébral soit liée à une plus grande sensibilité des souris *ob/ob* au stress inhérent à l'expérimentation. Il a été montré que l'ingestion excessive et à long terme de nourriture, ainsi que son retrait subséquent, favorisent l'obtention de résultats liés au stress chez la souris (Ulrich-Lai *et al.*, 2015). Les souris *ob/ob* rentrent dans ce cadre puisque dépourvues de leptine, elles ingèrent continuellement de la nourriture et que la stimulation au CO₂ s'effectue dans une cage où la nourriture est moins accessible et en quantité restreinte. Les structures qui pourraient être concernées par l'implication d'un stress sont par exemple le LH, le NTS et la rVLM. Nous n'avons pas observé de différence d'expression basale au niveau du diencéphale mais le NTS et la rVLM font parties des régions où l'expression basale de *c-fos* est augmentée.

- **Caractérisation du réseau neuronal activé par l'hypercapnie lorsque les systèmes leptinergiques sont déficients**

Toutes les structures qui chez la souris WT présentaient une augmentation de l'expression de *c-fos* induite par l'hypercapnie *i.e.* le c/mNTS, la VLM, le LC, le IPB, la vIPAG et le RDo ne présentaient pas une telle modification chez les souris *ob/ob*. Cette absence d'élévation d'activité peut participer à la nette diminution de la réponse respiratoire au CO₂ constatée chez ces souris déficientes en leptine (O'Donnell et al., 2000). Selon cette hypothèse, la leptine participerait donc à la réponse respiratoire au CO₂ en contribuant à élever l'activité des neurones de ces structures.

Cependant, les souris *ob/ob* présentent tout de même une réponse respiratoire à l'hypercapnie ce qui suggère la mise en jeu, au moins en partie, de mécanismes impliqués dans l'adaptation de la ventilation. En ce sens, le résultat de la comparaison de l'expression de *c-fos* observé chez des souris *ob/ob* en normocapnie et en hypercapnie doit être relativisé au regard de l'effet de l'absence de leptine dès la normocapnie. En effet, si l'on compare le nombre de neurones c-FOS-positifs en hypercapnie des souris WT et des souris *ob/ob*, il est à noter d'une part une élévation du niveau d'activité au sein du ROb et de la région RTN/pFRG chez les

souris *ob/ob* et d'autre part plus spécifiquement, une élévation de la proportion de neurones sérotoninergiques activés dans le RPa et le ROb. Ces augmentations suggèrent la participation de ces régions à la moindre réponse respiratoire au CO₂ des souris *ob/ob*. Il est possible que l'augmentation de l'expression de *c-fos* dans ces structures, induite par l'hypercapnie de base des souris, masque une élévation d'activité supplémentaire induite par les 8% de CO₂ imposés. Au niveau diencephalique nous avons constaté une seule élévation du niveau d'activité neuronale suggérée par *c-fos* au sein du PaLP. Cette élévation pourrait participer chez la souris *ob/ob* à la réponse ventilatoire à l'hypercapnie. En effet, chez le chat comme chez le rat, des études permettent de relier cette structure à la régulation de la CCR. En effet, des travaux anatomiques ont montré que des neurones du noyau paraventriculaire sont connectés au réseau respiratoire ponto-bulbaire (Saper *et al.*, 1976b, Yeh *et al.*, 1997), et également aux motoneurones phréniques (Yeh *et al.*, 1997) et que l'injection de glutamate au niveau du noyau paraventriculaire entraîne une augmentation de la ventilation (Yeh *et al.*, 1997). En outre, la présence de projections du mNTS, zone de projection des afférences issues des chémorécepteurs périphériques, vers les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus a été rapportée (Ricardo & Koh, 1978, Ter Horst *et al.*, 1989). Et enfin, la partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire (dont le PaLP) projette vers la rVLM. Ces différents éléments indiquent donc que cette structure peut moduler la ventilation. Plus précisément, les liens anatomiques avec le c/mNTS sont en faveur de son implication suite à l'activation de structures nerveuses incluses dans le circuit de la chémosensibilité périphérique. Cependant, dans la mesure où l'augmentation du nombre de neurones c-FOS-positif dans le PaLP n'est pas accompagnée d'une élévation du nombre de ces neurones au sein du c/mNTS, il est peu probable que l'activation suggérée par l'expression de *c-fos* que nous observons dépende d'une telle voie. Cette analyse est d'ailleurs corrélée au fait que nous n'observons pas de modification de l'expression de *c-fos* induite par l'hypercapnie chez les souris *ob/ob* alors que les neurones du PaLP projettent vers cette structure. Ainsi, il est possible que l'action respiratoire du PaLP s'exerce directement sur les motoneurones phréniques (non étudiée dans nos travaux) ou même qu'elle participe à la régulation de variables physiologique indépendante de la ventilation au niveau de structures que nous n'avons pas étudiées. Par ailleurs, la perte d'augmentation de l'expression de *c-fos* induite par l'hypercapnie dans les autres structures encéphaliques analysées à savoir le LC, la vIPAG et le RDo chez la souris *ob/ob* par rapport aux WT n'apparaît pas être dépendante de la conséquence de l'absence de leptine dès la normocapnie. Ainsi, l'absence d'activation des neurones de ces structures lorsque les systèmes leptinergiques sont déficients pourrait être en relation avec la diminution de la réponse respiratoire au CO₂ des souris *ob/ob*. Les souris *ob/ob* répondent à l'hypercapnie même si leur réponse est amoindrie par rapport aux WT mais aucune des structures analysées hormis le PaLP ne présente une augmentation du nombre de c-FOS positifs. Pourtant il a été montré dans la littérature que l'injection de leptine dans le 4^{ème} ventricule de souris *ob/ob*, restaure la ventilation en réponse au CO₂ (Bassi *et al.*, 2012). Le 4^{ème} ventricule est situé à proximité des sites possédant des

récepteurs à la leptine (IPB, NTS) ainsi que des structures connues pour leur implication dans la modulation de la respiration en hypercapnie comme le LC, qui possèdent également des récepteurs à la leptine (Bassi et al., 2016). Une hypothèse alternative que nous pouvons formuler serait que les populations cellulaires impliquées dans la conservation de la réponse à l'hypercapnie chez les souris *ob/ob* n'expriment pas le gène *c-fos* à des niveaux détectables (Dragunow & Faull, 1989, Hughes & Dragunow, 1995). En effet, tous les neurones, lorsqu'ils sont activés, n'expriment pas nécessairement *c-fos* (Dragunow & Faull, 1989). Ceci nous oblige à faire attention lors de l'interprétation des résultats car l'absence de marquage c-FOS ne correspond pas forcément à une absence d'activité neuronale.

VI. Perspectives

L'ensemble de nos expériences a permis d'une part de confirmer le phénotype ventilatoire des souris *ob/ob*, caractérisé par une hypoventilation basale et une diminution de réponse ventilatoire à l'hypercapnie. Au-delà, cette étude est la première à s'attarder sur la ventilation de base des souris *ob/ob* et à montrer une diminution des variables ventilatoires. Nous avons par ailleurs mis en avant l'implication majeure de mécanismes centraux relayant les effets ventilatoires de la leptine. D'autre part, nos résultats ont également permis de localiser au moins en partie les sites potentiels des actions centrales de la leptine. Nos données indiquent une suractivité chez les souris *ob/ob* dans de nombreuses structures respiratoires dès la normocapnie probablement associée à l'hypoventilation des souris. Nous avons pu également observer l'absence d'augmentation du nombre de neurones c-FOS positifs induite par l'hypercapnie chez les souris *ob/ob* à l'inverse de ce que nous avons observé chez les témoins dans des structures respiratoires clés. Notre hypothèse est que cette non activation lors d'un challenge hypercapnique participe au moins en partie à la réduction de la réponse respiratoire au CO₂ des souris déficientes en leptine.

Afin d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes centraux par lesquels la leptine pourrait faciliter la ventilation en normocapnie et en hypercapnie mais aussi de compléter notre étude existante il serait souhaitable d'envisager d'autres expérimentations. D'abord la caractérisation du phénotype ventilatoire en normocapnie chez les souris *ob/ob* mériterait d'être complétée par une mesure des variables métabolique (PaO₂ et PaCO₂) afin de confirmer si la diminution de la \dot{V}_E que nous avons observée chez les souris *ob/ob* se traduit par une diminution de la PaO₂ et une augmentation de la PaCO₂ comme cela a été décrit dans la littérature (O'Donnell et al., 1999). Cela nous permettrait de valider l'hypoventilation constatée sur le plan des variables ventilatoires. Pour discriminer l'effet de la déficience en leptine de l'obésité en condition basale il pourrait être intéressant de réaliser une mesure des variables ventilatoires couplée à une mesure des variables métaboliques en fonction du stade de développement chez les souris *ob/ob*. Concernant l'abaissement du seuil de la capnie à partir duquel une réponse ventilatoire à l'hypercapnie a été observée, nous pourrions envisager également de reprendre

les tracés ventilatoires des souris *ob/ob* afin d'extraire une valeur indicative du nombre d'apnées que ces souris présentent. Ainsi nous pourrions confirmer ou infirmer notre hypothèse quant à l'implication des apnées dans l'augmentation de la chémosensibilité centrale au CO₂ des souris *ob/ob*. Dans l'étude de la cartographie des régions encéphaliques respiratoires de souris *ob/ob* en hypercapnie, nous pourrions réaliser d'autres marquages immunohistochimiques en utilisant un marqueur d'activité neuronale à long terme FOSB plus adapté à la recherche de l'installation d'un phénomène de neuroplasticité. Cela pourrait nous permettre de mieux discriminer la cause sous-jacente de l'activation de certaines structures neuronales dès la normocapnie que nous avons observé chez les souris *ob/ob*. En effet, cette activation neuronale dès la normocapnie pourrait traduire soit un phénomène de plasticité dû à la chronicité de la déficience en leptine qui pourrait instaurer des mécanismes compensatoires soit une exposition à un stress lors de l'expérimentation ou encore la présence de l'hypoventilation. Une étude de mesure des variables ventilatoires en normocapnie et en hypercapnie couplée à des injections de leptine *in vivo* dans le 4^e ventricule de souris WT pourrait être envisagée afin d'analyser l'impact central direct de la leptine sur les variables ventilatoires *in vivo*. Pour compléter cette étude, les encéphales des souris WT pourraient être prélevés directement à la fin de la mesure des variables ventilatoires soit après la normocapnie, soit après l'hypercapnie, afin de localiser, à l'aide de la détection immunohistochimique de c-FOS, les structures encéphaliques respiratoires impliquées dans les effets de la leptine sur la ventilation en normocapnie ou en hypercapnie que nous pourrions observer. Par ailleurs, nous avons réalisé des expériences de mesure de la CCR sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolées de souris nouveau-nées sauvages après application pharmacologique de leptine en normopH et en acidose métabolique que nous n'avons pas présentées dans ce manuscrit de thèse par manque de temps. Nous avons observé que la f_R était significativement augmentée de (+27,4% ; $p < 0,001$) après 20 minutes d'exposition à une concentration de 10^{-8} M de leptine en normopH par rapport aux valeurs de bases. De façon intéressante, nous avons également pu observer que la f_R n'était pas significativement différente après 30 minutes d'acidose métabolique seule ou avec application de leptine par rapports aux valeurs pré-acidose métabolique ($134,9 \pm 9,6\%$ versus $124,7 \pm 5,3\%$). Cette analyse des effets de la leptine exogène sur la CCR développée par des préparations *ex vivo* de système nerveux central vient supporter l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme central dépendant en partie de structures supra-bulbaires en normopH et laisse penser que l'implication centrale de la leptine en acidose métabolique dépendrait de mécanismes impliquant des structures supra-bulbaires ou périphériques. Il serait intéressant d'identifier l'activation des structures neuronales bulbaires impliquées dans l'effet facilitateur de la leptine que nous avons observé en normopH sur les préparations *ex vivo*.

L'ensemble des expériences complémentaires ainsi que les nouvelles perspectives expérimentales à réaliser pourront permettre de mieux comprendre les mécanismes de la leptine mis en jeu en normocapnie et en hypercapnie. *In fine*, les résultats obtenus pourraient permettre

d'ouvrir des pistes thérapeutiques pour des pathologies caractérisées par une hypoventilation basale et une insensibilité au CO₂ telles que les CHS.

ANNEXE

I. Article publié : Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants

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. Il s'agissait de caractériser le réseau neuronal du tronc cérébral activé par l'hypoxie chez la souris nouveau-née d'un jour, un modèle caractérisé par son immaturité. Notre objectif était de nous approcher de la physiologie du nouveau-né prématuré.

Les résultats obtenus ont donné lieu à un article qui vous sera présenté ci-dessous et dont les principaux éléments seront résumés en amont.

- 1 article de recherche publié en 2016 dans *Frontiers in Physiology*.

Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants

Joubert F*, Loiseau C*, **Perrin-Terrin AS***, Cayetanot F, Frugiere A, Voituron N, Bodineau L ; * co-premières auteures

Frontiers in Physiology, 2016;7:609

1. Résumé

La cartographie de structures du tronc cérébral activées durant l'hypoxie chez la souris âgée d'un jour pourrait modéliser le réseau respiratoire chez le nouveau-né prématuré

Objectif de l'étude

Caractériser les changements d'activité des populations neuronales du tronc cérébral chez des souris nouveau-nées âgées d'un jour (P1) en condition hypoxique afin d'identifier les régions encéphaliques impliquées dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie à ce stade de développement. Ce modèle animal, défini par un système nerveux central particulièrement immature à la naissance, permettrait d'approcher la neurophysiologie respiratoire du nouveau-né prématuré humain en modélisant son réseau neuronal respiratoire.

Contexte scientifique

Chez l'humain, les nouveau-nés et les prématurés en particulier, présentent des épisodes d'apnée et de bradypnée fréquents, impliquant des épisodes hypoxiques récurrents durant la période post-natale (Bryan *et al.*, 1986, Teppema & Dahan, 2010, Carroll & Agarwal, 2010, Mathew, 2011). Chez les mammifères nouveau-nés, l'hypoxie entraîne une réponse respiratoire biphasique caractérisée par une hyperventilation transitoire suivie d'une baisse sévère de la ventilation, appelée dépression ventilatoire hypoxique (HVD pour hypoxic ventilatory depression) (Neubauer *et al.*, 1990, Gozal & Gaultier, 2001, Carroll & Agarwal, 2010, Teppema & Dahan, 2010). L'hypoxémie résultant de l'HVD, surtout si elle se répète fréquemment, peut affecter les fonctions cardiovasculaires, neurocognitives et ainsi altérer la qualité de vie. Ainsi, un dysfonctionnement de la réponse ventilatoire à l'hypoxie pourrait être lié à certaines pathologies telles que le syndrome de la mort subite du nourrisson (SIDS pour Sudden Infant Death Syndrome). Les cas de SIDS sont généralement caractérisés par une apnée mortelle d'origine centrale qui pourrait être liée à une HVD importante.

Les mécanismes à l'origine de la réponse ventilatoire biphasique à l'hypoxie sont divers et restent à clarifier. L'hyperventilation transitoire est attribuée à la stimulation des chémorécepteurs périphériques, ce qui engendre une élévation d'activité neuronale dans certaines structures du réseau respiratoire bulbo-pontique, telles que le NTS_c, la VLM, le RTN/pFRG et le IPB (Vizek *et al.*, 1987, Erickson & Millhorn, 1991, Finley & Katz, 1992, Erickson & Millhorn, 1994, Hayward & Felder, 1995, Waldrop & Porter, 1995, Hirooka *et al.*, 1997, Blessing *et al.*, 1999, Takakura *et al.*, 2006a, Carroll & Agarwal, 2010, Teppema & Dahan, 2010, Guyenet & Bayliss, 2015b). En parallèle, l'HVD dépendrait de l'activation de mécanismes centraux, parmi lesquels une hyperperfusion des groupes neuronaux CO₂/H⁺-

sensibles de la surface ventrale du bulbe rachidien (Neubauer et al., 1990), un hypométabolisme consécutif à une chute d'O₂ disponible (Mortola, 2004), une libération de neuromodulateurs ayant un effet modérateur sur la CCR tels que l'adénosine (Runold *et al.*, 1989, Neubauer et al., 1990, Kawai *et al.*, 1995) ou la sérotonine (Herman *et al.*, 1999, Richter *et al.*, 1999) et d'une activation intrinsèque de cellules du bulbe rachidien, qualifiées d'O₂-sensibles, par une PO₂ faible (Nolan & Waldrop, 1993, Bodineau & Larnicol, 2001, Voituron et al., 2006, Voituron et al., 2011). La première phase d'hyperventilation augmente avec la maturation du SNC alors que la phase secondaire de dépression respiratoire est plus importante à la naissance que dans les jours qui suivent (Carroll & Agarwal, 2010, Teppema & Dahan, 2010). Ainsi alors que chez l'adulte la réponse ventilatoire à l'hypoxie est dominée par la phase d'hyperventilation, l'immaturation du SNC chez le nouveau-né fait que c'est la phase de dépression respiratoire qui prévaut sur la phase d'hyperventilation. Cette dépression respiratoire accrue pourrait en particulier résulter de l'activation d'un ou plusieurs mécanismes de défense fœtaux ; en particulier, une inhibition de la CCR fœtale *in utero* en cas hypoxémie. En effet, si la quantité d'O₂ passant à travers le placenta diminue, le fœtus suspend immédiatement ses mouvements pulmonaires, ce qui permettrait de limiter la consommation d'O₂ sans préjudice pour le fœtus puisque l'activité respiratoire dans l'utérus n'est pas une fonction vitale. Cela constituerait un mécanisme d'adaptation efficace car la réduction de la quantité d'O₂ disponible est alors compensée par une diminution de sa consommation tout au moins au niveau des muscles respiratoires. Cependant, une telle situation récurrente ou prolongée trop longtemps prive de nombreuses cellules d'un niveau suffisant d'O₂ et peut induire des effets néfastes sur l'organisme. 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'O₂ et c'est d'ailleurs une des hypothèses proposées concernant la survenue du syndrome de mort subite du nourrisson (Poets *et al.*, 1999, Hunt, 2001, Kinney *et al.*, 2001, Lavezzi, 2015).

Dans ce contexte, nous avons étudié les changements d'activité des populations neuronales du tronc cérébral impliquées dans la CCR entre la normoxie et l'hypoxie chez des souris nouveau-nées âgées d'un jour à l'aide de la détection de la protéine c-FOS, marqueur d'activité neuronale à court terme. Aussi, les différents phénotypes des populations cellulaires c-FOS-positives ont été caractérisés à l'aide de co-détections i.e. c-FOS/tyrosine hydroxylase, c-FOS/5-HT, c-FOS/PHOX2B. Notre hypothèse étant que la souris âgée d'un jour constitue un modèle d'étude pertinent en raison de l'immaturation de son SNC à la naissance, en comparaison aux autres mammifères tels que le rat et l'Homme (Teppema & Dahan, 2010, Mallard & Vexler, 2015, Darnall *et al.*, 2016). La cartographie précise des populations neuronales impliquées au cours de la réponse ventilatoire à l'hypoxie dans ce modèle murin, nous a permis par extrapolation une modélisation du réseau respiratoire chez le nouveau-né prématuré humain.

Résultats

- Réponse ventilatoire biphasique induite par l'hypoxie

Les changements de ventilation induits par l'hypoxie ont été appréciés par pléthysmographie (Bartlett & Tenney, 1970) sur une population de souris nouveau-nées. Cette série expérimentale se proposait de vérifier le phénotype ventilatoire en normoxie et les caractéristiques de la réponse ventilatoire à l'hypoxie 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 ventilatoire biphasique avec une élévation de la ventilation observée dès les 2 premières minutes d'hypoxie suivie d'une dépression ventilatoire constatée après 25 minutes d'hypoxie. Cette réponse biphasique est concordante avec les données de la littérature (Simakajornboon *et al.*, 2004, Bairam *et al.*, 2013).

- Cartographie des structures du bulbe rachidien et du pont activées par l'hypoxie

Deux groupes de souris nouveau-nées ont été constitués et soumis pendant 90 minutes, l'un à un mélange gazeux hypoxique (11% O₂ et 89 % N₂) et l'autre à un mélange gazeux normoxique (21% O₂ et 79% N₂). 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 anesthésiées au froid (Danneman & Mandrell, 1997) puis leurs troncs cérébraux prélevés, fixés, cryoprotégés et découpés au cryostat. Les coupes transversales ainsi obtenues ont été engagées dans des protocoles d'immunodétection d'une part de c-FOS seul et d'autre part de c-FOS avec un co-marqueur (i.e. TH, 5-HT, PHOX2B), en suivant les techniques couramment utilisées et maîtrisées au laboratoire (Bodineau *et al.*, 2011, Voituron *et al.*, 2011, Joubert *et al.*, 2016). Les cellules c-FOS positives ont été comptées dans diverses structures du bulbe rachidien et du pont connues pour leur implication dans la CCR et sa modulation à l'aide d'un atlas de SNC murin (Paxinos & Franklin, 2001) et de repères anatomiques précis afin de standardiser la procédure de quantification (Berquin *et al.*, 2000b, Stornetta *et al.*, 2005, Voituron *et al.*, 2006, Voituron *et al.*, 2011, Huckstepp *et al.*, 2015). Le nombre total de cellules c-FOS-positives a ensuite été comparé entre les conditions hypoxie et normoxie pour chacune des structures.

Chez les souris nouveau-nées maintenues en normoxie, peu de cellules c-FOS-positives étaient présentes au niveau des structures du réseau respiratoire bulbo-pontique impliquées dans l'élaboration et la modulation de la CCR. En revanche, chez les souris soumises à l'hypoxie, de nombreuses structures du bulbe rachidien présentaient une élévation du nombre de cellules c-FOS positives i.e. NTS, cVLM, RTN/pFRG, PP, RMg. Parmi les cellules c-FOS-positives, aucun ou très peu des neurones du mNTS et de la cVLM étaient catécholaminergiques, aucun des neurones du RTN/pFRG n'était PHOX2B-positif alors que 18% et 25% des neurones du cNTS et du mNTS étaient PHOX2B-positifs et que 30% et 15% des neurones du PP et du RMg étaient sérotoninergiques. Des structures du pont présentaient également une augmentation du

nombre de neurones c-FOS-positifs i.e. mPB, IPB, dSubC et parmi les neurones c-FOS positifs du dSubC 45% étaient catécholaminergiques.

Discussion

- **Élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs dans le SubC**

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une élévation importante, en hypoxie par rapport à la normoxie, du nombre de neurones c-FOS-positifs d'une part au sein des neurones du dSubC dont presque la moitié était catécholaminergique et d'autre part au sein des neurones du mPB. Une telle augmentation n'avait jusque-là pas été recensée dans la littérature chez d'autres rongeurs nouveau-nés (Berquin et al., 2000b). Par contre, cette élévation du nombre de neurones c-FOS-positif a été observée chez le fœtus de mouton et la participation de ces groupes cellulaires à la mise en place de la dépression respiratoire hypoxique a déjà été rapportée et discutée (Gluckman & Johnston, 1987, Walker, 1995, Breen et al., 1997, Nitsos & Walker, 1999, Walker *et al.*, 2000, Teppema & Dahan, 2010). Cependant ces résultats n'étaient pas retrouvés chez le nouveau-né de mouton ce qui a conduit à proposer que cette élévation serait liée à la présence de neurones O₂-sensibles participant à la diminution de la CCR chez le fœtus. Cette activation neuronale serait absente à la naissance du fait d'une inhibition issue des chémorécepteurs périphériques (Breen et al., 1997).

Nous proposons donc que chez la souris nouveau-née âgée d'un jour, l'inhibition de ce mécanisme fœtal ne serait pas effective, ce qui contribuerait à renforcer la dépression respiratoire hypoxique. Le caractère particulièrement immature du nouveau-né murin en comparaison à d'autres espèces pourrait expliquer que ces observations ne soient pas reproduites chez le rat nouveau-né. Des expériences complémentaires de détection de l'expression de *c-fos* chez la souris nouveau-née plus âgée permettraient de valider notre hypothèse. Nos travaux sont à mettre en relation avec une récente publication de Lavezzi et collaborateurs qui rapportent une hypoplasie dans la région dorso-latérale du pont, où se trouve le dSubC et le mPB, 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.

- **Élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs dans le NTS et la VLM, sans activation notable des cellules catécholaminergiques**

Une élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs a été observée au niveau du NTS et de la VLM en hypoxie, deux structures qui pourraient être en lien avec l'hyperventilation hypoxique comme cela a été précédemment décrit dans la littérature (Finley & Katz, 1992, Nunez-Abades *et al.*, 1993, Erickson & Millhorn, 1994, Hayward & Felder, 1995, Soulier *et al.*, 1997, Teppema et al., 1997, Teppema & Dahan, 2010).

De plus, nos données indiquent que pas ou très peu de neurones catécholaminergiques sont activés par l'hypoxie dans la VLM et le NTS. L'absence d'activation des neurones catécholaminergiques dans la VLM en hypoxie, à l'inverse de ce qui a été établi auparavant chez des rats nouveau-nés ou adultes (Erickson & Millhorn, 1994, Soulier et al., 1997, Teppema et al., 1997, Kaur *et al.*, 2001) pourrait d'une part contribuer à minimiser l'hyperventilation hypoxique qui dépend en partie de ces neurones et d'autre part participer à une dépression ventilatoire et même la renforcer. Si cette observation est probablement due au degré d'immaturation du SNC des souris âgées d'un jour, nous supposons qu'un mécanisme similaire pourrait exacerber les problèmes respiratoires rencontrés à la naissance chez les prématurés.

- **Élévation du nombre de neurones c-FOS-positifs au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien**

Une augmentation du nombre de neurones c-FOS-positifs a été observée au niveau du RTN/pFRG, structure impliquée dans la génération et l'adaptation de la CCR. Aucune des cellules c-FOS-positives de cette structure n'était PHOX2B-positif. Ces résultats suggèrent que l'hypoventilation observée chez la souris nouveau-née lors de la phase HVD ne serait pas suffisante pour induire une élévation du CO₂, qui stimulerait alors les neurones CO₂/H⁺-sensibles et ainsi permettrait une augmentation de la ventilation (Teppema et al., 1997, Nattie, 2001a, Okada et al., 2002, Guyenet *et al.*, 2005a, Stornetta et al., 2006, Teppema & Dahan, 2010) Guyenet, 2015 #3920}. 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).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que 30% des neurones c-FOS-positifs du PP étaient sérotoninergiques. Ce groupement cellulaire est considéré comme l'homologue de position du noyau arqué humain, décrit comme l'objet d'hypoplasie chez des enfants victimes de mort subite du nourrisson (Filiano & Kinney, 1992, Paterson *et al.*, 2006, Kinney *et al.*, 2011). La juxtaposition de cette observation avec l'étude de Darnall et collaborateurs qui montre que la destruction des neurones sérotoninergiques incluant ceux du PP augmenterait 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 au cours de la période post-natale. Une hypoplasie les affectant diminuerait 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.

Conclusion

Ainsi, notre étude a permis de cartographier avec précision les modifications d'activité des populations cellulaires du bulbe rachidien et du pont de souris nouveau-nées âgées d'un jour en condition d'hypoxie. L'ensemble des résultats 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. La souris nouveau-née âgée d'un jour pourrait ainsi représenter un modèle d'étude particulièrement adapté aux recherches ayant trait à la survenue de la dépression ventilatoire hypoxique chez les nouveau-nés prématurés ou sur la mort subite du nourrisson.



Key Brainstem Structures Activated during Hypoxic Exposure in One-day-old Mice Highlight Characteristics for Modeling Breathing Network in Premature Infants

Fanny Joubert^{1†}, Camille Loiseau^{1†}, Anne-Sophie Perrin-Terrin^{1,2†}, Florence Cayetanot³, Alain Frugière¹, Nicolas Voituron² and Laurence Bodineau^{1*}

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

[†]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

¹ 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, ² Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, EA2363 Hypoxie et Poumons, Bobigny, France, ³ 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 ~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 serotonergic, 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

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 long-term 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 CO₂-activated 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

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; n7, 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; vNTS, ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract; vSubC, ventral part of the Subcoeruleus nucleus; V_T , tidal volume.

initial hyperventilation fails to restore sufficient PO₂ 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 CO₂-sensitive areas (Neubauer et al., 1990); (ii) hypometabolism leading to a drop in CO₂ 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 oblongata by low PO₂ (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 one-day-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, myelination, 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, serotonergic, or PHOX2B immunoreactivities.

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 ± 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)

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 20 s (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% O₂, 79% N₂) 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_R), tidal volume (V_T), minute ventilation (\dot{V}_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_T 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_T 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 μ 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 post-hypoxic 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°C for subsequent use. Standard immunohistochemical procedures were used to locate c-FOS on 40 μ 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% H₂O₂ 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® (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 (vlNTS), *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 double-labeled 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 ± 2.6 h and the mean weight 1.42 ± 0.02 g. Their mean f_R was 139.0 ± 14.4 breaths·min⁻¹, mean V_T 25.6 ± 7.6 µl·g⁻¹, and mean \dot{V}_E 3.8 ± 1.0 ml·g⁻¹·min⁻¹ ($n = 12$).

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_R and mean V_T were $106.9 \pm 14.3\%$ and $120.9 \pm 7.6\%$ of control values, respectively, leading to a mean \dot{V}_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_R was 166.1 ± 12.5 breaths·min⁻¹, the mean V_T 35.6 ± 9.6 μl·g⁻¹, and the mean \dot{V}_E 5.4 ± 1.2 ml·g⁻¹·min⁻¹ during the normoxic control period in the unrestrained one-day-old mice that were subsequently submitted to hypoxia ($n = 8$). The mean \dot{V}_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}_E were related to the respective effects of hypoxia on both f_R and V_T . The mean f_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).

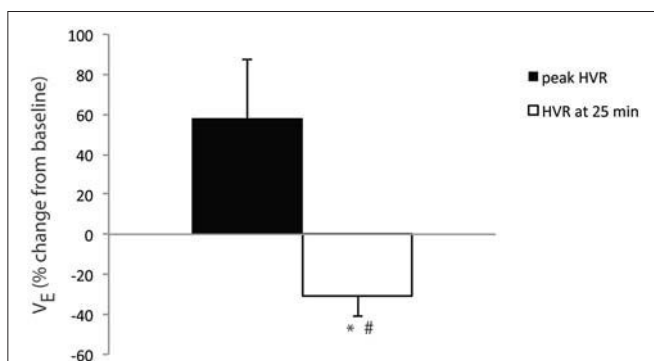


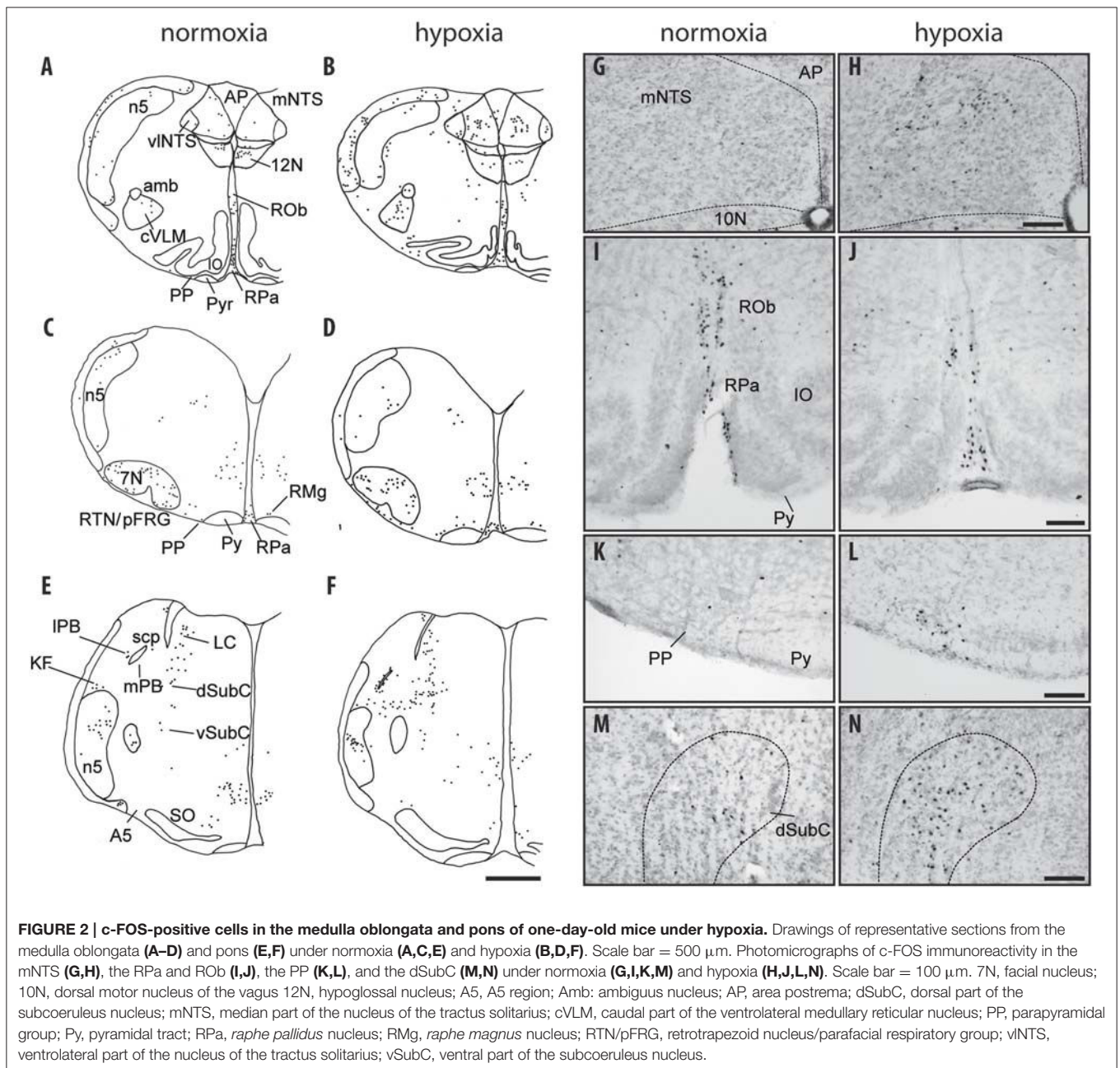
FIGURE 1 | One-day-old mice displayed a ventilatory depression in response to hypoxia. Average percent change in \dot{V}_E from baseline at 2 min (peak HVR, black bar) and 25 min (white bar) of hypoxic exposure in one-day-old mice ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs. baseline, # $p < 0.05$ vs. peak HVR.

TABLE 1 | Average number of C-FOS-positive cells in brainstem respiratory areas.

	Normoxia	Hypoxia
MEDULLA		
cNTS	16.0 ± 1.7	39.7 ± 8.0* $P < 0.033$
mNTS	35.4 ± 6.4	139.8 ± 17.8** $P < 0.008$
vNTS	42.8 ± 9.6	130.5 ± 19.9* $P < 0.011$
ROb	153.4 ± 11.7	87.6 ± 21.1 ns
RPa	107.2 ± 31.6	180.1 ± 44.0 ns
RMg	21.0 ± 2.0	50.2 ± 6.8* $P < 0.023$
rVLM	38.2 ± 9.7	66.0 ± 16.7 ns
cVLM	18.6 ± 5.4	81.9 ± 16.4** $P < 0.002$
PP	19.4 ± 7.9	80.6 ± 20.9* $P < 0.02$
RTN/pFRG	12.5 ± 2.1	30.7 ± 7.2* $P < 0.03$
7N	275 ± 8.0	216.6 ± 43.8 ns
10N	6.7 ± 2.4	23.6 ± 5.7 ns
12N	182.1 ± 25.5	122.2 ± 11.31* $P < 0.033$
PONS		
A5	21.5 ± 6.6	30.3 ± 6.14 ns
LC	37 ± 7.9	41 ± 9.4 ns
dSubC	42.6 ± 9.1	170.1 ± 32.3* $P < 0.048$
vSubC	26.4 ± 11.2	56.6 ± 8.5 ns
mPB	7.4 ± 1.4	46.0 ± 12.7** $P < 0.008$
IPB	6.8 ± 2.1	27.4 ± 6.35* $P < 0.037$
KF	7.2 ± 2.9	15.8 ± 6.1 ns

Values presented are total number of c-FOS-positive cells ± 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; PP, 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; vNTS, ventrolateral part of nucleus of the solitary tract; 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 vNTS, 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 vNTS 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 number of c-FOS-positive cells in the 10N under hypoxia than normoxia, but the difference was not significant (Table 1).

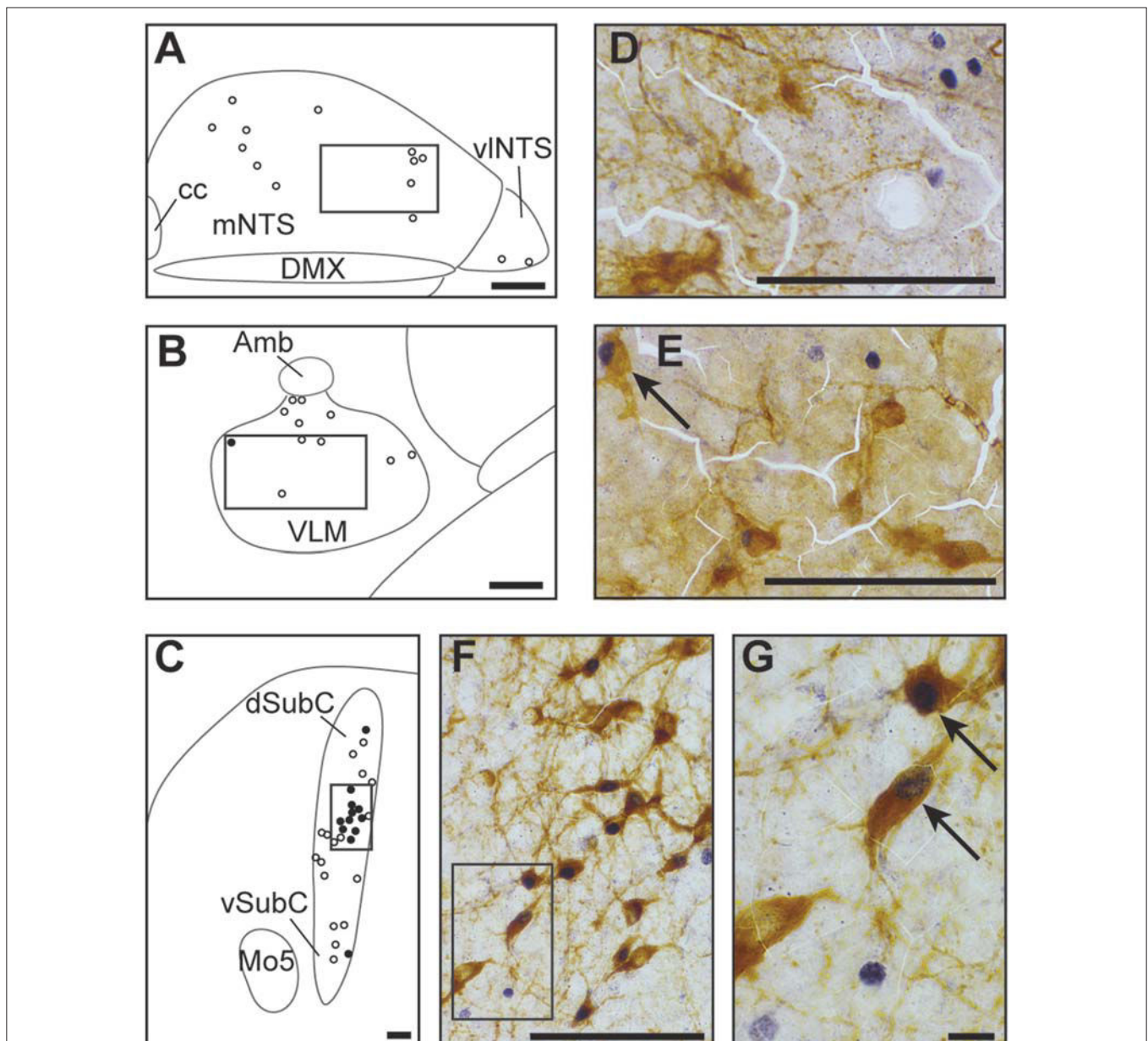


FIGURE 3 | Catecholaminergic character of hypoxic c-FOS-positive cells of one-day-old mice. Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS (white points) or both c-FOS and TH (black points) in the mNTS, vINTS (**A**), VLM (**B**), and dSubC and vSubC (**C**) under hypoxic conditions. Scale bar = 100 μm . 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 μm . (**G**) photomicrograph representing an enlargement of the black rectangle in (**F**) Scale bar = 10 μm . 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 nucleus.

Ventrolateral reticular nucleus of the medulla

The cVLM, but not the rVLM, which encompasses the pre-Bötzing 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-FOS-positive 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**).

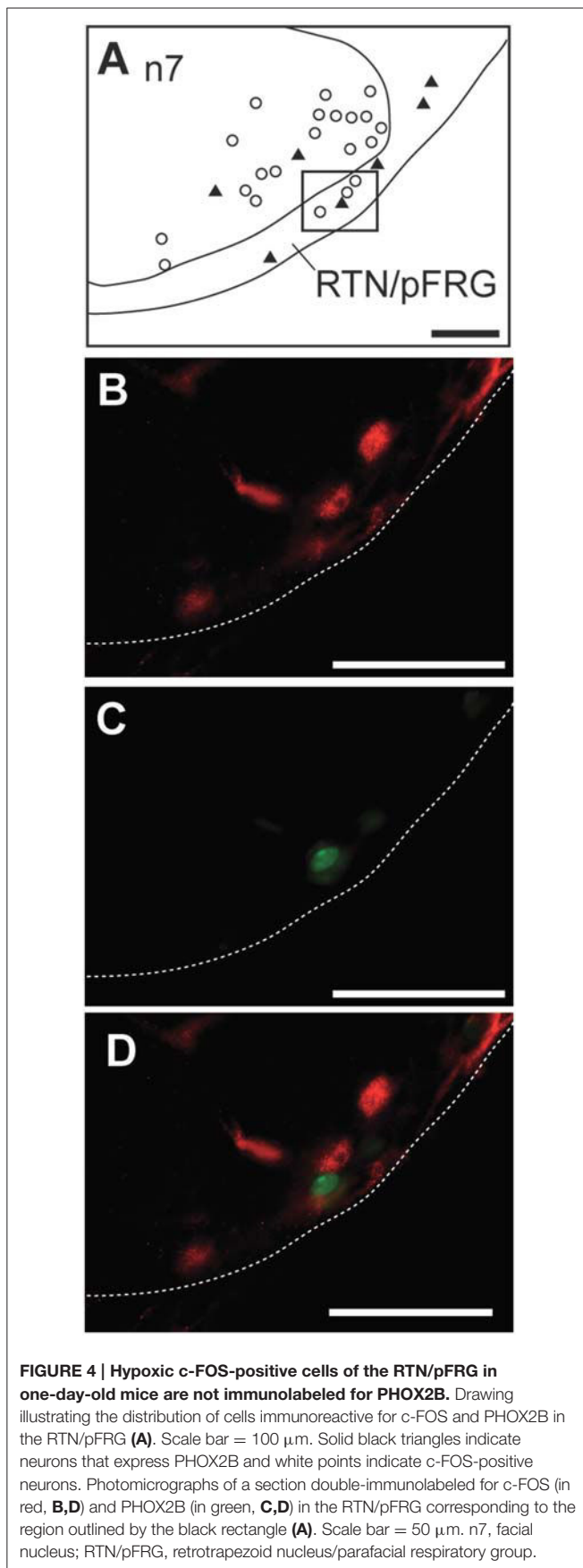


FIGURE 4 | Hypoxic c-FOS-positive cells of the RTN/pFRG in one-day-old mice are not immunolabeled for PHOX2B. Drawing illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS and PHOX2B in the RTN/pFRG (A). Scale bar = 100 μ m. Solid black triangles indicate neurons that express PHOX2B and white 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 μ 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-FOS-positive cells under hypoxic than normoxic conditions (Table 1; Figures 2C,D; +139%). Only a small portion of RMg hypoxic-c-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 IPB 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 one-day-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

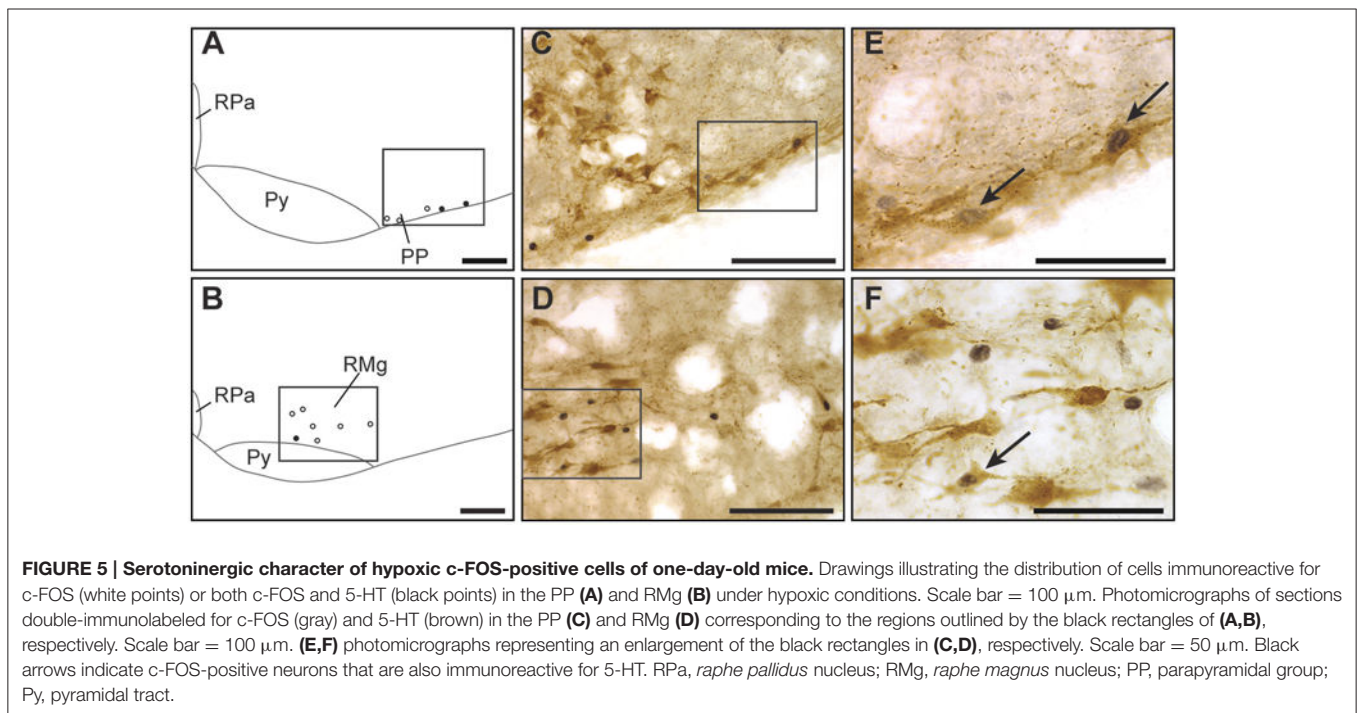


FIGURE 5 | Serotonergic character of hypoxic c-FOS-positive cells of one-day-old mice. Drawings illustrating the distribution of cells immunoreactive for c-FOS (white points) or both c-FOS and 5-HT (black points) in the PP (A) and RMg (B) under hypoxic conditions. Scale bar = 100 μ m. Photomicrographs 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 μ m. (E,F) photomicrographs representing an enlargement of the black rectangles in (C,D), respectively. Scale bar = 50 μ m. 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_T calculations based on whole-body 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 non-inhibited 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 O₂ 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 pre-motoneurons 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 serotonergic. In addition to serotonergic 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_A 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-FOS*-positive 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 IPB. 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 one-day-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 one-day-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 CO₂ and O₂ 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 PHOX2B-negative 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 serotonergic 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-positive neurons of the RTN/pFRG. This was suggested by the scarcity or absence of TH-positive or PHOX2B-positive cells among the c-FOS-positive-cells. Finally, our results suggest that 5-HT neurons of the PP, shown to be involved in arousal from sleep, are the only serotonergic 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

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.

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., Lombroso, 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/S0304-4522(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 solitarius 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
- 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/jappphysiol.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
- Enhörning, G., Van, S. S., Lundgren, C., and Vargas, I. (1998). Whole-body 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 serotonergic 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 apnoea 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 serotonin-containing 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 hypoxia-induced 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., Dupuy, 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., Kourdoughli, N., Hilaire, G., and Voituren, N. (2011). Differences in serotonergic metabolism possibly contribute to differences in breathing phenotype of FVB/N and C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol.* 110, 1572–1581. 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 Bonofiglio, 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-Garçon, 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 CO₂. *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., Vlastic, V., Li, H., and Sawhani, 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/jappphysiol.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 intermedullary 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 Olivier, 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). Hypoxia-sensing 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.

RÉSUMÉ

Les patients atteints de syndromes d'hypoventilation centrale ont une hypoventilation associée à une sensibilité au CO₂ réduite ou abolie, au moins pendant le sommeil. A ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique (Gozal, 1998, Cielo & Marcus, 2014). Ce constat nous a conduit à étudier les mécanismes de modulation de la commande centrale respiratoire (CCR) de base ou lors d'une hypercapnie par 3 molécules distinctes (i.e. l'étonogestrel, l'érythropoïétine, la leptine) dont l'implication dans la réponse ventilatoire à l'hypercapnie préalablement démontrée ou suggérée a éveillé un intérêt thérapeutique.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse a constitué d'une part à caractériser l'influence de ces molécules sur la ventilation de base et sur la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, d'autre part à déterminer en parallèle leurs mécanismes d'action. Pour aborder cette problématique, nous avons mené nos expérimentations sur des souris sauvages recevant de l'étonogestrel et des souris génétiquement modifiées sous-exprimant l'érythropoïétine (Epo-TAg^h) et déficientes en leptine (*ob/ob*). Afin d'appréhender les mécanismes centraux mis en jeu par l'ETO en normocapnie, nous avons couplé l'analyse de la CCR lors d'applications pharmacologiques à de l'histologie fonctionnelle sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolé de souris nouveau-née. En revanche pour étudier les mécanismes d'actions de l'Epo et la leptine en normocapnie et lors d'une hypercapnie, nous avons couplé une analyse des variables ventilatoires enregistrées par pléthysmographie à de l'histologie fonctionnelle sur des souris *ob/ob* et Epo-TAg^h. Pour ces dernières, une analyse de la CCR sur des préparations *ex vivo* de bulbe rachidien-moelle épinière isolé de souris nouveau-né Epo-TAg^h a également été réalisée.

Nos données obtenues chez l'animal sauvagesont permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant de l'ETO sur la f_R de base en normocapnie. L'effet global du progestatif semble résulter de la sommation d'un effet facilitateur bulbaire dépendant d'interactions avec des récepteurs GABA_A et NMDA et de l'activation des systèmes sérotoninergiques. L'ensemble de nos expériences réalisées sur les souris génétiquement modifiées Epo-TAg^h et *ob/ob* ont permis de conclure que l'Epo ou la leptine n'était pas nécessaire à l'obtention d'une réponse ventilatoire à l'hypercapnie mais qu'un déficit en Epo ou en leptine induisait une modification du patron ventilatoire et du réseau neuronal activé par l'hypercapnie au niveau bulbaire pour l'Epo et également supra-bulbaire et diencephalique pour la leptine. Nous posons ainsi l'hypothèse que ces modifications soient reliées à une plasticité neuronale importante induite par la déficience en Epo et en leptine.

Les données obtenues ouvrent des perspectives quant au fait de déterminer si les mécanismes enclenchés par les progestatifs de la famille des gonanes visant à moduler la CCR pourraient être utilisés comme une alternative thérapeutique pertinente pour le traitement des troubles respiratoires rencontrés chez des patients souffrants de syndrome d'hypoventilation centrale. Enfin, la plasticité du réseau neuronal respiratoire induite par la déficience en Epo et en leptine pourrait aider à comprendre plus encore les mécanismes de la chémoréception centrale au CO₂/H⁺ et mettre en avant des cibles thérapeutiques potentielles jusque-là insoupçonnées pour le traitement des CHS.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdala, A. P., J. F. Paton and J. C. Smith, 2015: Defining inhibitory neurone function in respiratory circuits: opportunities with optogenetics? *J Physiol*, **593**, 3033-3046.
- Abu-Shaweesh, J. M., I. A. Dreshaj, A. J. Thomas, M. A. Haxhiu, K. P. Strohl and R. J. Martin, 1999: Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. *J Appl Physiol (1985)*, **87**, 484-490.
- Achard, P., S. Zanella, R. Rodriguez and G. Hilaire, 2005: Perinatal maturation of the respiratory rhythm generator in mammals: from experimental results to computational simulation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **149**, 17-27.
- Adamcio, B., D. Sargin, A. Stradomska, L. Medrihan, C. Gertler, F. Theis, M. Zhang, M. Muller, I. Hassouna, K. Hannke, S. Sperling, K. Radyushkin, A. El-Kordi, L. Schulze, A. Ronnenberg, F. Wolf, N. Brose, J. S. Rhee, W. Zhang and H. Ehrenreich, 2008: Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol*, **6**, 37.
- Adrian, E. D. and F. J. Buytendijk, 1931: Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish. *J Physiol*, **71**, 121-135.
- Ahima, R. S., 2000: Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res*, **26**, 42-56.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier, 2000: Leptin. *Annu Rev Physiol*, **62**, 413-437.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran and J. S. Flier, 1998: Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, **101**, 1020-1027.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. S. Flier, 1996: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**, 250-252.
- Akazawa, C., R. Shigemoto, Y. Bessho, S. Nakanishi and N. Mizuno, 1994: Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol*, **347**, 150-160.
- Al Maskari, M. Y. and A. A. Alnaqdy, 2006: Correlation between Serum Leptin Levels, Body Mass Index and Obesity in Omanis. *Sultan Qaboos Univ Med J*, **6**, 27-31.
- Albrecht, A. N., U. Kornak, A. Boddich, K. Suring, P. N. Robinson, A. C. Stiege, R. Lurz, S. Stricker, E. E. Wanker and S. Mundlos, 2004: A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet*, **13**, 2351-2359.
- Aldes, L. D., M. E. Chapman, R. B. Chronister and J. W. Haycock, 1992: Sources of noradrenergic afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. *Brain Res Bull*, **29**, 931-942.
- Alheid, G. F., P. A. Gray, M. C. Jiang, J. L. Feldman and D. R. McCrimmon, 2002: Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat. *J Neurocytol*, **31**, 693-717.
- Allen, W. M., 1930: Physiology of the corpus luteum: the preparation and some chemical properties of progesterin, a hormone of the corpus luteum which produces progestational proliferation. *American Journal of Physiology*, **92**, 174-188.
- Allen, W. M., 1974: Recollections of my life with progesterone. *Gynecol Invest*, **5**, 142-182.
- Allen, W. M. and G. W. Corner, 1929a: Physiology of the corpus luteum. 2. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *American Journal of Physiology*, **88**, 326-339.
- Allen, W. M. and G. W. Corner, 1929b: Physiology of the corpus luteum: 3. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. *American Journal of Physiology*, **88**, 340-346.
- Almaguer-Melian, W., D. Merceron-Martinez, N. Pavon-Fuentes, E. Alberti-Amador, R. Leon-Martinez, N. Ledon, S. Delgado Ocana and J. A. Bergado Rosado, 2015: Erythropoietin Promotes Neural Plasticity and Spatial Memory Recovery in Fimbria-Fornix-Lesioned Rats. *Neurorehabil Neural Repair*, **29**, 979-988.

- Alonso, G., V. Phan, I. Guillemain, M. Saunier, A. Legrand, M. Anoaï and T. Maurice, 2000: Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, **97**, 155-170.
- Amiel, J., V. Dubreuil, N. Ramanantsoa, G. Fortin, J. Gallego, J. F. Brunet and C. Goridis, 2009: PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. *Respir. Physiol Neurobiol*, **168**, 125-132.
- Amiel, J., 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 and S. Lyonnet, 2003: Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat. Genet*, **33**, 459-461.
- Anand, B. K. and J. R. Brobeck, 1951: Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, **77**, 323-324.
- Anderson, T. M., A. J. Garcia, 3rd, N. A. Baertsch, J. Pollak, J. C. Bloom, A. D. Wei, K. G. Rai and J. M. Ramirez, 2016: A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature*, **536**, 76-80.
- Anderson, T. M. and J. M. Ramirez, 2017: Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. *F1000Res*, **6**, 139.
- Andrade, D. C., R. Iturriaga, F. Jeton, J. Alcayaga and N. Voituron, 2018: Acute effects of systemic erythropoietin injections on carotid body chemosensory activity following hypoxic and hypercapnic stimulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, in press.
- Antic, N. A., B. A. Malow, N. Lange, R. D. McEvoy, A. L. Olson, P. Turkington, W. Windisch, M. Samuels, C. A. Stevens, E. M. Berry-Kravis and D. E. Weese-Mayer, 2006: PHOX2B mutation-confirmed congenital central hypoventilation syndrome: presentation in adulthood. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **174**, 923-927.
- Aoki, M. and Y. Nakazono, 1992: Raphe magnus-induced inhibition of medullary and spinal respiratory activities in the cat. In: Y. Honda, Y. Miyamoto, K. Konno and J. G. Widdicombe (eds.), *Control of Breathing and its Modeling Perspective*. Plenum Press, New York.
- Arata, A., 2009: Respiratory activity of the neonatal dorsolateral pons in vitro. *Respir Physiol Neurobiol*, **168**, 144-152.
- Arcasoy, M. O., X. Jiang and Z. A. Haroon, 2003: Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 999-1007.
- Aristote, 1965: Sur la respiration. *Petits traités d'histoire naturelle*.
- Arita, H., N. Kogo and N. Koshiya, 1987: Morphological and physiological properties of caudal medullary expiratory neurons of the cat. *Brain Res*, **401**, 258-266.
- Armbruster, B. N., X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze and B. L. Roth, 2007: Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5163-5168.
- Atwood, C. W., 2005: Sleep-related hypoventilation: the evolving role of leptin. *Chest*, **128**, 1079-1081.
- Bachetti, T., I. Matera, S. Borghini, M. Di Duca, R. Ravazzolo and I. Ceccherini, 2005: Distinct pathogenetic mechanisms for PHOX2B associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Mol Genet*, **14**, 1815-1824.
- Baciu, I., C. Oprisiu, P. Derevenco, V. Vasile, A. Muresan, M. Hriscu and I. Chis, 2000: The brain and other sites of erythropoietin production. *Rom J Physiol*, **37**, 3-14.
- Bado, A., S. Lévassieur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel and M. J. Lewin, 1998: The stomach is a source of leptin. *Nature*, **394**, 790-793.
- Bagnasco, M., P. S. Kalra and S. P. Kalra, 2002: Plasma leptin levels are pulsatile in adult rats: effects of gonadectomy. *Neuroendocrinology*, **75**, 257-263.
- Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel, P. Hekerman, P. C. Heinrich, H. G. Joost and W. Becker, 2002: Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol*, **16**, 859-872.

- Bairam, A., D. Lumbroso and V. Joseph, 2013: Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. *Respir. Physiol Neurobiol*, **185**, 515-525.
- Balachandran, J. S., J. F. Masa and B. Mokhlesi, 2014: Obesity Hypoventilation Syndrome Epidemiology and Diagnosis. *Sleep Med. Clin*, **9**, 341-347.
- Balasubramanian, S., J. A. Teissere, D. V. Raju and R. A. Hall, 2004: Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J Biol Chem*, **279**, 18840-18850.
- Bali, N., J. M. Arimoto, N. Iwata, S. W. Lin, L. Zhao, R. D. Brinton, T. E. Morgan and C. E. Finch, 2012: Differential responses of progesterone receptor membrane component-1 (Pgrmc1) and the classical progesterone receptor (Pgr) to 17beta-estradiol and progesterone in hippocampal subregions that support synaptic remodeling and neurogenesis. *Endocrinology*, **153**, 759-769.
- Balland, E., J. Dam, F. Langlet, E. Caron, S. Steculorum, A. Messina, S. Rasika, A. Falluel-Morel, Y. Anouar, B. Dehouck, E. Trinquet, R. Jockers, S. G. Bouret and V. Prevot, 2014: Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab*, **19**, 293-301.
- Ballot, O., V. Joseph and J. Soliz, 2015a: Endogenous brain erythropoietin is a potent sex-specific respiratory stimulant in adult and newborn mice. *J Appl Physiol (1985)*, **118**, 1386-1395.
- Ballot, O., S. Laouafa, E. Elliot-Portal, R. Tam, N. Voituron, V. Joseph and J. Soliz, 2015b: The central chemosensitivity is not altered by cerebral erythropoietin. *Neurosci Lett*, **609**, 63-68.
- Banks, W. A., 2004: The many lives of leptin. *Peptides*, **25**, 331-338.
- Banks, W. A., C. R. DiPalma and C. L. Farrell, 1999: Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*, **20**, 1341-1345.
- Banks, W. A. and C. L. Farrell, 2003: Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**, E10-15.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan and L. M. Maness, 1996: Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, **17**, 305-311.
- Banks, W. A. and C. R. Lebel, 2002: Strategies for the delivery of leptin to the CNS. *J Drug Target*, **10**, 297-308.
- Barann, M., M. Gothert, M. Bruss and H. Bonisch, 1999: Inhibition by steroids of [14C]-guanidium 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.
- Barillot, J. C., L. Grelot, S. Reddad and A. L. Bianchi, 1990: Discharge patterns of laryngeal motoneurons in the cat: an intracellular study. *Brain Res*, **509**, 99-106.
- Barnard, E. A., P. Skolnick, R. W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. N. Bateson and S. Z. Langer, 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.
- Barnes, M. J., R. C. Rogers, M. J. Van Meter and G. E. Hermann, 2010: Co-localization of TRHR1 and LepRb receptors on neurons in the hindbrain of the rat. *Brain Res*, **1355**, 70-85.
- Bartlett, D., Jr. and S. M. Tenney, 1970: Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol*, **10**, 384-395.
- Bartman, M. E., J. E. Wilkerson and S. M. Johnson, 2010: 5-HT₃ receptor-dependent modulation of respiratory burst frequency, regularity, and episodicity in isolated adult turtle brainstems. *Respir Physiol Neurobiol*, **172**, 42-52.
- Baskin, D. G., M. W. Schwartz, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, Jr., J. F. Breininger, Z. Jonak, J. Schaefer, M. Krouse, C. Burghardt, L. A. Campfield, P. Burn and J. P. Kochan, 1999: Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem*, **47**, 353-362.
- Bassi, M., W. I. Furuya, J. V. Menani, D. S. Colombari, J. M. do Carmo, A. A. da Silva, J. E. Hall, T. S. Moreira, I. C. Wenker, D. K. Mulkey and E. Colombari, 2014: Leptin into the ventrolateral medulla facilitates chemorespiratory response in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Acta Physiol (Oxf)*, **211**, 240-248.
- Bassi, M., W. I. Furuya, J. Vanderlei Menani, D. S. De Almeida Colombari, J. M. Do Carmo, A. Da Silva, J. E. Hall, I. C. Wenker, D. Mulkey and E. Colombari, 2013: Effects of leptin in the retrotrapezoid nucleus (RTN) on CO₂-sensitivity and respiration. *FASEB J*, **27**.

- Bassi, M., W. I. Furuya, D. B. Zoccal, J. V. Menani, D. S. Colombari, D. K. Mulkey and E. Colombari, 2016: Facilitation of breathing by leptin effects in the central nervous system. *J Physiol*, **594**, 1617-1625.
- Bassi, M., W. I. Furuya, D. B. Zoccal, J. V. Menani, E. Colombari, J. E. Hall, A. A. da Silva, J. M. do Carmo and D. S. Colombari, 2015a: Control of respiratory and cardiovascular functions by leptin. *Life Sci*, **125**, 25-31.
- Bassi, M., H. Giusti, C. M. Leite, J. A. Anselmo-Franci, J. M. do Carmo, A. A. da Silva, J. E. Hall, E. Colombari and M. L. Glass, 2012: Central leptin replacement enhances chemorespiratory responses in leptin-deficient mice independent of changes in body weight. *Pflugers Arch*, **464**, 145-153.
- Bassi, M., N. B. Nakamura, W. I. Furuya, D. S. Colombari, J. V. Menani, J. M. do Carmo, A. A. da Silva, J. E. Hall and E. Colombari, 2015b: Activation of the brain melanocortin system is required for leptin-induced modulation of chemorespiratory function. *Acta Physiol (Oxf)*, **213**, 893-901.
- Baudry, M., X. Bi and C. Aguirre, 2013: Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscience*, **239**, 280-294.
- Baulieu, E. E., 1991: Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol. Cell*, **71**, 3-10.
- Baumann, H., K. K. Morella, D. W. White, M. Dembski, P. S. Bailon, H. Kim, C. F. Lai and L. A. Tartaglia, 1996: The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8374-8378.
- Bautista, T. G., P. G. Burke, Q. J. Sun, R. G. Berkowitz and P. M. Pilowsky, 2010: The generation of post-inspiratory activity in laryngeal motoneurons: a review. *Adv Exp Med Biol*, **669**, 143-149.
- Bayliss, D. A., J. Barhanin, C. Gestreau and P. G. Guyenet, 2015: The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflugers Arch*, **467**, 917-929.
- Bayliss, D. A., J. A. Cidlowski and D. E. Millhorn, 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, D. A., D. E. Millhorn, E. A. Gallman and J. A. Cidlowski, 1987: Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **84**, 7788-7792.
- Bayliss, D. A., E. M. Talley, J. E. Sirois and Q. Lei, 2001: TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respiration Physiology*, **129**, 159-174.
- Baynes, R. D., G. K. Reddy, Y. J. Shih, B. S. Skikne and J. D. Cook, 1993: Serum form of the erythropoietin receptor identified by a sequence-specific peptide antibody. *Blood*, **82**, 2088-2095.
- Bazan, J. F., 1989: A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun*, **164**, 788-795.
- Becerra, S. P. and J. Amaral, 2002: Erythropoietin--an endogenous retinal survival factor. *N Engl J Med*, **347**, 1968-1970.
- Behan, M. and R. Kinkead, 2011: Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Compr. Physiol*, **1**, 2101-2139.
- Behan, M. and C. F. Thomas, 2005: Sex hormone receptors are expressed in identified respiratory motoneurons in male and female rats. *Neuroscience*, **130**, 725-734.
- Behan, M. and J. M. Wenninger, 2008: Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respir. Physiol Neurobiol*, **164**, 213-221.
- Behan, M., A. G. Zabka, C. F. Thomas and G. S. Mitchell, 2003: Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir. Physiol Neurobiol*, **136**, 249-263.
- Behbehani, M. M., 1995: Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.*, **46**, 575-605.
- Belelli, D., A. Casula, A. Ling and J. J. Lambert, 2002: The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*, **43**, 651-661.
- Belelli, D. and J. J. Lambert, 2005: Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci*, **6**, 565-575.
- Bellingham, M. C., 1998: Driving respiration: the respiratory central pattern generator. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **25**, 847-856.

- Ben-Ari, Y., I. Khalilov, K. T. Kahle and E. Cherubini, 2012: The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, **18**, 467-486.
- Benagiano, G., F. M. Primiero and M. Farris, 2004: Clinical profile of contraceptive progestins. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, **9**, 182-193.
- Benarroch, E. E., 2012: GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications. *Neurology*, **78**, 578-584.
- Bennett, B. D., G. P. Solar, J. Q. Yuan, J. Mathias, G. R. Thomas and W. Matthews, 1996: A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*, **6**, 1170-1180.
- Benomar, Y., A. F. Roy, A. Aubourg, J. Djiane and M. Taouis, 2005a: Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J*, **388**, 929-939.
- Benomar, Y., S. Wetzler, C. Larue-Achagiotis, J. Djiane, D. Tome and M. Taouis, 2005b: In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, **242**, 59-66.
- Berger, A. J., 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, A. J., 1980: The distribution of the cat's carotid sinus nerve afferent and efferent cell bodies using the horseradish peroxidase technique. *Brain Res*, **190**, 309-320.
- Bernard, D. G., A. Li and E. E. Nattie, 1996: Evidence for central chemoreception in the midline raphe. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **80**, 108-115.
- Bernaudin, M., A. Bellail, H. H. Marti, A. Yvon, D. Vivien, I. Duchatelle, E. T. Mackenzie and E. Petit, 2000: Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*, **30**, 271-278.
- Berquin, P., L. Bodineau, F. Gros and N. Larnicol, 2000a: Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.*, **857**, 30-40.
- Berquin, P., F. Cayetanot, F. Gros and N. Larnicol, 2000b: Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res.*, **877**, 149-159.
- Berry-Kravis, E. M., L. Zhou, C. M. Rand and D. E. Weese-Mayer, 2006: Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **174**, 1139-1144.
- Bertrand, D., S. Valera, S. Bertrand, M. Ballivet and D. Rungger, 1991: Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport*, **2**, 277-280.
- Bertrand, F. and A. Hugelin, 1971: Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J. Neurophysiol*, **34**, 189-207.
- Bester, H., J. M. Besson and J. F. Bernard, 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, C. L. and A. A. Widmann, 1998: Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology*, **139**, 677-687.
- Betz, H. and B. Laube, 2006: Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem*, **97**, 1600-1610.
- Biancardi, V., K. C. Bicego, M. C. Almeida and L. H. Gargaglioni, 2008: Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. *Pflugers Arch*, **455**, 1119-1128.
- Bianchi, A. L., 1971: [Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation]. *J. Physiol (Paris)*, **63**, 5-40.
- Bianchi, A. L., 1974: [Modalities of discharge and anatomic-functional properties of medullary respiratory neurons]. *J. Physiol (Paris)*, **68**, 555-587.
- Bianchi, A. L., M. avit-Saubie and J. Champagnat, 1995a: Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev*, **75**, 1-45.
- Bianchi, A. L., M. Denavit-Saubie and J. Champagnat, 1995b: Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev.*, **75**, 1-45.
- Bianchi, A. L. and C. Gestreau, 2009: The brainstem respiratory network: an overview of a half century of research. *Respir. Physiol Neurobiol*, **168**, 4-12.

- Bianchi, A. L., L. Grelot, S. Iscoe and J. E. Remmers, 1988: Electrophysiological properties of rostral medullary respiratory neurones in the cat: an intracellular study. *J. Physiol*, **407**, 293-310.
- BICKELMANN, A. G., C. S. BURWELL, E. D. ROBIN and R. D. WHALEY, 1956: Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation; a Pickwickian syndrome. *Am. J. Med*, **21**, 811-818.
- Bieger, D. and D. A. Hopkins, 1987: Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J. Comp Neurol*, **262**, 546-562.
- Biener, E., M. Charlier, V. K. Ramanujan, N. Daniel, A. Eisenberg, C. BJORBAEK, B. HERMAN, A. GERTLER and J. DJIANE, 2005: Quantitative FRET imaging of leptin receptor oligomerization kinetics in single cells. *Biol Cell*, **97**, 905-919.
- Biscoe, T. J., 1971: Carotid body: structure and function. *Physiol Rev*, **51**, 437-495.
- Biscoe, T. J., A. Lall and S. R. Sampson, 1970: Electron microscopic and electrophysiological studies on the carotid body following intracranial section of the glossopharyngeal nerve. *J Physiol*, **208**, 133-152.
- Bissonnette, J. and S. Knopp, 2004a: Hypercapnic ventilatory response in mice lacking the 65 kDa isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65). *Respiratory Research*, **5**, 3.
- Bissonnette, J. M. and S. J. Knopp, 2004b: Hypercapnic ventilatory response in mice lacking the 65 kDa isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65). *Respir. Res*, **5**, 3.
- Bjorbaek, C. and B. B. Kahn, 2004: Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, **59**, 305-331.
- Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva and J. S. Flier, 1997: Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, **272**, 32686-32695.
- Blackmore, P. F., J. Neulen, F. Lattanzio and S. J. Beebe, 1991: Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem*, **266**, 18655-18659.
- Blain, G. M., C. A. Smith, K. S. Henderson and J. A. Dempsey, 2009: Contribution of the carotid body chemoreceptors to eupneic ventilation in the intact, unanesthetized dog. *J Appl Physiol (1985)*, **106**, 1564-1573.
- Blain, G. M., C. A. Smith, K. S. Henderson and J. A. Dempsey, 2010: Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J Physiol*, **588**, 2455-2471.
- Blanke, M. L. and A. M. J. VanDongen, 2009: Activation Mechanisms of the NMDA Receptor.
- Bleakman, D., 1999: Kainate receptor pharmacology and physiology. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 558-566.
- Blessing, W. W., Y. Yu and E. Nalivaiko, 1999: Medullary projections of rabbit carotid sinus nerve. *Brain Res*, **816**, 405-410.
- Blier, P., 2000: Serotonergic drugs and panic disorder. *J. Psychiatry Neurosci*, **25**, 237-238.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge, 1993: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-39.
- Blixt, J., E. Gunnarson and M. Wanecek, 2018: Erythropoietin Attenuates the Brain Edema Response after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, **35**, 671-680.
- Bloom, F. E. and M. Morales, 1998: The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochem Res*, **23**, 653-659.
- Blumberg, M. S. and G. Sokoloff, 1998: Thermoregulatory competence and behavioral expression in the young of altricial species--revisited. *Dev Psychobiol*, **33**, 107-123.
- Boado, R. J., E. K. Hui, J. Z. Lu and W. M. Pardridge, 2010: Drug targeting of erythropoietin across the primate blood-brain barrier with an IgG molecular Trojan horse. *J Pharmacol Exp Ther*, **333**, 961-969.
- Bodineau, L., F. Cayetanot and A. Frugiere, 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., F. Cayetanot and A. Frugiere, 2001: Fos study of ponto-medullary areas involved in the in vitro hypoxic respiratory depression. *Neuroreport*, **12**, 3913-3916.
- Bodineau, L., F. Cayetanot, D. Marlot, T. Collin, F. Gros and A. Frugiere, 2004: Endogenous 5-HT_{1/2} systems and the newborn rat respiratory control. A comparative in vivo and in vitro study. *Respir. Physiol Neurobiol*, **141**, 47-57.
- Bodineau, L., F. Cayetanot, F. Sadani-Makki, V. Bach, F. Gros, A. Lebleu, T. Collin and A. Frugiere, 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. *Pediatr.Res.*, **53**, 266-273.
- Bodineau, L., A. Frugiere, D. Marlot and F. Wallois, 2000b: Effect of hypoxia on the activity of respiratory and non-respiratory modulated retrotrapezoid neurons of the cat. *Auton.Neurosci*, **86**, 70-77.
- Bodineau, L. and N. Larnicol, 2001: Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience*, **108**, 643-653.
- Bodineau, L., C. Taveau, H. H. Le Quan Sang, G. Osterstock, I. Queguiner, F. Moos, A. Frugiere and C. Llorens-Cortes, 2011: Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology*, **152**, 3492-3503.
- Bokinsky, G. E., L. D. Hudson and J. V. Weil, 1973: Impaired peripheral chemosensitivity and acute respiratory failure in Arnold-Chiari malformation and syringomyelia. *N Engl J Med*, **288**, 947-948.
- Bomont, L., A. Bilger, S. Boyet, P. Vert and A. Nehlig, 1992: Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, **66**, 33-45.
- Bongianni, F., D. Mutolo, F. Nardone and T. Pantaleo, 2006: GABAergic and glycinergic inhibitory mechanisms in the lamprey respiratory control. *Brain Res*, **1090**, 134-145.
- Bonnet, M., C. Delavaud, K. Laud, I. Gourdou, C. Leroux, J. Djiane and Y. Chilliard, 2002: Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev*, **42**, 399-413.
- Bonsdorff, E. and E. Jalavisto, 1948: A humoral mechanism in Anoxic erythrocytosis. *Acta Physiologica*, **16**, 150-170.
- Borovska, J., V. Vyklicky, E. Stastna, V. Kapras, B. Slavikova, M. Horak, H. Choudounska and L. Vyklicky, Jr., 2012: Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, **166**, 1069-1083.
- Boukari, R., F. Marcouiller and V. Joseph, 2015: Relative Contribution of Nuclear and Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. *Adv Exp Med Biol*, **860**, 261-267.
- Boukari, R., O. Rossignol, C. Baldy, F. Marcouiller, A. Bairam and V. Joseph, 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.
- Bouret, S. G., 2008: Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. *Endocrinology*, **149**, 875-876.
- Bouvier, J., M. Thoby-Brisson, N. Renier, V. Dubreuil, J. Ericson, J. Champagnat, A. Pierani, A. Chedotal and G. Fortin, 2010: Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci*, **13**, 1066-1074.
- Bowlby, M. R., 1993: Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol*, **43**, 813-819.
- Braat, S. and R. F. Kooy, 2015: The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*, **86**, 1119-1130.
- Bradley, S. R., V. A. Pieribone, W. Wang, C. A. Severson, R. A. Jacobs and G. B. Richerson, 2002: Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. *Nat. Neurosci*, **5**, 401-402.
- Bradley, T. D., R. Rutherford, F. Lue, H. Moldofsky, R. F. Grossman, N. Zamel and E. A. Phillipson, 1986: Role of diffuse airway obstruction in the hypercapnia of obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis*, **134**, 920-924.
- Branco, L. G., T. S. Moreira, P. G. Guyenet, P. M. Lally, A. Kawai, R. W. Putnam, N. L. Chamberlin, C. B. Saper, A. V. Gourine, M. Kanamaru and I. Homma, 2009: Commentaries on Viewpoint: Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol (1985)*, **106**, 1467-1470.
- Bravo, K., J. L. Eugenin and I. Llona, 2016: Perinatal Fluoxetine Exposure Impairs the CO2 Chemoreflex. Implications for Sudden Infant Death Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **55**, 368-376.
- Breen, S., S. Rees and D. Walker, 1997: Identification of brainstem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. *Brain Research*, **748**, 107-121.
- Brines, M., 2010: The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif*, **29**, 86-92.

- Brines, M. and A. Cerami, 2005: Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 484-494.
- Brines, M., G. Grasso, F. Fiordaliso, A. Sfacteria, P. Ghezzi, M. Fratelli, R. Latini, Q. W. Xie, J. Smart, C. J. Su-Rick, E. Pobre, D. Diaz, D. Gomez, C. Hand, T. Coleman and A. Cerami, 2004: Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14907-14912.
- Brines, M. L., P. Ghezzi, S. Keenan, D. Agnello, N. C. de Lanerolle, C. Cerami, L. M. Itri and A. Cerami, 2000: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10526-10531.
- Brinton, R. D., R. F. Thompson, M. R. Foy, M. Baudry, J. Wang, C. E. Finch, T. E. Morgan, C. J. Pike, W. J. Mack, F. Z. Stanczyk and J. Nilsen, 2008: Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*, **29**, 313-339.
- Broch, L., R. D. Morales, A. V. Sandoval and M. S. Hedrick, 2002: Regulation of the respiratory central pattern generator by chloride-dependent inhibition during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J Exp Biol*, **205**, 1161-1169.
- Brockhaus, J. and K. Ballanyi, 1998: Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. *Eur J Neurosci*, **10**, 3823-3839.
- Brockhaus, J., K. Ballanyi, J. C. Smith and D. W. Richter, 1993: Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. *J Physiol*, **462**, 421-445.
- Brown, N., J. Kerby, T. P. Bonnert, P. J. Whiting and K. A. Wafford, 2002: Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol*, **136**, 965-974.
- Brown, T. M. and E. Fee, 2002: Walter Bradford Cannon: Pioneer Physiologist of Human Emotions. *American Journal of Public Health*, **92**, 1594-1595.
- Brugniaux, J. V., V. Pialoux, G. E. Foster, C. T. Duggan, M. Eliasziw, P. J. Hanly and M. J. Poulin, 2011: Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and ventilation in humans. *Eur Respir J*, **37**, 880-887.
- Bryan, A. C., G. Bowas and J. E. Maloney, 1986: Control of breathing in the fetus and the newborn.
- Buemi, M., E. Cavallaro, F. Floccari, A. Sturiale, C. Aloisi, M. Trimarchi, F. Corica and N. Frisina, 2003: The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, **62**, 228-236.
- Bullard, A. J. and D. M. Yellon, 2005: Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro. *Cardiovasc Drugs Ther*, **19**, 333-336.
- Bunn, H. F., 2013: Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **3**, a011619.
- Bunn, H. F., J. Gu, L. E. Huang, J. W. Park and H. Zhu, 1998: Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol*, **201**, 1197-1201.
- Burgos-Ramos, E., J. A. Chowen, J. Argente and V. Barrios, 2010: Regional and temporal differences in leptin signaling in rat brain. *Gen Comp Endocrinol*, **167**, 143-152.
- Burguera, B., M. E. Couce, G. L. Curran, M. D. Jensen, R. V. Lloyd, M. P. Cleary and J. F. Poduslo, 2000: Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes*, **49**, 1219-1223.
- Buritova, J. and J. Besson, 1999: Expression de la protéine c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière : une technique pour étudier certains aspects physiopharmacologiques de la nociception. *Médecine/sciences*, **10**, 1126-1134.
- Burke, P. G., S. B. Abbott, S. McMullan, A. K. Goodchild and P. M. Pilowsky, 2010: Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Botzinger complex. *Neuroscience*, **167**, 528-539.
- Burwell, C. S., E. D. Robin, R. D. Whaley and A. G. Bickelmann, 1994: Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation--a Pickwickian Syndrome. 1956. *Obes Res*, **2**, 390-397.
- Butera, R. J., Jr., J. Rinzel and J. C. Smith, 1999: Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J Neurophysiol*, **82**, 382-397.

- Byrum, C. E. and P. G. Guyenet, 1987: Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J. Comp Neurol*, **261**, 529-542.
- Byrum, C. E., R. Stornetta and P. G. Guyenet, 1984: Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res*, **303**, 15-29.
- Bystrzycka, E. K., 1980: Afferent projections to the dorsal and ventral respiratory nuclei in the medulla oblongata of the cat studied by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res*, **185**, 59-66.
- Byts, N. and A. L. Siren, 2009: Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med*, **1**, 4.
- Cabral, A., P. N. De Francesco and M. Perello, 2015: Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**, 44.
- Caburet, S., A. Demarez, L. Moumne, M. Fellous, E. De Baere and R. A. Veitia, 2004: A recurrent polyaniline expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J Med Genet*, **41**, 932-936.
- Cahill, M. A., 2007: Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, **105**, 16-36.
- Callachan, H., G. A. Cottrell, N. Y. Hather, J. J. Lambert, J. M. Nooney and J. A. Peters, 1987: Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci*, **231**, 359-369.
- Camacho-Arroyo, I., V. I. Hernandez-Molina, M. Rivas-Suarez, C. Guerra-Araiza and M. G. Gonzalez-Moran, 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, A. A., I. A. Khan, K. N. Westlund, K. D. Cliffer and W. D. Willis, 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, A. A., I. A. Khan, K. N. Westlund and W. D. Willis, 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.
- Campo, A., G. Fruhbeck, J. J. Zulueta, J. Iriarte, L. M. Seijo, A. B. Alcaide, J. B. Galdiz and J. Salvador, 2007: Hyperleptinaemia, respiratory drive and hypercapnic response in obese patients. *Eur Respir J*, **30**, 223-231.
- Cao, H., 2014: Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol*, **220**, T47-59.
- Cao, Y., Y. Fujito, K. Matsuyama and M. Aoki, 2006a: Effects of electrical stimulation of the medullary raphe nuclei on respiratory movement in rats. *J. Comp Physiol A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol*, **192**, 497-505.
- Cao, Y., K. Matsuyama, Y. Fujito and M. Aoki, 2006b: Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci. Res*, **56**, 322-331.
- Caravagna, C., E. M. Schneider Gasser, O. Ballot, V. Joseph and J. Soliz, 2015: Chronic overexpression of cerebral Epo improves the ventilatory response to acute hypoxia during the postnatal development. *Int J Dev Neurosci*, **44**, 84-91.
- Caravagna, C. and J. Soliz, 2015: PI3K and MEK1/2 molecular pathways are involved in the erythropoietin-mediated regulation of the central respiratory command. *Respir Physiol Neurobiol*, **206**, 36-40.
- Carnot, P. and C. Deflandre, 1906: Sur l'activité hématopoïétique de serum au cours de la régénération du sang. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, **143**, 384-386
- Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha and R. V. Considine, 1996a: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, **348**, 159-161.
- Caro, J. F., M. K. Sinha, J. W. Kolaczynski, P. L. Zhang and R. V. Considine, 1996b: Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, **45**, 1455-1462.
- Carroll, J. L. and A. Agarwal, 2010: Development of ventilatory control in infants. *Paediatr Respir Rev*, **11**, 199-207.

- Carroll, M. S., P. P. Patwari, A. S. Kenny, C. D. Brogadir, T. M. Stewart and D. E. Weese-Mayer, 2014: Residual chemosensitivity to ventilatory challenges in genotyped congenital central hypoventilation syndrome. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **116**, 439-450.
- Carroll, M. S., P. P. Patwari and D. E. Weese-Mayer, 2010: Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **108**, 979-988.
- Carver, C. M. and D. S. Reddy, 2013: Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl)*, **230**, 151-188.
- Casabiell, X., V. Pineiro, M. A. Tome, R. Peino, C. Dieguez and F. F. Casanueva, 1997: Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 4270-4273.
- Cayetanot, F., F. Gros and N. Larnicol, 2002: Postnatal changes in the respiratory response of the conscious rat to serotonin 2A/2C receptor activation are reflected in the developmental pattern of fos expression in the brainstem. *Brain Res*, **942**, 51-57.
- Ceddia, R. B., W. N. William, Jr., F. B. Lima, A. R. Carpinelli and R. Curi, 1998: Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res*, **31**, 715-722.
- Cerpa, V. J., M. L. Aylwin, S. Beltran-Castillo, E. U. Bravo, I. R. Llona, G. B. Richerson and J. L. Eugenin, 2015: Prenatal-perinatal Nicotine Alters Neonatal Raphe Neurons: Meaning for Sudden Infant Death Syndrome. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Chan, W. S., A. Sideris, J. J. Sutachan, G. J. Montoya, T. J. Blanck and E. Recio-Pinto, 2013: Differential regulation of proliferation and neuronal differentiation in adult rat spinal cord neural stem/progenitors by ERK1/2, Akt, and PLCgamma. *Front Mol Neurosci*, **6**, 23.
- Chandra, D., F. Jia, J. Liang, Z. Peng, A. Suryanarayanan, D. F. Werner, I. Spigelman, C. R. Houser, R. W. Olsen, N. L. Harrison and G. E. Homanics, 2006: GABAA receptor alpha 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **103**, 15230-15235.
- Chang, Z., E. Ballou, W. Jiao, K. E. McKenna, S. F. Morrison and D. R. McCrimmon, 2013: Systemic leptin produces a long-lasting increase in respiratory motor output in rats. *Front Physiol*, **4**, 16.
- Chapin, J. L., 1954: Ventilatory response of the unrestrained and unanesthetized hamster to CO₂. *Am J Physiol*, **179**, 146-148.
- Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper and J. P. Morgenstern, 1996: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, **84**, 491-495.
- Chen, J., Z. Yang and X. Zhang, 2015: Carbamylated Erythropoietin: A Prospective Drug Candidate for Neuroprotection. *Biochem Insights*, **8**, 25-29.
- Chen, S. C., J. P. Kochan, L. A. Campfield, P. Burn and R. J. Smeyne, 1999: Splice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *J Recept Signal Transduct Res*, **19**, 245-266.
- Chen, Z. Y., P. Asavaritikrai, J. T. Prchal and C. T. Noguchi, 2007: Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem*, **282**, 25875-25883.
- Chen, Z. Y., R. Warin and C. T. Noguchi, 2006: Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis*, **3**, 68-75.
- Cherniack, R. M., 1958: Respiratory effects of obesity. *Can Med Assoc J*, **80**, 613-616.
- Chernov, M. M., J. S. Erlichman and J. C. Leiter, 2010: Ionic mechanisms of central CO₂ chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol*, **173**, 298-304.
- Cheung, C. C., D. K. Clifton and R. A. Steiner, 1997: Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, **138**, 4489-4492.
- Chitravanshi, V. C. and H. N. Sapru, 1995: Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol*, **268**, R851-858.

- Choi, D., S. A. Schroer, S. Y. Lu, L. Wang, X. Wu, Y. Liu, Y. Zhang, H. Y. Gaisano, K. U. Wagner, H. Wu, R. Retnakaran and M. Woo, 2010: Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells. *J Exp Med*, **207**, 2831-2842.
- Chua, S. C., Jr., I. K. Koutras, L. Han, S. M. Liu, J. Kay, S. J. Young, W. K. Chung and R. L. Leibel, 1997: Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*, **45**, 264-270.
- Chung, H., H. Lee, F. Lamoke, W. J. Hrushesky, P. A. Wood and W. J. Jahng, 2009: Neuroprotective role of erythropoietin by antiapoptosis in the retina. *J Neurosci Res*, **87**, 2365-2374.
- Cielo, C. and C. L. Marcus, 2014: Central Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med. Clin*, **9**, 105-118.
- Cilley, R. E., A. M. Scharenberg, P. F. Bongiorno, K. E. Guire and R. H. Bartlett, 1991: Low oxygen delivery produced by anemia, hypoxia, and low cardiac output. *J Surg Res*, **51**, 425-433.
- Cinti, S., R. C. Frederich, M. C. Zingaretti, R. De Matteis, J. S. Flier and B. B. Lowell, 1997: Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology*, **138**, 797-804.
- Cioffi, J. A., J. Van Blerkom, M. Antczak, A. Shafer, S. Wittmer and H. R. Snodgrass, 1997: The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod*, **3**, 467-472.
- Ciriello, J. and J. M. Moreau, 2013: Systemic administration of leptin potentiates the response of neurons in the nucleus of the solitary tract to chemoreceptor activation in the rat. *Neuroscience*, **229**, 88-99.
- Claps, A. and F. Torrealba, 1988: The carotid body connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Res*, **455**, 123-133.
- Coates, E. L., A. Li and E. E. Nattie, 1993: Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **75**, 5-14.
- COHEN, M. I., 1979: Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev*, **59**, 1105-1173.
- Cohen, R. A., M. E. Miller, J. F. Garcia, G. Moccia and E. P. Cronkite, 1981: Regulatory mechanism of erythropoietin production: effects of hypoxemia and hypercarbia. *Exp Hematol*, **9**, 513-521.
- Cohen, S. L., J. L. Halaas, J. M. Friedman, B. T. Chait, L. Bennett, D. Chang, R. Hecht and F. Collins, 1996: Human leptin characterization. *Nature*, **382**, 589.
- Coleman, D. L., 1973: Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, **9**, 294-298.
- Comenencia-Ortiz, E., S. J. Moss and P. A. Davies, 2014: Phosphorylation of GABAA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions. *Psychopharmacology (Berl)*, **231**, 3453-3465.
- Compagnone, N. A. and S. H. Mellon, 2000: Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*, **21**, 1-56.
- Conneely, O. M., B. L. Maxwell, D. O. Toft, W. T. Schrader and B. W. O'Malley, 1987: The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res Commun*, **149**, 493-501.
- Connelly, C. A., E. G. Dobbins and J. L. Feldman, 1992: Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res*, **590**, 337-340.
- Connelly, C. A., H. H. Ellenberger and J. L. Feldman, 1989: Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci. Lett*, **105**, 34-40.
- Connolly, C. N. and K. A. Wafford, 2004: The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans*, **32**, 529-534.
- Connolly, C. N., J. R. Woollorton, T. G. Smart and S. J. Moss, 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, S. C., N. L. Nichols, N. A. Ritucci, J. B. Dean and R. W. Putnam, 2009: Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarius (NTS) of neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol*, **166**, 4-12.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer and et al., 1996: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, **334**, 292-295.

- Constantinescu, S. N., L. J. Huang, H. Nam and H. F. Lodish, 2001: The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol Cell*, **7**, 377-385.
- Conti, F., A. Minelli, S. DeBiasi and M. Melone, 1997: Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol*, **14**, 1-18.
- Corpechot, C., P. Robel, M. Axelson, J. Sjoval and E. E. Baulieu, 1981: Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **78**, 4704-4707.
- Corpechot, C., M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjoval, R. Vihko, E. E. Baulieu and P. Robel, 1983: Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res*, **270**, 119-125.
- Cottrell, G. A., J. J. Lambert and J. A. Peters, 1987: Modulation of GABAA receptor activity by alphaxalone. *Br. J. Pharmacol*, **90**, 491-500.
- Couce, M. E., B. Burguera, J. E. Parisi, M. D. Jensen and R. V. Lloyd, 1997: Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology*, **66**, 145-150.
- Couce, M. E., D. Green, A. Brunetto, C. Achim, R. V. Lloyd and B. Burguera, 2001: Limited brain access for leptin in obesity. *Pituitary*, **4**, 101-110.
- Couturier, C. and R. Jockers, 2003: Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol Chem*, **278**, 26604-26611.
- Cowen, D. S., 2007: Serotonin and neuronal growth factors - a convergence of signaling pathways. *J Neurochem*, **101**, 1161-1171.
- Cui, N., X. Zhang, J. S. Tadevall, L. Yu, H. Gai, J. Petit, R. T. Pamulapati, X. Jin and C. Jiang, 2011: Involvement of TRP channels in the CO(2) chemosensitivity of locus coeruleus neurons. *J Neurophysiol*, **105**, 2791-2801.
- Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant, 2001: NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol*, **11**, 327-335.
- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz, 2004: Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, **2004**, re16.
- Cumin, F., H. P. Baum and N. Levens, 1997: Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol*, **155**, 577-585.
- D'Andrea, A. D., H. F. Lodish and G. G. Wong, 1989: Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*, **57**, 277-285.
- D'Andrea, A. D. and L. I. Zon, 1990: Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest*, **86**, 681-687.
- da Silva, G. S., H. Giusti, M. Benedetti, M. B. Dias, L. H. Gargaglioni, L. G. Branco and M. L. Glass, 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, S. B., S. R. de, V and M. B. de Sousa, 2006: Changes in peak expiratory flow and respiratory strength during the menstrual cycle. *Respir. Physiol Neurobiol*, **150**, 211-219.
- Dahan, A., D. Nieuwenhuijs and L. Teppema, 2007: Plasticity of central chemoreceptors: effect of bilateral carotid body resection on central CO2 sensitivity. *PLoS Med*, **4**, e239.
- Dahlstrom, A. and K. Fuxe, 1964: Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398-399.
- Dale, E. A., I. Satriotomo and G. S. Mitchell, 2012: Cervical spinal erythropoietin induces phrenic motor facilitation via extracellular signal-regulated protein kinase and Akt signaling. *J Neurosci*, **32**, 5973-5983.
- Dame, C., H. Fahnenstich, P. Freitag, D. Hofmann, T. Abdul-Nour, P. Bartmann and J. Fandrey, 1998: Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood*, **92**, 3218-3225.
- Dame, C., S. E. Juul and R. D. Christensen, 2001: The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*, **79**, 228-235.
- Danneman, P. J. and T. D. Mandrell, 1997: Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab. Anim Sci*, **47**, 386-395.

- Darnall, R. A., R. W. Schneider, C. M. Tobia and K. G. Commons, 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.
- Dauger, S., A. Pattyn, F. Lofaso, C. Gaultier, C. Goridis, J. Gallego and J. F. Brunet, 2003: Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways. *Development*, **130**, 6635-6642.
- Davies, P. A., M. C. Hanna, T. G. Hales and E. F. Kirkness, 1997: Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature*, **385**, 820-823.
- Davies, R. O. and M. W. Edwards, Jr., 1973: Distribution of carotid body chemoreceptor afferents in the medulla of the cat. *Brain Res*, **64**, 451-454.
- Dawid-Milner, M. S., J. P. Lara, M. P. Lopez de Miguel, M. V. Lopez-Gonzalez, K. M. Spyer and S. Gonzalez-Baron, 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., K. C. Bicego, O. W. de Castro, G. S. da Silva, N. Garcia-Cairasco and L. H. Gargaglioni, 2010: Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol*, **172**, 24-31.
- de Carvalho, D., L. G. Patrone, C. L. Taxini, V. Biancardi, M. C. Vicente and L. H. Gargaglioni, 2014: Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO₂ drive to breathe. *Front Physiol*, **5**, 288.
- de Carvalho, D., L. G. A. Patrone, D. A. Marques, M. C. Vicente, R. E. Szawka, J. A. Anselmo-Franci, K. C. Bicego and L. H. Gargaglioni, 2017: Participation of locus coeruleus in breathing control in female rats. *Respir Physiol Neurobiol*, **245**, 29-36.
- Dean, J. B., E. A. Kinkade and R. W. Putnam, 2001: Cell-cell coupling in CO₂/H(+)-excited neurons in brainstem slices. *Respir Physiol*, **129**, 83-100.
- Debeljak, N., P. Solar and A. J. Sytkowski, 2014: Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Front Immunol*, **5**, 563.
- Debru, A., 1996: *Le corps respirant. La pensée physiologique chez Galien.*
- Debru, A., 2000: Les conceptions de la respiration dans l'Antiquité. *Médecine/sciences*, **16**, 247-247.
- Deck, C. A., J. L. Honeycutt, E. Cheung, H. M. Reynolds and R. J. Borski, 2017: Assessing the Functional Role of Leptin in Energy Homeostasis and the Stress Response in Vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **8**, 63.
- Deem, S., R. G. Hedges, S. McKinney, N. L. Polissar, M. K. Alberts and E. R. Swenson, 1999: Mechanisms of improvement in pulmonary gas exchange during isovolemic hemodilution. *J Appl Physiol (1985)*, **87**, 132-141.
- Dejours, P., 1962: Chemoreflexes in breathing. *Physiol Rev*, **42**, 335-358.
- Del Negro, C. A., G. D. Funk and J. L. Feldman, 2018: Breathing matters. *Nat Rev Neurosci*, **19**, 351-367.
- Del Negro, C. A. and J. A. Hayes, 2008: A 'group pacemaker' mechanism for respiratory rhythm generation. *J Physiol*, **586**, 2245-2246.
- Del Negro, C. A., J. A. Hayes, R. W. Pace, B. R. Brush, R. Teruyama and J. L. Feldman, 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, C. A., N. Koshiya, R. J. Butera, Jr. and J. C. Smith, 2002: Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *J Neurophysiol*, **88**, 2242-2250.
- Del Negro, C. A., C. Morgado-Valle, J. A. Hayes, D. D. Mackay, R. W. Pace, E. A. Crowder and J. L. Feldman, 2005: Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J. Neurosci*, **25**, 446-453.
- Della Ragione, F., V. Cucciolla, A. Borriello, A. Oliva and S. Perrotta, 2007: Erythropoietin receptors on cancer cells: a still open question. *J Clin Oncol*, **25**, 1812-1813; author reply 1815.
- DeManno, D. A. and F. W. Goetz, 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, J. A., E. B. Olson and J. B. Skatrud, 1986: Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. *Handbook of physiology - The respiratory system II*.
- Depping, R., K. Kawakami, H. Ocker, J. M. Wagner, M. Heringlake, A. Noetzold, H. H. Sievers and K. F. Wagner, 2005: Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **130**, 877-878.
- Depuy, S. D., R. Kanbar, M. B. Coates, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet, 2011: Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J. Neurosci*, **31**, 1981-1990.
- Derenne, J. P., J. Couture, S. Iscoe, A. Whitelaw and J. Milic-Emili, 1976: Occlusion pressures in men rebreathing CO₂ under methoxyflurane anesthesia. *J Appl Physiol*, **40**, 805-814.
- Deutch, A. Y., J. Holliday, R. H. Roth, L. L. Chun and E. Hawrot, 1987: Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8697-8701.
- Devaskar, S. U., C. Ollesch, R. A. Rajakumar and P. A. Rajakumar, 1997: Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 44-47.
- Devos, R., Y. Guisez, J. Van der Heyden, D. W. White, M. Kalai, M. Fountoulakis and G. Plaetinck, 1997: Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem*, **272**, 18304-18310.
- Devos, R., J. G. Richards, L. A. Campfield, L. A. Tartaglia, Y. Guisez, J. van der Heyden, J. Tavernier, G. Plaetinck and P. Burn, 1996: OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5668-5673.
- Dey, N., B. W. Howell, P. K. De and D. L. Durden, 2005: CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Exp Cell Res*, **307**, 1-14.
- Di Zanni, E., T. Bachetti, S. Parodi, P. Bocca, I. Prigione, S. Di Lascio, D. Fornasari, R. Ravazzolo and I. Ceccherini, 2012: In vitro drug treatments reduce the deleterious effects of aggregates containing polyAla expanded PHOX2B proteins. *Neurobiol Dis*, **45**, 508-518.
- Dias, M. B., T. B. Nucci, L. O. Margatho, J. Antunes-Rodrigues, L. H. Gargaglioni and L. G. Branco, 2007: Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. *J Appl Physiol (1985)*, **103**, 1780-1788.
- Dick, T. E., M. C. Bellingham and D. W. Richter, 1994: Pontine respiratory neurons in anesthetized cats. *Brain Res*, **636**, 259-269.
- Dietrich, M. O., C. Spuch, D. Antequera, I. Rodal, J. G. de Yebenes, J. A. Molina, F. Bermejo and E. Carro, 2008: Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging*, **29**, 902-912.
- Digicaylioglu, M., S. Bichet, H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, C. Bauer and M. Gassmann, 1995: Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3717-3720.
- Digicaylioglu, M. and S. A. Lipton, 2001: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, **412**, 641-647.
- Dillon, G. H. and T. G. Waldrop, 1993: Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Exp. Brain Res.*, **96**, 260-272.
- Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis, 1999: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev*, **51**, 7-61.
- Dobbins, E. G. and J. L. Feldman, 1994: Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J. Comp Neurol*, **347**, 64-86.
- Donato, J., Jr., R. M. Cravo, R. Frazao, L. Gautron, M. M. Scott, J. Lachey, I. A. Castro, L. O. Margatho, S. Lee, C. Lee, J. A. Richardson, J. Friedman, S. Chua, Jr., R. Coppari, J. M. Zigman, J. K. Elmquist and C. F. Elias, 2011: Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest*, **121**, 355-368.
- Douglas, N. J., D. P. White, J. V. Weil, C. K. Pickett and C. W. Zwillich, 1982: Hypercapnic ventilatory response in sleeping adults. *Am Rev Respir Dis*, **126**, 758-762.
- Dragunow, M., R. W. Currie, R. L. Faull, H. A. Robertson and K. Jansen, 1989: Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci Biobehav. Rev*, **13**, 301-313.

- Dragunow, M. and R. Faull, 1989: The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing 3. *J Neurosci.Methods*, **29**, 261-265.
- Drorbaugh, J. E. and W. O. Fenn, 1955: A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, **16**, 81-87.
- Dubois, A. B., S. Y. Botelho, G. N. Bedell, R. Marshall and J. H. Comroe, Jr., 1956a: A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume: a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. *J Clin Invest*, **35**, 322-326.
- Dubois, A. B., S. Y. Botelho and J. H. Comroe, Jr., 1956b: A new method for measuring airway resistance in man using a body plethysmograph: values in normal subjects and in patients with respiratory disease. *J Clin Invest*, **35**, 327-335.
- Dubreuil, V., N. Ramanantsoa, D. Trochet, V. Vaubourg, J. Amiel, J. Gallego, J. F. Brunet and C. Goridis, 2008: A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **105**, 1067-1072.
- Dubreuil, V., M. Thoby-Brisson, M. Rallu, K. Persson, A. Pattyn, C. Birchmeier, J. F. Brunet, G. Fortin and C. Goridis, 2009: Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. *J Neurosci.*, **29**, 14836-14846.
- Duffin, J., 2004: Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp. Physiol*, **89**, 517-529.
- Duffin, J., R. M. Mohan, P. Vasiliou, R. Stephenson and S. Mahamed, 2000: A model of the chemoreflex control of breathing in humans: model parameters measurement. *Respir Physiol*, **120**, 13-26.
- Dumais, K. M. and A. H. Veenema, 2016: Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front Neuroendocrinol*, **40**, 1-23.
- Eckardt, K. U., A. Kurtz and C. Bauer, 1990: Triggering of erythropoietin production by hypoxia is inhibited by respiratory and metabolic acidosis. *Am J Physiol*, **258**, R678-683.
- Edwards, D. P., A. M. DeMarzo, S. A. Onate, C. A. Beck, P. A. Estes and S. K. Nordeen, 1991: Mechanisms controlling steroid receptor binding to specific DNA sequences. *Steroids*, **56**, 271-278.
- El-Kordi, A., K. Radyushkin and H. Ehrenreich, 2009: Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice. *BMC Biol*, **7**, 37.
- El Hasnaoui-Saadani, R., A. Pichon, D. Marchant, P. Olivier, T. Launay, P. Quidu, M. Beaudry, A. Duvallet, J. P. Richalet and F. Favret, 2009: Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R801-811.
- Elam, M., T. Yao, P. Thoren and T. H. Svensson, 1981: Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res*, **222**, 373-381.
- Elbers, J. M., H. Asscheman, J. C. Seidell, M. Frolich, A. E. Meinders and L. J. Gooren, 1997: Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 3267-3270.
- Elias, C. F., J. F. Kelly, C. E. Lee, R. S. Ahima, D. J. Drucker, C. B. Saper and J. K. Elmquist, 2000: Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*, **423**, 261-281.
- Ellenberger, H. H. and J. L. Feldman, 1990: Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res*, **513**, 35-42.
- Ellenberger, H. H., J. L. Feldman and H. G. Goshgarian, 1990a: Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections. *J. Comp Neurol*, **302**, 707-714.
- Ellenberger, H. H., J. L. Feldman and W. Z. Zhan, 1990b: Subnuclear organization of the lateral tegmental field of the rat. II: Catecholamine neurons and ventral respiratory group. *J. Comp Neurol*, **294**, 212-222.
- Elmquist, J. K., R. S. Ahima, E. Maratos-Flier, J. S. Flier and C. B. Saper, 1997: Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, **138**, 839-842.
- Elmquist, J. K., C. Bjorbaek, R. S. Ahima, J. S. Flier and C. B. Saper, 1998: Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, **395**, 535-547.
- Elmquist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper, 1999: From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, **22**, 221-232.

- Emirgil, C. and B. J. Sobol, 1973: The effects of weight reduction on pulmonary function and the sensitivity of the respiratory center in obesity. *Am. Rev. Respir. Dis*, **108**, 831-842.
- England, S. J. and L. E. Farhi, 1976: Fluctuations in alveolar CO₂ and in base excess during the menstrual cycle. *Respir. Physiol*, **26**, 157-161.
- Enhoring, G., S. S. van, C. Lundgren and I. Vargas, 1998: Whole-body plethysmography, does it measure tidal volume of small animals? *Can. J. Physiol Pharmacol*, **76**, 945-951.
- Erickson, J. T. and D. E. Millhorn, 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, J. T. and D. E. Millhorn, 1994: Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J. Comp Neurol*, **348**, 161-182.
- Erlander, M. G., N. J. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel and A. J. Tobin, 1991: Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, **7**, 91-100.
- Erlichman, J. S., A. C. Boyer, P. Reagan, R. W. Putnam, N. A. Ritucci and J. C. Leiter, 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.
- Erlichman, J. S., A. Hewitt, T. L. Damon, M. Hart, J. Kurasz, A. Li and J. C. Leiter, 2008: Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. *J Neurosci*, **28**, 4888-4896.
- Erlichman, J. S., J. C. Leiter and A. V. Gourine, 2010: ATP, glia and central respiratory control. *Respir. Physiol Neurobiol.*, **173**, 305-311.
- Errchidi, S., G. Hilaire and R. Monteau, 1990: Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study. *J. Physiol*, **429**, 497-510.
- Errchidi, S., R. Monteau and G. Hilaire, 1991: Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. *J. Physiol*, **443**, 477-498.
- Eugenin, J., C. Larrain and P. Zapata, 1990: Functional recovery of the ventilatory chemoreflexes after partial chronic denervation of the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, **523**, 263-272.
- Eugenin Leon, J., M. J. Olivares and S. Beltran-Castillo, 2016: Role of Astrocytes in Central Respiratory Chemoreception. *Adv Exp Med Biol*, **949**, 109-145.
- Ezure, K., 1990: Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog. Neurobiol.*, **35**, 429-450.
- Ezure, K., I. Tanaka and Y. Saito, 2003: Activity of brainstem respiratory neurones just before the expiration-inspiration transition in the rat. *J Physiol*, **547**, 629-640.
- Falkenstein, E., C. Meyer, C. Eisen, P. C. Scriba and M. Wehling, 1996: Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res Commun*, **229**, 86-89.
- Fandrey, J. and H. F. Bunn, 1993: In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, **81**, 617-623.
- Fang, W., G. Gao, H. Zhao, Y. Xia, X. Guo, N. Li, Y. Li, Y. Yang, L. Chen, Q. Wang and L. Li, 2015: Role of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axon degeneration of dopaminergic neurons resulting from MPP⁺ toxicity. *Brain Res*, **1602**, 9-19.
- Fantuzzi, G. and R. Faggioni, 2000: Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, **68**, 437-446.
- Farmer, C. J., T. R. Isakson, D. J. Coy and K. J. Renner, 1996: 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*, **711**, 84-92.
- Farrant, M. and Z. Nusser, 2005: Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci*, **6**, 215-229.
- Faure, C., F. Viarme, G. Cargill, J. Navarro, C. Gaultier and H. Trang, 2002: Abnormal esophageal motility in children with congenital central hypoventilation syndrome. *Gastroenterology*, **122**, 1258-1263.

- Fay, R. A. and R. Norgren, 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.
- Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell and J. M. Friedman, 1997: Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7001-7005.
- Feldman, J. L., 1986: Neurophysiology of breathing in mammals. In: F. E. Bloom (ed.), *Handbook of physiology; section I: The nervous system. Volume IV: Intrinsic regulatory systems of the brain*. Am. Physiol. Soc., Washington, DC.
- Feldman, J. L. and C. A. Del Negro, 2006: Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci*, **7**, 232-242.
- Feldman, J. L., C. A. Del Negro and P. A. Gray, 2013: Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu. Rev. Physiol*, **75**, 423-452.
- Feldman, J. L., G. S. Mitchell and E. E. Nattie, 2003: Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu. Rev. Neurosci*, **26**, 239-266.
- Feldman, J. L. and J. C. Smith, 1989: Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **563**, 114-130.
- Fenik, V. B., I. Rukhadze and L. Kubin, 2008: Inhibition of pontine noradrenergic A7 cells reduces hypoglossal nerve activity in rats. *Neuroscience*, **157**, 473-482.
- Ferrer, M. and A. Torres, 2015: Noninvasive ventilation for acute respiratory failure. *Curr Opin Crit Care*, **21**, 1-6.
- Ferro, F. E., Jr., S. L. Kozak, M. E. Hoatlin and D. Kabat, 1993: Cell surface site for mitogenic interaction of erythropoietin receptors with the membrane glycoprotein encoded by Friend erythroleukemia virus. *J Biol Chem*, **268**, 5741-5747.
- Fiamma, M. N., E. T. O'Connor, A. Roy, I. Zuna and R. J. Wilson, 2013: The essential role of peripheral respiratory chemoreceptor inputs in maintaining breathing revealed when CO₂ stimulation of central chemoreceptors is diminished. *J Physiol*, **591**, 1507-1521.
- Fields, R. D., F. Eshete, B. Stevens and K. Itoh, 1997: Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in ca²⁺, cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*, **17**, 7252-7266.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton, 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, J. J. and H. C. Kinney, 1992: Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol.Exp.Neurol.*, **51**, 394-403.
- Filosa, J. A., J. B. Dean and R. W. Putnam, 2002: Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol*, **541**, 493-509.
- Filosa, J. A. and R. W. Putnam, 2003: Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C145-155.
- Fink, B. R., R. Katz, H. Reinhold and A. Schoolman, 1962: Suprapontine mechanisms in regulation of respiration. *AJP - Legacy*, **202**, 217-220.
- Finley, J. C. and D. M. Katz, 1992: The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res*, **572**, 108-116.
- Fitzgerald, M. P. and J. S. Haldane, 1905: The normal alveolar carbonic acid pressure in man. *J. Physiol*, **32**, 486-494.
- Fitzgerald, R. S. and G. A. Deghani, 1982: Neural responses of the cat carotid and aortic bodies to hypercapnia and hypoxia. *J. Appl. Physiol Respir. Environ. Exerc. Physiol*, **52**, 596-601.
- Flora, A., H. Lucchetti, R. Benfante, C. Goriadis, F. Clementi and D. Fornasari, 2001: Sp proteins and Phox2b regulate the expression of the human Phox2a gene. *J Neurosci*, **21**, 7037-7045.
- Florent, V., M. Baroncini and V. Prevot, 2017: Tanycytes gate blood-borne metabolic signal access to the brain. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **52**, 26-32.

- Flourens, P., 1842: *Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés*. Paris.
- Flourens, P., 1851: Note sur le point vital de la moelle allongée.
- Fong, T. M., R. R. Huang, M. R. Tota, C. Mao, T. Smith, J. Varnerin, V. V. Karpitskiy, J. E. Krause and L. H. Van der Ploeg, 1998: Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol*, **53**, 234-240.
- Forster, H. V. and C. A. Smith, 2010: Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂/H⁺. *J Appl Physiol (1985)*, **108**, 989-994.
- Fortin, G., E. D. del Toro, V. Abadie, L. Guimaraes, A. S. Foutz, M. avit-Saubie, F. Rouyer and J. Champagnat, 2000: Genetic and developmental models for the neural control of breathing in vertebrates. *Respir.Physiol*, **122**, 247-257.
- Fortin, G., S. Jungbluth, A. Lumsden and J. Champagnat, 1999: Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat Neurosci*, **2**, 873-877.
- Fortuna, M. G., R. L. Stornetta, G. H. West and P. G. Guyenet, 2009: Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. *J Physiol*, **587**, 5121-5138.
- Fournier, S., M. Allard, S. Roussin and R. Kinkead, 2007: Developmental changes in central O₂ chemoreflex in *Rana catesbeiana*: the role of noradrenergic modulation. *J Exp Biol*, **210**, 3015-3026.
- Fournier, S. and R. Kinkead, 2008: Role of pontine neurons in central O₂ chemoreflex during development in bullfrogs (*Lithobates catesbeiana*). *Neuroscience*, **155**, 983-996.
- Frantz, I. D., 3rd, S. M. Adler, B. T. Thach and H. W. Taeusch, Jr., 1976: Maturation effects on respiratory responses to carbon dioxide in premature infants. *J Appl Physiol*, **41**, 41-45.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas, 1998: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**, 763-770.
- Fritschy, J. M. and H. Mohler, 1995: GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, **359**, 154-194.
- Frolund, B., B. Ebert, U. Kristiansen, T. Liljefors and P. Krosggaard-Larsen, 2002: GABA(A) receptor ligands and their therapeutic potentials. *Curr. Top. Med. Chem*, **2**, 817-832.
- Fukuda, Y. and Y. Honda, 1975: pH-sensitive cells at ventro-lateral surface of rat medulla oblongata. *Nature*, **256**, 317-318.
- Funahashi, H., T. Yada, S. Muroya, M. Takigawa, T. Ryushi, S. Horie, Y. Nakai and S. Shioda, 1999: The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, **264**, 117-120.
- Funahashi, H., T. Yada, R. Suzuki and S. Shioda, 2003: Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol*, **224**, 1-27.
- Funk, G. D., S. M. Johnson, J. C. Smith, X. W. Dong, J. Lai and J. L. Feldman, 1997: Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. *J Neurophysiol*, **78**, 1414-1420.
- Furlani, D., C. Klopsch, R. Gabel, M. Ugurlucan, E. Pittermann, D. Klee, K. Wagner, W. Li, W. Wang, L. L. Ong, H. Nizze, U. Titze, K. Lutzow, A. Lendlein, G. Steinhoff and N. Ma, 2008: Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test. *Transplant Proc*, **40**, 962-966.
- Furuta, M., A. Fukushima, S. Chiba, A. Sano, T. Akema, F. Kimura and T. Funabashi, 2010: Progesterone receptor immunoreactivity in the brains of ovariectomized aged rats. *Neuroreport*, **21**, 777-781.
- Gainsford, T. and W. S. Alexander, 1999: A role for leptin in hemopoieses? *Mol Biotechnol*, **11**, 149-158.
- Galante, R. J., L. Kubin, A. P. Fishman and A. I. Pack, 1996: Role of chloride-mediated inhibition in respiratory rhythmogenesis in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. *J Physiol*, **492 (Pt 2)**, 545-558.
- Ganapathy, M. E., P. D. Prasad, W. Huang, P. Seth, F. H. Leibach and V. Ganapathy, 1999: Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 251-260.
- Gang, S., A. Mizuguchi and M. Aoki, 1991: Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. *Respir.Physiol*, **85**, 329-339.
- Gao, Y., M. H. Tschop and S. Luquet, 2014: Hypothalamic tanycytes: gatekeepers to metabolic control. *Cell Metab*, **19**, 173-175.

- Garcia-Caceres, C., E. Fuente-Martin, E. Burgos-Ramos, M. Granado, L. M. Frago, V. Barrios, T. Horvath, J. Argente and J. A. Chowen, 2011: Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology*, **152**, 1809-1818.
- Garcia-Ramirez, M., C. Hernandez and R. Simo, 2008: Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, **31**, 1189-1194.
- Gargaglioni, L. H., K. C. Bicegoa and L. G. Branco, 2008: Brain monoaminergic neurons and ventilatory control in vertebrates. *Respir. Physiol Neurobiol*, **164**, 112-122.
- Gargaglioni, L. H., L. K. Hartzler and R. W. Putnam, 2010: The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol*, **173**, 264-273.
- Gassmann, M., K. Heinicke, J. Soliz and O. O. Ogunshola, 2003: Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol*, **543**, 323-330.
- Gassmann, M., M. Tissot van Patot and J. Soliz, 2009: The neuronal control of hypoxic ventilation: erythropoietin and sexual dimorphism. *Ann N Y Acad Sci*, **1177**, 151-161.
- Gaultier, C., B. Matrot and J. Gallego, 2006: Transgenic models to study disorders of respiratory control in newborn mice. *ILAR J*, **47**, 15-21.
- Gautron, L. and J. K. Elmquist, 2011: Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*, **121**, 2087-2093.
- Gay, R., 2005: Réanimation et ventilation artificielle. Survol historique jusqu'en 1950. *Cahiers d'anesthésiologie*, **53**, 231-248.
- Gaytan, S. P. and R. Pasaro, 1998: Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res.Bull.*, **47**, 625-642.
- Ge, H., L. Huang, T. Pourbahrami and C. Li, 2002: Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **277**, 45898-45903.
- Geffroy, S., P. De Vos, B. Staels, B. Duban, J. Auwerx and B. de Martinville, 1995: Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **28**, 603-604.
- Gesell, R., J. Bricker and C. Magee, 1936: Structural and functional organization of the central mechanism controlling breathing. *AJP - Legacy*, **117**, 423-452.
- Gesell, R., C. S. Magee and J. W. Bricker, 1940: Activity patterns of the respiratory neurons and muscles. *AJP - Legacy*, **128**, 615-628.
- Gestreau, C., M. Dutschmann, S. Obled and A. L. Bianchi, 2005: Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. *Respir Physiol Neurobiol*, **147**, 159-176.
- Gestreau, C., D. Heitzmann, J. Thomas, V. Dubreuil, S. Bandulik, M. Reichold, S. Bendahhou, P. Pierson, C. Sterner, J. Peyronnet-Roux, C. Benfriha, I. Tegtmeier, H. Ehnes, M. Georgieff, F. Lesage, J. F. Brunet, C. Goridis, R. Warth and J. Barhanin, 2010: Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **107**, 2325-2330.
- Gestreau, C., S. Milano, A. L. Bianchi and L. Grelot, 1996: Activity of dorsal respiratory group inspiratory neurons during laryngeal-induced fictive coughing and swallowing in decerebrate cats. *Exp.Brain Res.*, **108**, 247-256.
- Ghilardi, N. and R. C. Skoda, 1997: The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*, **11**, 393-399.
- Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda, 1996: Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6231-6235.
- Giatti, S., M. Boraso, R. C. Melcangi and B. Viviani, 2012: Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *J Mol Endocrinol*, **49**, R125-134.
- Gilbert, R., J. H. Sipple and J. H. Auchincloss, Jr., 1961: Respiratory control and work of breathing in obese subjects. *J Appl Physiol*, **16**, 21-26.
- Gilman, M. Z., R. N. Wilson and R. A. Weinberg, 1986: Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression. *Mol Cell Biol*, **6**, 4305-4316.

- Glasow, A., W. Kiess, U. Anderegg, A. Berthold, A. Bottner and J. Kratzsch, 2001: Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 4472-4479.
- Gluckman, P. D. and B. M. Johnston, 1987: Lesions in the upper lateral pons abolish the hypoxic depression of breathing in unanaesthetized fetal lambs in utero. *J Physiol*, **382**, 373-383.
- Gonzalez, C., L. Almaraz, A. Obeso and R. Rigual, 1994: Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*, **74**, 829-898.
- Gonzalez, C., A. Rocher and P. Zapata, 2003: [Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body]. *Rev Neurol*, **36**, 239-254.
- Goodland, R. L. and W. T. Pommerenke, 1952: Cyclic fluctuations of the alveolar carbon dioxide tension during the normal menstrual cycle. *Fertil. Steril*, **3**, 394-401.
- Goodman, T. and M. K. Hajihosseini, 2015: Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front Neurosci*, **9**, 387.
- Gourine, A. V., 2005: On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol*, **568**, 715-724.
- Gourine, A. V. and G. D. Funk, 2017: On the existence of a central respiratory oxygen sensor. *J Appl Physiol* (1985), **123**, 1344-1349.
- Gourine, A. V., V. Kasymov, N. Marina, F. Tang, M. F. Figueiredo, S. Lane, A. G. Teschemacher, K. M. Spyer, K. Deisseroth and S. Kasparov, 2010: Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, **329**, 571-575.
- Gourine, A. V., E. Llaudet, N. Dale and K. M. Spyer, 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. *Pediatr. Pulmonol*, **26**, 273-282.
- Gozal, D. and C. Gaultier, 2001: Evolving concepts of the maturation of central pathways underlying the hypoxic ventilatory response. *Am.J Respir.Crit Care Med.*, **164**, 325-329.
- Graham, J. D. and C. L. Clarke, 1997: Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, **18**, 502-519.
- Grandi, G., A. Cagnacci and A. Volpe, 2014: Pharmacokinetic evaluation of desogestrel as a female contraceptive. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol*, **10**, 1-10.
- Gray, P. A., W. A. Janczewski, N. Mellen, D. R. McCrimmon and J. L. Feldman, 2001: Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat. Neurosci*, **4**, 927-930.
- Gray, P. A., J. C. Rekling, C. M. Bocchiaro and J. L. Feldman, 1999: Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science*, **286**, 1566-1568.
- Grazzini, E., G. Guillon, B. Mouillac and H. H. Zingg, 1998: Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, **392**, 509-512.
- Green, E. D., M. Maffei, V. V. Braden, R. Proenca, U. DeSilva, Y. Zhang, S. C. Chua, Jr., R. L. Leibel, J. Weissenbach and J. M. Friedman, 1995: The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res*, **5**, 5-12.
- Greenberg, M. E., Z. Siegfried and E. B. Ziff, 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.
- Greer, J. J., J. C. Smith and J. L. Feldman, 1991: Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol*, **437**, 727-749.
- Grelot, L., J. C. Barillot and A. L. Bianchi, 1989: Pharyngeal motoneurons: respiratory-related activity and responses to laryngeal afferents in the decerebrate cat. *Exp. Brain Res*, **78**, 336-344.
- Grelot, L., A. L. Bianchi, S. Iscoe and J. E. Remmers, 1988: Expiratory neurones of the rostral medulla: anatomical and functional correlates. *Neurosci.Lett.*, **89**, 140-145.
- Griffith, F. R., G. W. Pucker, K. A. Brownell, J. D. Klein and M. E. Carmen, 1929: Studies in human physiology, alveolar air and blood gas capacity. *Am. J. Physiol*, **89**, 449-470.

- Griffiths, J. and T. Lovick, 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.
- Grill, H. J. and M. R. Hayes, 2009: The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes (Lond)*, **33 Suppl 1**, S11-15.
- Grill, H. J., M. W. Schwartz, J. M. Kaplan, J. S. Foxhall, J. Breininger and D. G. Baskin, 2002: Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology*, **143**, 239-246.
- Grinevich, V., H. S. Knobloch-Bollmann, M. Eliava, M. Busnelli and B. Chini, 2016: Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. *Biol Psychiatry*, **79**, 155-164.
- Groeben, H., S. Meier, R. H. Brown, C. P. O'Donnell, W. Mitzner and C. G. Tankersley, 2004: The effect of leptin on the ventilatory response to hyperoxia. *Exp Lung Res*, **30**, 559-570.
- Gronli, J. O., B. A. Santucci, S. E. Leurgans, E. M. Berry-Kravis and D. E. Weese-Mayer, 2008: Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B genotype determines risk for sudden death. *Pediatr. Pulmonol*, **43**, 77-86.
- Guenet, J. L., 2005: The mouse genome. *Genome Res*, **15**, 1729-1740.
- Guenoun, R., F. Labombarda, M. C. Gonzalez Deniselle, P. Liere, A. F. De Nicola and M. Schumacher, 2015: Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **146**, 48-61.
- Guenoun, R., D. Meffre, F. Labombarda, S. L. Gonzalez, M. C. Deniselle, D. G. Stein, A. F. De Nicola and M. Schumacher, 2008: The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: expression, cellular localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries. *Brain Res.Rev.*, **57**, 493-505.
- Guerra-Araiza, C., M. A. Cerbon, S. Morimoto and I. Camacho-Arroyo, 2000: Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci*, **66**, 1743-1752.
- Guerra-Araiza, C., A. Reyna-Neyra, A. M. Salazar, M. A. Cerbon, S. Morimoto and I. Camacho-Arroyo, 2001: Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull*, **54**, 13-17.
- Guerrier, C., J. A. Hayes, G. Fortin and D. Holcman, 2015: Robust network oscillations during mammalian respiratory rhythm generation driven by synaptic dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 9728-9733.
- Gulinello, M., Q. H. Gong, X. Li and S. S. Smith, 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. and H. Herbert, 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.
- Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater, 1999: ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci*, **19**, 520-528.
- Guyenet, P. G., 2008: The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO2 homeostasis, and breathing automaticity. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **105**, 404-416.
- Guyenet, P. G., 2014: Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol*, **4**, 1511-1562.
- Guyenet, P. G., S. B. Abbott and R. L. Stornetta, 2013: The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel? *Brain Res*, **1511**, 126-137.
- Guyenet, P. G. and D. A. Bayliss, 2015a: Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. *Neuron*, **87**, 946-961.
- Guyenet, Patrice G. and Douglas A. Bayliss, 2015b: Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. *Neuron*, **87**, 946-961.
- Guyenet, P. G., D. A. Bayliss, R. L. Stornetta, M. G. Fortuna, S. B. Abbott and S. D. Depuy, 2009: Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. *Respir. Physiol Neurobiol*, **168**, 59-68.

- Guyenet, P. G., N. Koshiya, D. Huangfu, A. J. Verberne and T. A. Riley, 1993: Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am. J. Physiol*, **264**, R1035-R1044.
- Guyenet, P. G. and D. K. Mulkey, 2010: Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir. Physiol Neurobiol*, **173**, 244-255.
- Guyenet, P. G., D. K. Mulkey, R. L. Stornetta and D. A. Bayliss, 2005a: Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J. Neurosci*, **25**, 8938-8947.
- Guyenet, P. G., C. P. Sevigny, M. C. Weston and R. L. Stornetta, 2002: Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci*, **22**, 3806-3816.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta, S. B. Abbott, S. D. Depuy, M. G. Fortuna and R. Kanbar, 2010a: Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. *J.Appl.Physiol*, **108**, 995-1002.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta and D. A. Bayliss, 2008: Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J.Physiol*.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta and D. A. Bayliss, 2010b: Central respiratory chemoreception. *J. Comp Neurol*, **518**, 3883-3906.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta, D. A. Bayliss and D. K. Mulkey, 2005b: Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp. Physiol*, **90**, 247-253.
- Hackos, D. H. and J. E. Hanson, 2017: Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. *Neuropharmacology*, **112**, 34-45.
- Haddad, G. G., M. R. Gandhi and R. B. Mellins, 1982: Maturation of ventilatory response to hypoxia in puppies during sleep. *Journal of Applied Physiology*, **52**, 309-314.
- Haddad, G. G., N. M. Mazza, R. Defendini, W. A. Blanc, J. M. Driscoll, M. A. Epstein, R. A. Epstein and R. B. Mellins, 1978: Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. *Medicine (Baltimore)*, **57**, 517-526.
- Haghparsat, A., A. Soltani-Hekmat, A. Khani and A. Komaki, 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.
- Hagström, L., O. Agbulut, R. El-Hasnaoui-Saadani, D. Marchant, F. Favret, J.-P. Richalet, M. Beaudry and T. Launay, 2010: Epo Is Relevant Neither for Microvascular Formation Nor for the New Formation and Maintenance of Mice Skeletal Muscle Fibres in Both Normoxia and Hypoxia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Haji, A., R. Takeda and M. Okazaki, 2000: Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol. Ther*, **86**, 277-304.
- Hakansson, M. L., H. Brown, N. Ghilardi, R. C. Skoda and B. Meister, 1998: Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci*, **18**, 559-572.
- Hakuno, H., Y. Oyamada, M. Murai, Y. Ito and K. Yamaguchi, 2004: Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat. *Respir. Physiol Neurobiol*, **140**, 9-18.
- Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton and J. M. Friedman, 1997: Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8878-8883.
- Han, F., E. Chen, H. Wei, Q. He, D. Ding and K. P. Strohl, 2001: Treatment effects on carbon dioxide retention in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest*, **119**, 1814-1819.
- Hannhart, B., C. K. Pickett and L. G. Moore, 1990: Effects of estrogen and progesterone on carotid body neural output responsiveness to hypoxia. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **68**, 1909-1916.
- Hannhart, B., C. K. Pickett, J. V. Weil and L. G. Moore, 1989: Influence of pregnancy on ventilatory and carotid body neural output responsiveness to hypoxia in cats. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **67**, 797-803.
- Hansel, N. N., L. Gao, N. M. Rafaels, R. A. Mathias, E. R. Neptune, C. Tankersley, A. V. Grant, J. Connett, T. H. Beaty, R. A. Wise and K. C. Barnes, 2009: Leptin receptor polymorphisms and lung function decline in COPD. *Eur Respir J*, **34**, 103-110.

- Harney, S. C., B. G. Frenguelli and J. J. Lambert, 2003: Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology*, **45**, 873-883.
- Harrison, N. L. and M. A. Simmonds, 1984: Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res*, **323**, 287-292.
- Hart, R. A., R. C. Dobos, L. L. Agnew, N. A. Smart and J. R. McFarlane, 2017: Leptin pharmacokinetics in male mice. *Endocr Connect*, **6**, 20-26.
- Hart, R. A., R. C. Dobos, L. L. Agnew, R. L. Tellam and J. R. McFarlane, 2016: Pharmacokinetics of leptin in female mice. *Physiol Res*, **65**, 311-320.
- Hartmann, H., M. H. Jawad, J. Noyes, M. P. Samuels and D. P. Southall, 1994: Negative extrathoracic pressure ventilation in central hypoventilation syndrome. *Arch. Dis. Child*, **70**, 418-423.
- Harvey, J., 2007: Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem*, **100**, 307-313.
- Hasselbach, K. A., 1912: Ein Beitrag zur Respirationphysiologie der Gravidität. *Skand. Arch. Physiol*, **27**, 1-12.
- Hasselbach, K. A. and S. A. Gammeltoft, 1915: Die Neutralitätsregelung des graviden Organismus. *Biochemistry*, **Z68**, 206-264.
- Haxhiu, M. A., F. Tolentino-Silva, G. Pete, P. Kc and S. O. Mack, 2001: Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir. Physiol*, **129**, 191-209.
- Haxhiu, M. A., K. Yung, B. Erokwu and N. S. Cherniack, 1996: CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir. Physiol*, **105**, 35-45.
- Hayward, L. F. and R. B. Felder, 1995: Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat. *AJP - Legacy*, **268**, R707-R714.
- Hayward, L. F., C. L. Swartz and P. W. Davenport, 2003: Respiratory response to activation or disinhibition of the dorsal periaqueductal gray in rats. *J Appl Physiol (1985)*, **94**, 913-922.
- Haywood, C. and M. E. Bloete, 1969: Respiratory responses of healthy young women to carbon dioxide inhalation. *J. Appl. Physiol*, **27**, 32-35.
- Haywood, S. A., S. X. Simonian, E. M. van der Beek, R. J. Bicknell and A. E. Herbison, 1999: Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology*, **140**, 3255-3263.
- Healy, F. and C. L. Marcus, 2011: Congenital central hypoventilation syndrome in children. *Paediatr. Respir. Rev*, **12**, 253-263.
- Hedrick, M. S., 2005: Development of respiratory rhythm generation in ectothermic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol*, **149**, 29-41.
- Heeringa, J., A. Berkenbosch, J. de Goede and C. N. Olievier, 1979: Relative contribution of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂ during hyperoxia. *Respir Physiol*, **37**, 365-379.
- Helena, C., J. A. Gustafsson, K. Korach, D. Pfaff, J. A. Nselmo-Franci and S. Ogawa, 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.
- Herdegen, T., K. Kovary, J. Leah and R. Bravo, 1991: Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J. Comp Neurol*, **313**, 178-191.
- Herdegen, T. and J. D. Leah, 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.
- Herman, J. K., K. D. O'Halloran, G. S. Mitchell and G. E. Bisgard, 1999: Methysergide augments the acute, but not the sustained, hypoxic ventilatory response in goats. *Respir Physiol*, **118**, 25-37.
- Hernandez, C., A. Fonollosa, M. Garcia-Ramirez, M. Higuera, R. Catalan, A. Miralles, J. Garcia-Arumi and R. Simo, 2006: Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care*, **29**, 2028-2033.
- Herrera, D. G. and H. A. Robertson, 1996: Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, **50**, 83-107.
- Hervey, G. R., 1959: The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*, **145**, 336-352.
- Hervey, G. R., 1969: Regulation of energy balance. *Nature*, **222**, 629-631.

- Hilaire, G., R. Monteau and S. Errchidi, 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., R. Monteau, P. Gauthier, P. Rega and D. Morin, 1990: Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: in vivo and in vitro studies. *Neurosci.Lett.*, **111**, 133-138.
- Hilaire, G. and R. Pasaro, 2003: Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci.*, **18**, 23-28.
- Hilaire, G., J. C. Viemari, P. Coulon, M. Simonneau and M. Bevençut, 2004: Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir. Physiol Neurobiol*, **143**, 187-197.
- Hilaire, G., N. Voituron, C. Menuet, R. M. Ichiyama, H. H. Subramanian and M. Dutschmann, 2010: The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir. Physiol Neurobiol*, **174**, 76-88.
- Hileman, S. M., D. D. Pierroz, H. Masuzaki, C. Bjorbaek, K. El-Haschimi, W. A. Banks and J. S. Flier, 2002: Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*, **143**, 775-783.
- Hirata, S., T. Shoda, J. Kato and K. Hoshi, 2002: Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, **83**, 25-30.
- Hirata, S., T. Shoda, J. Kato and K. Hoshi, 2003: Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol. Metab*, **14**, 124-129.
- Hirooka, Y., J. W. Polson, P. D. Potts and R. A. Dampney, 1997: Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience*, **80**, 1209-1224.
- Hirvonen, E., 1996: Progestins. *Maturitas*, **23 Suppl**, S13-18.
- Hodge, C. W., K. K. Mehmert, S. P. Kelley, T. McMahon, A. Haywood, M. F. Olive, D. Wang, A. M. Sanchez-Perez and R. O. Messing, 1999: Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat. Neurosci*, **2**, 997-1002.
- Hodge, C. W., J. Raber, T. McMahon, H. Walter, A. M. Sanchez-Perez, M. F. Olive, K. Mehmert, A. L. Morrow and R. O. Messing, 2002: Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J. Clin. Invest*, **110**, 1003-1010.
- Hodges, M. R. and H. V. Forster, 2012: Respiratory neuroplasticity following carotid body denervation: Central and peripheral adaptations. *Neural Regen Res*, **7**, 1073-1079.
- Hodges, M. R., P. Martino, S. Davis, C. Opansky, L. G. Pan and H. V. Forster, 2004: Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. *J. Appl. Physiol (1985)*, **97**, 2303-2309.
- Hodges, M. R. and G. B. Richerson, 2008: Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir. Physiol Neurobiol*, **164**, 222-232.
- Hodges, M. R. and G. B. Richerson, 2010a: Medullary serotonin neurons and their roles in central respiratory chemoreception. *Respir. Physiol Neurobiol*, **173**, 256-263.
- Hodges, M. R. and G. B. Richerson, 2010b: 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.
- Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn and J. G. Mercer, 1997: Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11073-11078.
- Hoggard, N., L. Hunter, R. G. Lea, P. Trayhurn and J. G. Mercer, 2000: Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr*, **83**, 317-326.
- Holtman, J. R., Jr., L. J. Marion and D. F. Speck, 1990: Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat. *Neuroscience*, **37**, 541-552.
- Hon, W. C., M. I. Wilson, K. Harlos, T. D. Claridge, C. J. Schofield, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. I. Stuart and E. Y. Jones, 2002: Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*, **417**, 975-978.
- Horak, M., K. Vlcek, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr., 2006: Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience*, **137**, 93-102.

- Horak, M., K. Vlcek, M. Petrovic, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr., 2004: Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J. Neurosci*, **24**, 10318-10325.
- Horn, E. M. and T. G. Waldrop, 1994: Modulation of the respiratory responses to hypoxia and hypercapnia by synaptic input onto caudal hypothalamic neurons. *Brain Res*, **664**, 25-33.
- Horn, E. M. and T. G. Waldrop, 1998: Suprapontine control of respiration. *Respir. Physiol*, **114**, 201-211.
- Hornung, J. P., 2003: The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*, **26**, 331-343.
- Hortnagl, H., R. O. Tasan, A. Wieselthaler, E. Kirchmair, W. Sieghart and G. Sperk, 2013: Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience*, **236**, 345-372.
- Hosenpud, J. D., M. V. Hart, M. J. Morton, A. R. Hohimer and J. A. Resko, 1983: Progesterone-induced hyperventilation in the guinea pig. *Respir. Physiol*, **52**, 259-264.
- Hosie, A. M., M. E. Wilkins, H. M. da Silva and T. G. Smart, 2006: Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, **444**, 486-489.
- Hosogai, M., S. Matsuo, T. Sibahara and Y. Kawai, 1998: Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. *Respir Physiol*, **112**, 37-50.
- Hosoi, T., T. Kawagishi, Y. Okuma, J. Tanaka and Y. Nomura, 2002: Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology*, **143**, 3498-3504.
- Hsuchou, H., Y. He, A. J. Kastin, H. Tu, E. N. Markadakis, R. C. Rogers, P. B. Fossier and W. Pan, 2009a: Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, **132**, 889-902.
- Hsuchou, H., W. Pan, M. J. Barnes and A. J. Kastin, 2009b: Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides*, **30**, 2275-2280.
- Huang, L. E., J. Gu, M. Schau and H. F. Bunn, 1998: Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-7992.
- Huard, P., 1979: *L'oeuvre scientifique de Paul Bert*, p. 159-169.
- Huckstepp, R. T., K. P. Cardoza, L. E. Henderson and J. L. Feldman, 2015: Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci*, **35**, 1052-1067.
- Huckstepp, R. T. and N. Dale, 2011: Redefining the components of central CO2 chemosensitivity--towards a better understanding of mechanism. *J Physiol*, **589**, 5561-5579.
- Huckstepp, R. T., L. E. Henderson, K. P. Cardoza and J. L. Feldman, 2016: Interactions between respiratory oscillators in adult rats. *Elife*, **5**.
- Huckstepp, R. T., R. id Bihi, R. Eason, K. M. Spyer, N. Dicke, K. Willecke, N. Marina, A. V. Gourine and N. Dale, 2010: Connexin hemichannel-mediated CO2-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol*, **588**, 3901-3920.
- Huff, R. L., R. Trautman and D. C. Van Dyke, 1950: Nature of exchanges in parabiotic rats. *Am J Physiol*, **161**, 56-74.
- Hughes, P. and M. Dragunow, 1995: Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev*, **47**, 133-178.
- Hummel, K. P., M. M. Dickie and D. L. Coleman, 1966: Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, **153**, 1127-1128.
- 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.
- Hunt, C. E., R. J. Inwood and D. C. Shannon, 1979: Respiratory and nonrespiratory effects of doxapram in congenital central hypoventilation syndrome. *Am Rev Respir Dis*, **119**, 263-269.
- Huxtable, A. G., J. D. Zwicker, B. Y. Poon, S. Pagliardini, S. Q. Vrouwe, J. J. Greer and G. D. Funk, 2009: Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. *J Neurosci*, **29**, 14713-14725.
- Iceman, K. E. and M. B. Harris, 2014: A group of non-serotonergic cells is CO2-stimulated in the medullary raphe. *Neuroscience*, **259**, 203-213.
- Iceman, K. E., G. B. Richerson and M. B. Harris, 2013: Medullary serotonin neurons are CO2 sensitive in situ. *J Neurophysiol*, **110**, 2536-2544.

- Ihle, J. N. and I. M. Kerr, 1995: Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*, **11**, 69-74.
- Ihle, J. N., W. Thierfelder, S. Teglund, D. Stravopodis, D. Wang, J. Feng and E. Parganas, 1998: Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci*, **865**, 1-9.
- Imagawa, K., Y. Numata, G. Katsuura, I. Sakaguchi, A. Morita, S. Kikuoka, Y. Matumoto, T. Tsuji, M. Tamaki, K. Sasakura, H. Teraoka, K. Hosoda, Y. Ogawa and K. Nakao, 1998: Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem*, **273**, 35245-35249.
- Imayama, I. and B. Prasad, 2017: Role of Leptin in Obstructive Sleep Apnea. *Ann Am Thorac Soc*, **14**, 1607-1621.
- Ing, N. H. and M. B. Tornesi, 1997: Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod*, **56**, 1205-1215.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie and G. D. Snell, 1950: Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, **41**, 317-318.
- Intlekofer, K. A. and S. L. Petersen, 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.
- Inyushkin, A. N., E. M. Inyushkina and N. A. Merkulova, 2009: Respiratory responses to microinjections of leptin into the solitary tract nucleus. *Neurosci Behav Physiol*, **39**, 231-240.
- Inyushkina, E. M., N. A. Merkulova and A. N. Inyushkin, 2010: Mechanisms of the respiratory activity of leptin at the level of the solitary tract nucleus. *Neurosci Behav Physiol*, **40**, 707-713.
- Iturriaga, R., E. A. Moya and R. Del Rio, 2015: Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp Physiol*, **100**, 149-155.
- Izumizaki, M., Y. Masaoka and I. Homma, 2011: Coupling of dyspnea perception and tachypneic breathing during hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol*, **179**, 276-286.
- Jacobs, B. L. and E. C. Azmitia, 1992: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, **72**, 165-229.
- Jacobson, L. O., E. Goldwasser, W. Fried and L. Plzak, 1957: Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, **179**, 633-634.
- Jacquemin, C. and P. Varene, 1968: [Paul Bert and body plethysmography (1868-1968)]. *Presse Med*, **76**, 2403-2404.
- Jacquin, T. D., V. Borday, S. Schneider-Maunoury, P. Topilko, G. Ghilini, F. Kato, P. Charnay and J. Champagnat, 1996: Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron*, **17**, 747-758.
- Jameson, H., R. Bateman, P. Byrne, J. Dyavanapalli, X. Wang, V. Jain and D. Mendelowitz, 2016: Oxytocin neuron activation prevents hypertension that occurs with chronic intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **310**, H1549-1557.
- Janczewski, W. A. and J. L. Feldman, 2006: Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *The Journal of Physiology Online*, **570**, 407-420.
- Janczewski, W. A., A. Tashima, P. Hsu, Y. Cui and J. L. Feldman, 2013: Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci*, **33**, 5454-5465.
- Jaquet, K., K. Krause, M. Tawakol-Khodai, S. Geidel and K. H. Kuck, 2002: Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*, **64**, 326-333.
- Jelkmann, W., 1986: Erythropoietin research, 80 years after the initial studies by Carnot and Deflandre. *Respir Physiol*, **63**, 257-266.
- Jelkmann, W., 1992: Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, **72**, 449-489.
- Jelkmann, W., 2007: Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*, **78**, 183-205.
- Jelkmann, W., 2013: Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother*, **40**, 302-309.
- Jensen, D., J. Duffin, Y. M. Lam, K. A. Webb, J. A. Simpson, G. A. Davies, L. A. Wolfe and D. E. O'Donnell, 2008: Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. *Respir. Physiol Neurobiol*, **161**, 76-86.

- Jensen, D., K. A. Webb and D. E. O'Donnell, 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., L. A. Wolfe, L. Slatkowska, K. A. Webb, G. A. Davies and D. E. O'Donnell, 2005: Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*, **288**, R1369-R1375.
- Jeton, F., J. Soliz, D. Marchant, V. Joseph, J. P. Richalet, A. Pichon and N. Voituren, 2017: Increased ventilation in female erythropoietin-deficient mouse line is not progesterone and estrous stage-dependent. *Respir Physiol Neurobiol*, **245**, 98-104.
- Jia, Y., N. Suzuki, M. Yamamoto, M. Gassmann and C. T. Noguchi, 2012: Endogenous erythropoietin signaling facilitates skeletal muscle repair and recovery following pharmacologically induced damage. *FASEB J*, **26**, 2847-2858.
- Jiang, C., A. Rojas, R. Wang and X. Wang, 2005: CO₂ central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules? *Respir. Physiol Neurobiol*, **145**, 115-126.
- Jin, X. T. and Y. Smith, 2011: Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol*, **717**, 27-37.
- Johannessen, M., D. Fontanilla, T. Mavlyutov, A. E. Ruoho and M. B. Jackson, 2011: Antagonist action of progesterone at sigma-receptors in the modulation of voltage-gated sodium channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, **300**, C328-337.
- Johnson, P. L., J. H. Hollis, R. Moratalla, S. L. Lightman and C. A. Lowry, 2005: Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J. Psychopharmacol*, **19**, 327-341.
- Johnson, S. M., M. A. Haxhiu and G. B. Richerson, 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, S. M., J. C. Smith, G. D. Funk and J. L. Feldman, 1994: Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J. Neurophysiol*, **72**, 2598-2608.
- Johnson, S. M., S. M. Turner, A. G. Huxtable and F. Ben-Mabrouk, 2012: Isolated in vitro brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology. *Respir. Physiol Neurobiol*, **180**, 1-7.
- Johnson, S. M., J. E. Wilkerson, M. R. Wenninger, D. R. Henderson and G. S. Mitchell, 2002: Role of synaptic inhibition in turtle respiratory rhythm generation. *J Physiol*, **544**, 253-265.
- Jokic, R., T. Zintel, G. Sridhar, C. G. Gallagher and M. F. Fitzpatrick, 2000: Ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia in relatives of patients with the obesity hypoventilation syndrome. *Thorax*, **55**, 940-945.
- Jones, S. S., A. D. D'Andrea, L. L. Haines and G. G. Wong, 1990: Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood*, **76**, 31-35.
- Joseph, L., S. Goldberg, S. Shahroor, M. Gomori, F. B. Mimouni and E. Picard, 2011: Sinus vein thrombosis as presenting finding in the congenital central hypoventilation syndrome: an insight on the pathophysiology of the association. *Pediatr. Pulmonol*, **46**, 826-828.
- Joseph, V., V. D. Doan, C. E. Morency, Y. Lajeunesse and A. Bairam, 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., L. M. Niane and A. Bairam, 2012: Antagonism of progesterone receptor suppresses carotid body responses to hypoxia and nicotine in rat pups. *Neuroscience*, **207**, 103-109.
- Joubert, F., A. S. Perrin-Terrin, E. Verkaeren, P. Cardot, M. N. Fiamma, A. Frugiere, I. Rivals, T. Similowski, C. Straus and L. Bodineau, 2016: Desogestrel enhances ventilation in Ondine patients: Animal data involving serotonergic systems. *Neuropharmacology*, **107**, 339-350.
- Jubinsky, P. T., O. I. Krijanovski, D. G. Nathan, J. Tavernier and C. A. Sieff, 1997: The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood*, **90**, 1867-1873.
- Juul, S. E., D. K. Anderson, Y. Li and R. D. Christensen, 1998: Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*, **43**, 40-49.
- 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.

- Kachidian, P., P. Poulat, L. Marlier and A. Privat, 1991: Immunohistochemical evidence for the coexistence of substance P, thyrotropin-releasing hormone, GABA, methionine-enkephalin, and leucine-enkephalin in the serotonergic neurons of the caudal raphe nuclei: a dual labeling in the rat. *J. Neurosci Res*, **30**, 521-530.
- Kalia, M. P., 1981: Anatomical organization of central respiratory neurons. *Annu. Rev. Physiol*, **43**, 105-120.
- Kalra, S. P., M. Bagnasco, E. E. Otukonyong, M. G. Dube and P. S. Kalra, 2003: Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept*, **111**, 1-11.
- Kamal, A., T. Al Shaibani and G. Ramakers, 2011: Erythropoietin decreases the excitatory neurotransmitter release probability and enhances synaptic plasticity in mice hippocampal slices. *Brain Res*, **1410**, 33-37.
- Karamanou, M. and G. Androutsos, 2013: Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) and the birth of respiratory physiology. *Thorax*, **68**, 978-979.
- Karteris, E., S. Zervou, Y. Pang, J. Dong, E. W. Hillhouse, H. S. Randeva and P. Thomas, 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.
- Kastin, A. J. and W. Pan, 2000: Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul Pept*, **92**, 37-43.
- Kastin, A. J., W. Pan, L. M. Maness, R. J. Koletsky and P. Ernsberger, 1999: Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides*, **20**, 1449-1453.
- Kastrup, Y., M. Hallbeck, A. Amandusson, S. Hirata, O. Hermanson and A. Blomqvist, 1999: Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett*, **275**, 85-88.
- Kato, J., S. Hirata, A. Nozawa and N. Yamada-Mouri, 1994: Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm. Behav*, **28**, 454-463.
- Katz, O., M. Stuble, N. Golishevski, L. Lifshitz, M. L. Tremblay, M. Gassmann, M. Mittelman and D. Neumann, 2010: Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models. *J Endocrinol*, **205**, 87-95.
- Kaufman, B. J., M. H. Ferguson and R. M. Cherniack, 1959: Hypoventilation in obesity. *J Clin Invest*, **38**, 500-507.
- Kaur, C., Y. You, J. Singh, C. M. Peng and E. A. Ling, 2001: Expression of Fos immunoreactivity in some catecholaminergic brainstem neurons in rats following high-altitude exposure. *J Neurosci Res*, **63**, 54-63.
- Kaura, V., C. D. Ingram, S. E. Gartside, A. H. Young and S. J. Judge, 2007: The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABA(A) receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *Eur Neuropsychopharmacol*, **17**, 108-115.
- Kawai, A., Y. Okada, K. Muckenhoff and P. Scheid, 1995: Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. *Respir. Physiol*, **100**, 25-32.
- Kawai, A., H. Onimaru and I. Homma, 2006: Mechanisms of CO₂/H⁺ chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. *J. Physiol*, **572**, 525-537.
- Kc, P., K. V. Balan, S. S. Tjoe, R. J. Martin, J. C. Lamanna, M. A. Haxhiu and T. E. Dick, 2010: Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J Physiol*, **588**, 725-740.
- Kelder, J., R. Azevedo, Y. Pang, V. J. de, J. Dong and P. Thomas, 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, A. D., 1960: Ablation and stimulation of the hypothalamus: circulatory effects. *Physiol Rev.*, **40(Suppl 4)**, 116-135.
- Kennedy, G. C., 1953: The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **140**, 578-596.
- Kertesz, N., J. Wu, T. H. Chen, H. M. Sucov and H. Wu, 2004: The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*, **276**, 101-110.

- Khemiri, H., M. Maresca and C. Gestreau, 2016: Carbamylated erythropoietin enhances mice ventilatory responses to changes in O₂ but not CO₂ levels. *Respir Physiol Neurobiol*, **232**, 1-12.
- Khemiri, H., T. Seaborn, C. Gestreau and J. Soliz, 2012: Erythropoietin and its antagonist regulate hypoxic fictive breathing in newborn mice. *Respir Physiol Neurobiol*, **183**, 115-121.
- Kilic, U., E. Kilic, J. Soliz, C. I. Bassetti, M. Gassmann and D. M. Hermann, 2005: Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J*, **19**, 249-251.
- Kim, J. G., S. Suyama, M. Koch, S. Jin, P. Argente-Arizon, J. Argente, Z. W. Liu, M. R. Zimmer, J. K. Jeong, K. Szigeti-Buck, Y. Gao, C. Garcia-Caceres, C. X. Yi, N. Salmaso, F. M. Vaccarino, J. Chowen, S. Diano, M. O. Dietrich, M. H. Tschop and T. L. Horvath, 2014a: Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci*, **17**, 908-910.
- Kim, Y. B., S. Uotani, D. D. Pierroz, J. S. Flier and B. B. Kahn, 2000: In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*, **141**, 2328-2339.
- Kim, Y. C., O. Mungunsukh, E. A. McCart, P. J. Roehrich, D. K. Yee and R. M. Day, 2014b: Mechanism of erythropoietin regulation by angiotensin II. *Mol Pharmacol*, **85**, 898-908.
- Kimakova, P., P. Solar, Z. Solarova, R. Komel and N. Debeljak, 2017: Erythropoietin and Its Angiogenic Activity. *Int J Mol Sci*, **18**.
- Kinkead, R., 2009: Phylogenetic trends in respiratory rhythmogenesis: insights from ectothermic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol*, **168**, 39-48.
- Kinney, H. C., K. G. Broadbelt, R. L. Haynes, I. J. Rognum and D. S. Paterson, 2011: The serotonergic anatomy of the developing human medulla oblongata: implications for pediatric disorders of homeostasis. *J Chem Neuroanat*, **41**, 182-199.
- Kinney, H. C., J. J. Filiano and W. F. White, 2001: Medullary serotonergic network deficiency in the sudden infant death syndrome: review of a 15-year study of a single dataset. *J Neuropathol. Exp. Neurol*, **60**, 228-247.
- Kitaichi, K., J. G. Chabot, F. F. Moebius, A. Flandorfer, H. Glossmann and R. Quirion, 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.
- Klausen, T., H. Christensen, J. M. Hansen, O. J. Nielsen, N. Fogh-Andersen and N. V. Olsen, 1996: Human erythropoietin response to hypocapnic hypoxia, normocapnic hypoxia, and hypocapnic normoxia. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **74**, 475-480.
- Klink, R., M. Robichaud and G. Debonnel, 2002: Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: effects of gender and pregnancy. *Neuropharmacology*, **43**, 1119-1128.
- Kloek, C., A. K. Haq, S. L. Dunn, H. J. Lavery, A. S. Banks and M. G. Myers, Jr., 2002: Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem*, **277**, 41547-41555.
- Knoflach, F., M. C. Hernandez and D. Bertrand, 2016: GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. *Biochem Pharmacol*, **115**, 10-17.
- Koenig, S. M., 2001: Pulmonary complications of obesity. *Am J Med Sci*, **321**, 249-279.
- Koksma, J. J., R. E. van Kesteren, T. W. Rosahl, R. Zwart, A. B. Smit, H. Luddens and A. B. Brussaard, 2003: Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. *J. Neurosci*, **23**, 788-797.
- Konig, S. A. and H. Seller, 1991: Historical development of current concepts on central chemosensitivity. *Arch Ital Biol*, **129**, 223-237.
- Korbel, S., T. Bittorf, E. Siegl and B. Kollner, 2004: Recombinant human erythropoietin induces proliferation and Ca(2+)-influx in specific leukocyte subpopulations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood and head kidney cells. *J Comp Physiol B*, **174**, 121-128.
- Korinek, M., V. Kapras, V. Vyklicky, E. Adamusova, J. Borovska, K. Vales, A. Stuchlik, M. Horak, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr., 2011: Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*, **76**, 1409-1418.
- Koshiya, N. and J. C. Smith, 1999: Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, **400**, 360-363.

- Koury, M. J. and M. C. Bondurant, 1990: Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion*, **30**, 673-674.
- Kovacs, K. J., 1998: c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int*, **33**, 287-297.
- Kowalczyk, M., M. Banach, D. P. Mikhailidis and J. Rysz, 2011: Erythropoietin update 2011. *Med Sci Monit*, **17**, RA240-247.
- Kramer, J. M., P. C. Nolan and T. G. Waldrop, 1999: In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res*, **835**, 197-203.
- Krause, K. L., H. V. Forster, S. E. Davis, T. Kiner, J. M. Bonis, L. G. Pan and B. Qian, 2009: Focal acidosis in the pre-Botzinger complex area of awake goats induces a mild tachypnea. *J Appl Physiol (1985)*, **106**, 241-250.
- Kubik, S., T. Miyashita and J. F. Guzowski, 2007: Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem*, **14**, 758-770.
- Kubin, L., H. Tojima, C. Reignier, A. I. Pack and R. O. Davies, 1996: Interaction of serotonergic excitatory drive to hypoglossal motoneurons with carbachol-induced, REM sleep-like atonia. *Sleep*, **19**, 187-195.
- Kumar, N. N., A. Velic, J. Soliz, Y. Shi, K. Li, S. Wang, J. L. Weaver, J. Sen, S. B. Abbott, R. M. Lazarenko, M. G. Ludwig, E. Perez-Reyes, N. Mohebbi, C. Bettoni, M. Gassmann, T. Suply, K. Seuwen, P. G. Guyenet, C. A. Wagner and D. A. Bayliss, 2015: PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science*, **348**, 1255-1260.
- Kumral, A., S. Genc, E. Ozer, O. Yilmaz, N. Gokmen, T. F. Koroglu, N. Duman, K. Genc and H. Ozkan, 2006: Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate*, **89**, 205-210.
- Kumral, A., F. Tuzun, M. G. Oner, S. Genc, N. Duman and H. Ozkan, 2011: Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. *Brain Dev*, **33**, 632-643.
- Kussius, C. L., N. Kaur and G. K. Popescu, 2009: Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J. Neurosci*, **29**, 6819-6827.
- Labombarda, F., D. Meffre, B. Delespierre, S. Krivokapic-Blondiaux, A. Chastre, P. Thomas, Y. Pang, J. P. Lydon, S. L. Gonzalez, A. F. De Nicola, M. Schumacher and R. Guennoun, 2010: Membrane progesterone receptors localization in the mouse spinal cord. *Neuroscience*, **166**, 94-106.
- Lahiri, S. and R. G. DeLaney, 1975a: Relationship between carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir Physiol*, **24**, 267-286.
- Lahiri, S. and R. G. DeLaney, 1975b: Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir Physiol*, **24**, 249-266.
- Lahiri, S. and R. E. Forster, 2nd, 2003: CO₂/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1413-1435.
- Lai, P. H., R. Everett, F. F. Wang, T. Arakawa and E. Goldwasser, 1986: Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*, **261**, 3116-3121.
- Lalley, P. M., 1986a: Responses of phrenic motoneurons of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. *J. Physiol*, **380**, 349-371.
- Lalley, P. M., 1986b: Serotonergic and non-serotonergic responses of phrenic motoneurons to raphe stimulation in the cat. *J. Physiol*, **380**, 373-385.
- Lam, S. Y., G. L. Tipoe and M. L. Fung, 2009: Upregulation of erythropoietin and its receptor expression in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, **648**, 207-214.
- Lambert, J. J., D. Belelli, S. C. Harney, J. A. Peters and B. G. Frenguelli, 2001: Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res. Brain Res. Rev*, **37**, 68-80.
- Lambert, J. J., D. Belelli, C. Hill-Venning and J. A. Peters, 1995: Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol. Sci*, **16**, 295-303.
- Lammert, A., W. Kiess, A. Bottner, A. Glasow and J. Kratzsch, 2001: Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 982-988.

- Lamon, S., E. Zacharewicz, A. N. Stephens and A. P. Russell, 2014: EPO-receptor is present in mouse C2C12 and human primary skeletal muscle cells but EPO does not influence myogenesis. *Physiol Rep*, **2**, e00256.
- 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.
- Langlet, F., A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot and B. Dehouck, 2013: Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol*, **521**, 3389-3405.
- Laouafa, S., E. Elliot-Portal, S. Revollo, E. M. Schneider Gasser, V. Joseph, N. Voituron, M. Gassmann and J. Soliz, 2016: Hypercapnic ventilatory response is decreased in a mouse model of excessive erythrocytosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **311**, R940-R947.
- Laouafa, S., A. S. Perrin-Terrin, F. Jeton, E. Elliot-Portal, R. Tam, L. Bodineau, N. Voituron and J. Soliz, 2017: Pharmacological, but not genetic, alteration of neural Epo modifies the CO₂/H(+) central chemosensitivity in postnatal mice. *Respir Physiol Neurobiol*, **242**, 73-79.
- Larnicol, N., F. Wallois, P. Berquin, F. Gros and D. Rose, 1994: c-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *J. Physiol Paris*, **88**, 81-88.
- Lauber, A. H., G. J. Romano and D. W. Pfaff, 1991: Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, **40**, 53-62.
- Launay, T., L. Hagstrom, S. Lottin-Divoux, D. Marchant, P. Quidu, F. Favret, A. Duvallet, T. Darribere, J. P. Richalet and M. Beaudry, 2010: Blunting effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human primary and rat L6 myoblasts is not counteracted by Epo. *Cell Prolif*, **43**, 1-8.
- Lavezzi, A. M., 2015: A New Theory to Explain the Underlying Pathogenetic Mechanism of Sudden Infant Death Syndrome. *Front Neurol*, **6**, 220.
- Law, M. L., G. Y. Cai, F. K. Lin, Q. Wei, S. Z. Huang, J. H. Hartz, H. Morse, C. H. Lin, C. Jones and F. T. Kao, 1986: Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6920-6924.
- Lazarenko, R. M., T. A. Milner, S. D. Depuy, R. L. Stornetta, G. H. West, J. A. Kievits, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet, 2009: Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J. Comp Neurol*, **517**, 69-86.
- Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman, 1996: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, **379**, 632-635.
- Leech, J., E. Onal, R. Aronson and M. Lopata, 1991: Voluntary hyperventilation in obesity hypoventilation. *Chest*, **100**, 1334-1338.
- Leech, J. A., E. Onal, P. Baer and M. Lopata, 1987: Determinants of hypercapnia in occlusive sleep apnea syndrome. *Chest*, **92**, 807-813.
- Legallois, C. J. J., 1812: *Expériences sur le principe de la vie*. Paris.
- Legendre, P. and G. L. Westbrook, 1990: The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *J Physiol*, **429**, 429-449.
- Leininger, G. M., 2011: Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiol Behav*, **104**, 572-581.
- Leininger, G. M., Y. H. Jo, R. L. Leshan, G. W. Louis, H. Yang, J. G. Barrera, H. Wilson, D. M. Opland, M. A. Faouzi, Y. Gong, J. C. Jones, C. J. Rhodes, S. Chua, Jr., S. Diano, T. L. Horvath, R. J. Seeley, J. B. Becker, H. Munzberg and M. G. Myers, Jr., 2009: Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab*, **10**, 89-98.
- Leonhardt, S. A., V. Boonyaratanakornkit and D. P. Edwards, 2003: Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*, **68**, 761-770.
- Lesage, F., 2003: Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, **44**, 1-7.
- Levy, R. D., M. G. Cosio, L. Gibbons, P. T. Macklem and J. G. Martin, 1992: Induction of sleep apnoea with negative pressure ventilation in patients with chronic obstructive lung disease. *Thorax*, **47**, 612-615.

- Li, A. and E. Nattie, 2002: CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir.Physiol Neurobiol.*, **133**, 11-22.
- Li, A. and E. Nattie, 2006: Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J. Physiol*, **570**, 385-396.
- Li, C., E. Ioffe, N. Fidahusein, E. Connolly and J. M. Friedman, 1998: Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice. *J Biol Chem*, **273**, 10078-10082.
- Li, D., C. Chin, R. Kato, S. Ward and T. G. Keens, 2013a: Does desogestrel improve ventilatory control in congenital central hypoventilation syndrome? *Pediatric sleep disordered breathing and ventilatory control*, **187**, A5194.
- Li, K. Y. and R. W. Putnam, 2013: Transient outwardly rectifying A currents are involved in the firing rate response to altered CO₂ in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **305**, R780-792.
- Li, N., A. Li and E. Nattie, 2013b: Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol*, **185**, 349-355.
- Li, X. L., S. Aou, Y. Oomura, N. Hori, K. Fukunaga and T. Hori, 2002: Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience*, **113**, 607-615.
- Li, Z., G. Ceccarini, M. Eisenstein, K. Tan and J. M. Friedman, 2013c: Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Mol Metab*, **2**, 364-375.
- Liao, G. S., L. Kubin, R. J. Galante, A. P. Fishman and A. I. Pack, 1996: Respiratory activity in the facial nucleus in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. *J Physiol*, **492 (Pt 2)**, 529-544.
- Licinio, J., C. Mantzoros, A. B. Negrao, G. Cizza, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, G. P. Chrousos, B. Karp, C. Allen, J. S. Flier and P. W. Gold, 1997: Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med*, **3**, 575-579.
- Licinio, J., A. B. Negrao, C. Mantzoros, V. Kaklamani, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, P. P. Negro, A. Mulla, J. D. Veldhuis, L. Cearnal, J. S. Flier and P. W. Gold, 1998: Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 4140-4147.
- Lieske, S. P., M. Thoby-Brisson, P. Telgkamp and J. M. Ramirez, 2000: Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nat Neurosci*, **3**, 600-607.
- Lin, C. C., 1994: Effect of nasal CPAP on ventilatory drive in normocapnic and hypercapnic patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J*, **7**, 2005-2010.
- Lin, C. S., S. K. Lim, V. D'Agati and F. Costantini, 1996: Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev*, **10**, 154-164.
- Lin, L. H., O. M. Taktakishvili and W. T. Talman, 2008: Colocalization of neurokinin-1, N-methyl-D-aspartate, and AMPA receptors on neurons of the rat nucleus tractus solitarii. *Neuroscience*, **154**, 690-700.
- Lindsey, B. G., I. A. Rybak and J. C. Smith, 2012: Computational models and emergent properties of respiratory neural networks. *Compr Physiol*, **2**, 1619-1670.
- Lindstrom, P., 2007: The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal*, **7**, 666-685.
- Linsenbardt, A. J., A. Taylor, C. M. Emnett, J. J. Doherty, K. Krishnan, D. F. Covey, S. M. Paul, C. F. Zorumski and S. Mennerick, 2014: Different oxysterols have opposing actions at N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology*, **85**, 232-242.
- Lipski, J., R. M. McAllen and K. M. Spyer, 1977: The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarius. *J Physiol*, **269**, 797-810.
- Liu, B. and L. A. Arbogast, 2009: Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. *J. Neuroendocrinol*, **21**, 993-1000.
- Liu, C., K. Shen, Z. Liu and C. T. Noguchi, 1997: Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*, **272**, 32395-32400.

- Liu, Q. and M. T. Wong-Riley, 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, R. P. and B. L. Hamilton, 1980: Neurons of the periaqueductal gray matter as revealed by Golgi study. *J Comp Neurol*, **189**, 403-418.
- Liu, Z. and R. Patino, 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., X. Morin, J. F. Brunet and D. J. Anderson, 1999: Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron*, **22**, 693-705.
- Loewy, A. D. and H. Burton, 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, A. D., J. H. Wallach and S. McKellar, 1981: Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Res*, **228**, 63-80.
- Loftis, J. M. and A. Janowsky, 2003: The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther*, **97**, 55-85.
- Loiseau, C., F. Cayetanot, F. Joubert, A. S. Perrin-Terrin, P. Cardot, M. N. Fiamma, A. Frugiere, C. Straus and L. Bodineau, 2017: Current perspectives for the use of gonane progesterone drugs in the treatment of central hypoventilation syndromes. *Curr Neuropharmacol*.
- Loiseau, C., D. Osinski, F. Joubert, C. Straus, T. Similowski and L. Bodineau, 2014: The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. *Neurosci. Lett*, **567**, 63-67.
- Lollmann, B., S. Gruninger, A. Stricker-Krongrad and M. Chiesi, 1997: Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 648-652.
- Lopata, M. and E. Onal, 1982: Mass loading, sleep apnea, and the pathogenesis of obesity hypoventilation. *Am Rev Respir Dis*, **126**, 640-645.
- Lorry, A. C., 1760: Sur les mouvements du cerveau. Second mémoire. Sur les mouvements contre nature de ce viscère, et sur les organes qui font le principe de son action., *Mem. Math. Phys. Pres. Acad. Roy. Sci. Div. Sav.*, Paris 3.
- Losel, R., A. Dorn-Beineke, E. Falkenstein, M. Wehling and M. Feuring, 2004: Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **36**, 1532-1541.
- Lou, P. H., G. Yang, L. Huang, Y. Cui, T. Pourbahrami, G. K. Radda, C. Li and W. Han, 2010: Reduced body weight and increased energy expenditure in transgenic mice over-expressing soluble leptin receptor. *PLoS One*, **5**, e11669.
- Lourenco, R. V., 1969: Diaphragm activity in obesity. *J Clin Invest*, **48**, 1609-1614.
- Louw-du Toit, R., M. S. Perkins, J. L. Snoep, K. H. Storbeck and D. Africander, 2016: Fourth-Generation Progestins Inhibit 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and Modulate the Biosynthesis of Endogenous Steroids. *PLoS One*, **11**, e0164170.
- Low, C. M. and K. S. Wee, 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.
- Lucaccioni, L., P. Davies, N. Gibson, S. Farooqi and G. Shaikh, 2015: Leptin replacement improves central ventilation in a patient with congenital leptin deficiency: first report in childhood. *Endocrine Abstracts*.
- Lugliani, R., B. J. Whipp and K. Wasserman, 1979: Doxapram hydrochloride: a respiratory stimulant for patients with primary alveolar hypoventilation. *Chest*, **76**, 414-419.
- 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.
- Luo, W., L. Hu and F. Wang, 2015: The protective effect of erythropoietin on the retina. *Ophthalmic Res*, **53**, 74-81.
- Luthi, M., D. E. Roach, A. E. Beaudin, C. T. Debert, R. S. Sheldon and M. J. Poulin, 2008: Effects of ovarian hormones and aging on respiratory sinus arrhythmia and breathing patterns in women. *Clin Auton Res*, **18**, 134-144.

- Lykissas, M. G., A. V. Korompilias, M. D. Vekris, G. I. Mitsionis, E. Sakellariou and A. E. Beris, 2007: The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. *Clin Neurol Neurosurg*, **109**, 639-644.
- Lynch, J. W., 2004: Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*, **84**, 1051-1095.
- Maamra, M., M. Bidlingmaier, M. C. Postel-Vinay, Z. Wu, C. J. Strasburger and R. J. Ross, 2001: Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology*, **142**, 4389-4393.
- Macarlupu, J. L., A. Buvry, O. E. Morel, F. Leon-Velarde, J. P. Richalet and F. Favret, 2006: Characterisation of the ventilatory response to hypoxia in a model of transgenic anemic mice. *Respir Physiol Neurobiol*, **150**, 19-26.
- Macdonald, R. L. and R. W. Olsen, 1994: GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 569-602.
- Mack, S. O., M. Wu, P. Kc and M. A. Haxhiu, 2007: Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. *J Appl Physiol (1985)*, **102**, 189-199.
- Macnutt, M. J., M. J. De Souza, S. E. Tomczak, J. L. Homer and A. W. Sheel, 2012: Resting and exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle. *J Appl Physiol (1985)*, **112**, 737-747.
- Madej, T., M. S. Boguski and S. H. Bryant, 1995: Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett*, **373**, 13-18.
- Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan and et al., 1995: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, **1**, 1155-1161.
- Maguire, J. and I. Mody, 2009: Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. *Psychoneuroendocrinology*, **34 Suppl 1**, S84-S90.
- Maha Al-Asmakh, M. S., 2007: Reproductive functions of progesterone. *Middle East Fertility Society Journal*, **12**.
- Maiese, K., F. Li and Z. Z. Chong, 2005: New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, **293**, 90-95.
- Majewska, M. D., 1992: Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol*, **38**, 379-395.
- Majewska, M. D., S. Demigoren, C. E. Spivak and E. D. London, 1990: The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. *Brain Res*, **526**, 143-146.
- Majewska, M. D., N. L. Harrison, R. D. Schwartz, J. L. Barker and S. M. Paul, 1986: Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, **232**, 1004-1007.
- Majewska, M. D. and R. D. Schwartz, 1987: Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res*, **404**, 355-360.
- Makepeace, A. W., G. L. Weinstein and M. H. Friedman, 1937: The effect of progestin and progesterone on ovulation in the rabbit. *American Journal of Physiology*, **119**, 512-516.
- Malayev, A., T. T. Gibbs and D. H. Farb, 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.
- Malik, V., D. Smith and T. Lee-Chiong Jr, 2012: Respiratory Physiology During Sleep. *Sleep Medicine Clinics*, **7**, 497-505.
- Mallard, C. and Z. S. Vexler, 2015: Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? *Stroke*, **46**, 3006-3011.
- Malli, F., A. I. Papaioannou, K. I. Gourgoulisanis and Z. Daniil, 2010: The role of leptin in the respiratory system: an overview. *Respir Res*, **11**, 152.
- Marchenko, V., H. Koizumi, B. Mosher, N. Koshiya, M. F. Tariq, T. G. Bezdudnaya, R. Zhang, Y. I. Molokov, I. A. Rybak and J. C. Smith, 2016: Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Botzinger and Botzinger Complexes. *eNeuro*, **3**.

- Marcouiller, F., R. Boukari, S. Laouafa, R. Lavoie and V. Joseph, 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.
- Maresh, G. A., L. M. Maness, J. E. Zadina and A. J. Kastin, 2001: In vitro demonstration of a saturable transport system for leptin across the blood-brain barrier. *Life Sci*, **69**, 67-73.
- Margetic, S., C. Gazzola, G. G. Pegg and R. A. Hill, 2002: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1407-1433.
- Marti, H. H., 2004: Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol*, **207**, 3233-3242.
- Marti, H. H., R. H. Wenger, L. A. Rivas, U. Straumann, M. Digicaylioglu, V. Henn, Y. Yonekawa, C. Bauer and M. Gassmann, 1996: Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, **8**, 666-676.
- Marzo, F., A. Lavorgna, G. Coluzzi, E. Santucci, F. Tarantino, T. Rio, E. Conti, C. Autore, L. Agati and F. Andreotti, 2008: Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways. *J Thromb Thrombolysis*, **26**, 183-187.
- Masuda, S., M. Nagao, K. Takahata, Y. Konishi, F. Gallyas, Jr., T. Tabira and R. Sasaki, 1993: Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem*, **268**, 11208-11216.
- Masuda, S., M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda and R. Sasaki, 1994: A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, **269**, 19488-19493.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori and K. Nakao, 1997: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, **3**, 1029-1033.
- Mateika, J. H. and D. Komnenov, 2017: Intermittent hypoxia initiated plasticity in humans: A multipronged therapeutic approach to treat sleep apnea and overlapping co-morbidities. *Exp Neurol*, **287**, 113-129.
- Mateika, J. H. and G. Narwani, 2009: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity in humans and other animals: does exposure to intermittent hypoxia promote or mitigate sleep apnoea? *Exp Physiol*, **94**, 279-296.
- Matera, I., T. Bachetti, F. Puppo, D. M. Di, F. Morandi, G. M. Casiraghi, M. R. Cilio, R. Hennekam, R. Hofstra, J. G. Schober, R. Ravazzolo, G. Ottonello and I. Ceccherini, 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, O. P., 2011: Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. *J Perinatal*, **31**, 302-310.
- Matrot, B., E. Durand, S. Dager, G. Vardon, C. Gaultier and J. Gallego, 2005: Automatic classification of activity and apneas using whole body plethysmography in newborn mice. *Journal of Applied Physiology*, **98**, 365-370.
- Matsuoka, T., C. Saiki and J. P. Mortola, 1994: Metabolic and ventilatory responses to anemic hypoxia in conscious rats. *J Appl Physiol (1985)*, **77**, 1067-1072.
- Maurice, T., 2004: Neurosteroids and sigma1 receptors, biochemical and behavioral relevance. *Pharmacopsychiatry*, **37 Suppl 3**, S171-182.
- Mayer, M. L., 2006: Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, **440**, 456-462.
- Mayer, M. L., 2016: Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Curr Opin Struct Biol*, **41**, 119-127.
- Mayer, M. L. and G. L. Westbrook, 1987: Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol*, **394**, 501-527.
- McCrimmon, D. R., G. F. Alheid, M. Jiang, T. Calandriello and A. Topgi, 2004: Converging functional and anatomical evidence for novel brainstem respiratory compartments in the rat. *Adv Exp Med Biol*, **551**, 101-105.
- McDonald, D. M. and R. A. Mitchell, 1981: The neural pathway involved in "efferent inhibition" of chemoreceptors in the cat carotid body. *J Comp Neurol.*, **201**, 457-476.

- McEwen, B. S., H. Coirini and M. Schumacher, 1990: Steroid effects on neuronal activity: when is the genome involved? *Ciba Found. Symp*, **153**, 3-12.
- McEwen, B. S., H. Coirini, A. Westlind-Danielsson, M. Frankfurt, E. Gould, M. Schumacher and C. Woolley, 1991: Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **39**, 223-232.
- McKay, L. C., W. A. Janczewski and J. L. Feldman, 2005: Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons. *Nat. Neurosci.*, **8**, 1142-1144.
- Meffre, D., B. Delespierre, M. Gouezou, P. Leclerc, G. P. Vinson, M. Schumacher, D. G. Stein and R. Guennoun, 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., F. Labombarda, B. Delespierre, A. Chastre, A. F. De Nicola, D. G. Stein, M. Schumacher and R. Guennoun, 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.
- Melcangi, R. C., S. Giatti, D. Calabrese, M. Pesaresi, G. Cermenati, N. Mitro, B. Viviani, L. M. Garcia-Segura and D. Caruso, 2014: Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol*, **113**, 56-69.
- Mellen, N. M., W. A. Janczewski, C. M. Bocchiaro and J. L. Feldman, 2003: Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*, **37**, 821-826.
- Mellen, N. M. and M. Thoby-Brisson, 2012: Respiratory circuits: development, function and models. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 676-685.
- Mellins, R. B., H. H. Balfour, Jr., G. M. Turino and R. W. Winters, 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, S. H. and L. D. Griffin, 2002: Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab*, **13**, 35-43.
- Menuet, C., H. Khemiri, T. de la Poeze d'Harambure and C. Gestreau, 2016: Polycythemia and high levels of erythropoietin in blood and brain blunt the hypercapnic ventilatory response in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **310**, R979-991.
- Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah and P. Trayhurn, 1996: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, **387**, 113-116.
- Mercer, J. G., K. M. Moar and N. Hoggard, 1998: Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology*, **139**, 29-34.
- Merrill, E. G., 1970: The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Res*, **24**, 11-28.
- Messenger, S. A., J. M. Moreau and J. Ciriello, 2013: Effect of chronic intermittent hypoxia on leptin and leptin receptor protein expression in the carotid body. *Brain Res*, **1513**, 51-60.
- Meyer, C., R. Schmid, P. C. Scriba and M. Wehling, 1996: Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur. J. Biochem*, **239**, 726-731.
- Mihm, M., S. Gangooly and S. Muttukrishna, 2011: The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod. Sci*, **124**, 229-236.
- Mikami, M., K. Tatsumi, H. Kimura, Y. Honda and T. Kuriyama, 1989: Respiration effect of synthetic progestin in small doses in normal men. *Chest*, **96**, 1073-1075.
- Mikhail, A. A., E. X. Beck, A. Shafer, B. Barut, J. S. Gbur, T. J. Zupancic, A. C. Schweitzer, J. A. Cioffi, G. Lacaud, B. Ouyang, G. Keller and H. R. Snodgrass, 1997: Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood*, **89**, 1507-1512.
- Milerad, J., H. Lagercrantz and O. Lofgren, 1985: Alveolar hypoventilation treated with medroxyprogesterone. *Arch. Dis. Child*, **60**, 150-155.
- Miller, A. D., K. Ezure and I. Suzuki, 1985: Control of abdominal muscles by brain stem respiratory neurons in the cat. *J. Neurophysiol*, **54**, 155-167.

- Miller, M. E., M. Rorth, H. H. Parving, D. Howard, I. Reddington, C. R. Valeri and F. Stohlman, Jr., 1973: pH effect on erythropoietin response to hypoxia. *N Engl J Med*, **288**, 706-710.
- Miller, P. S. and T. G. Smart, 2010: Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **31**, 161-174.
- Min, L., H. Takemori, Y. Nonaka, Y. Katoh, J. Doi, N. Horike, H. Osamu, F. S. Raza, G. P. Vinson and M. Okamoto, 2004: Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol*, **215**, 143-148.
- Miro-Murillo, M., A. Elorza, I. Soro-Arnaiz, L. Albacete-Albacete, A. Ordonez, E. Balsa, A. Vara-Vega, S. Vazquez, E. Fuertes, C. Fernandez-Criado, M. O. Landazuri and J. Aragones, 2011: Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS One*, **6**, e22589.
- Mitchell, G. S., 2004a: Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1288-1290.
- Mitchell, G. S., 2004b: Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. *Nat Neurosci*, **7**, 1288-1290.
- Mitchell, R. A., H. H. Loeschcke, W. H. Massion and J. W. Severinghaus, 1963a: Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **18**, 523-533.
- Mitchell, R. A., H. H. Loeschcke, J. W. Severinghaus, B. W. Richardson and W. H. Massion, 1963b: Regions of respiratory chemosensitivity on the surface of the medulla. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **109**, 661-681.
- Miyake, T., C. K. Kung and E. Goldwasser, 1977: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, **252**, 5558-5564.
- Moga, M. M., H. Herbert, K. M. Hurley, Y. Yasui, T. S. Gray and C. B. Saper, 1990: Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.*, **295**, 624-661.
- Mohan, N., F. Monickaraj, M. Balasubramanyam, M. Rema and V. Mohan, 2012: Imbalanced levels of angiogenic and angiostatic factors in vitreous, plasma and postmortem retinal tissue of patients with proliferative diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications*, **26**, 435-441.
- Mokhlesi, B., 2010: Obesity hypoventilation syndrome: a state-of-the-art review. *Respir Care*, **55**, 1347-1362; discussion 1363-1345.
- Mokhlesi, B. and A. Tulaimat, 2007: Recent advances in obesity hypoventilation syndrome. *Chest*, **132**, 1322-1336.
- Mokhlesi, B., A. Tulaimat, I. Faibussowitsch, Y. Wang and A. T. Evans, 2007: Obesity hypoventilation syndrome: prevalence and predictors in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, **11**, 117-124.
- Molkov, Y. I., B. J. Bacak, T. E. Dick and I. A. Rybak, 2013: Control of breathing by interacting pontine and pulmonary feedback loops. *Front Neural Circuits*, **7**, 16.
- Monnet, F. P., V. Mahe, P. Robel and E. E. Baulieu, 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.
- Montague, C. T., I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, J. E. Digby, S. N. Mohammed, J. A. Hurst, C. H. Cheetham, A. R. Earley, A. H. Barnett, J. B. Prins and S. O'Rahilly, 1997: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, **387**, 903-908.
- Mony, L., J. N. Kew, M. J. Gunthorpe and P. Paoletti, 2009: Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, **157**, 1301-1317.
- Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann and P. H. Seeburg, 1994: Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, **12**, 529-540.
- Morash, B., A. Li, P. R. Murphy, M. Wilkinson and E. Ur, 1999: Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, **140**, 5995-5998.
- Morgan, J. I., D. R. Cohen, J. L. Hempstead and T. Curran, 1987: Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, **237**, 192-197.
- Morgan, J. I. and T. Curran, 1986: Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, **322**, 552-555.

- Morrell, M. J., P. Heywood, S. H. Moosavi, J. Stevens and A. Guz, 2001: Central chemosensitivity and breathing asleep in unilateral medullary lesion patients: comparisons to animal data. *Respir Physiol*, **129**, 269-277.
- Morrison, C. D., G. J. Morton, K. D. Niswender, R. W. Gelling and M. W. Schwartz, 2005: Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **289**, E1051-1057.
- Morrison, S. F., 2004: Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci*, **19**, 67-74.
- Mortola, J. P., 1984: Breathing pattern in newborns. *Journal of Applied Physiology*, **56**, 1533-1540.
- Mortola, J. P., 2004: Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respir Physiol Neurobiol*, **141**, 345-356.
- Mortola, J. P. and P. B. Frappell, 1998: On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. *Can. J. Physiol Pharmacol*, **76**, 937-944.
- Mortola, J. P., R. Rezzonico and C. Lanthier, 1989: Ventilation and oxygen consumption during acute hypoxia in newborn mammals: a comparative analysis. *Respir Physiol*, **78**, 31-43.
- Moschos, S., J. L. Chan and C. S. Mantzoros, 2002: Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*, **77**, 433-444.
- Mulkey, D. K., A. M. Mistry, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss, 2006: Purinergic P2 Receptors Modulate Excitability But Do Not Mediate pH Sensitivity of RTN Respiratory Chemoreceptors. *Journal of Neuroscience*, **26**, 7230-7233.
- Mulkey, D. K., D. L. Rosin, G. West, A. C. Takakura, T. S. Moreira, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet, 2007a: Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J. Neurosci*, **27**, 14128-14138.
- Mulkey, D. K., R. L. Stornetta, M. C. Weston, J. R. Simmons, A. Parker, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet, 2004: Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat. Neurosci*, **7**, 1360-1369.
- Mulkey, D. K., E. M. Talley, R. L. Stornetta, A. R. Siegel, G. H. West, X. Chen, N. Sen, A. M. Mistry, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss, 2007b: TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J. Neurosci*, **27**, 14049-14058.
- Mulkey, D. K. and I. C. Wenker, 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.
- Mullier, A., S. G. Bouret, V. Prevot and B. Dehouck, 2010: Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol*, **518**, 943-962.
- Munzberg, H., M. Bjornholm, S. H. Bates and M. G. Myers, Jr., 2005: Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 642-652.
- Murciano, D., J. Boczkowski, Y. Lecocguic, J. M. Emili, R. Pariente and M. Aubier, 1988: Tracheal occlusion pressure: a simple index to monitor respiratory muscle fatigue during acute respiratory failure in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med*, **108**, 800-805.
- Mutolo, D., E. Cinelli, F. Bongianini and T. Pantaleo, 2011: Identification of a cholinergic modulatory and rhythmogenic mechanism within the lamprey respiratory network. *J Neurosci*, **31**, 13323-13332.
- Muzumdar, H. and R. Arens, 2008: Central Alveolar Hypoventilation Syndromes. *Sleep Med. Clin*, **3**, 601-615.
- Myers, M. G., Jr. and R. B. Simerly, 2010: The neuroendocrinology and neuroscience of energy balance. *Front Neuroendocrinol*, **31**, 1-3.
- Nadeau, J. H., 2001: Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet*, **2**, 165-174.
- Naeije, N., C. Melot, R. Naeije and R. Sergysels, 1982: Ondine's curse. Report of a patient treated with almitrine, a new respiratory stimulant. *Eur J Respir Dis*, **63**, 342-346.
- Nagai, A., E. Nakagawa, H. B. Choi, K. Hatori, S. Kobayashi and S. U. Kim, 2001: Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 386-392.
- Nagao, M., S. Masuda, S. Abe, M. Ueda and R. Sasaki, 1992a: Production and ligand-binding characteristics of the soluble form of murine erythropoietin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **188**, 888-897.

- Nagao, M., H. Suga, M. Okano, S. Masuda, H. Narita, K. Ikura and R. Sasaki, 1992b: Nucleotide sequence of rat erythropoietin. *Biochim Biophys Acta*, **1171**, 99-102.
- Naimark, A. and R. M. Cherniack, 1960: Compliance of the respiratory system and its components in health and obesity. *J Appl Physiol*, **15**, 377-382.
- Nashmi, R. and H. A. Lester, 2006: CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J Mol Neurosci*, **30**, 181-184.
- Nattie, E., 1999: CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog. Neurobiol*, **59**, 299-331.
- Nattie, E. and A. Li, 2006: Central chemoreception 2005: A brief review. *Autonomic Neuroscience*, **In Press**, **Corrected Proof**.
- Nattie, E. and A. Li, 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. and A. Li, 2009: Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol (1985)*, **106**, 1464-1466.
- Nattie, E. and A. Li, 2012: Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol*, **2**, 221-254.
- Nattie, E. E., 2000: Multiple sites for central chemoreception: their roles in response sensitivity and in sleep and wakefulness. *Respir. Physiol*, **122**, 223-235.
- Nattie, E. E., 2001a: Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir. Physiol*, **129**, 257-268.
- Nattie, E. E., 2001b: Chemoreception and tonic drive in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region of the awake rat: bicuculline and muscimol dialysis in the RTN. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **499**, 27-32.
- Nattie, E. E. and W. H. Edwards, 1981: CSF acid-base regulation and ventilation during acute hypercapnia in the newborn dog. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, **50**, 566-574.
- Nattie, E. E. and A. Li, 2001: CO₂ dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J Appl. Physiol*, **90**, 1247-1257.
- Nattie, E. E. and A. Li, 2002: Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. *J. Physiol*, **544**, 603-616.
- Nattie, E. E., A. Li, G. B. Richerson and D. A. Lappi, 2004: Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J. Physiol*, **556**, 235-253.
- Neubauer, J. A., J. E. Melton and N. H. Edelman, 1990: Modulation of respiration during brain hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, **68**, 441-451.
- Newth, C. J., S. Packman and R. T. Bachand, Jr., 1983: Response to almitrine bismesylate in a child with a central alveolar hypoventilation syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl*, **126**, 303-306.
- Newton, K., V. Malik and T. Lee-Chiong, 2014: Sleep and breathing. *Clin Chest Med*, **35**, 451-456.
- Nichols, N. L., L. K. Hartzler, S. C. Conrad, J. B. Dean and R. W. Putnam, 2008: Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv Exp Med Biol*, **605**, 348-352.
- Niswender, K. D., D. G. Baskin and M. W. Schwartz, 2004: Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 362-369.
- Nitsos, I. and D. W. Walker, 1999: Characterization of pontine neurons which respond to hypoxia in fetal sheep 2. *Neurosci. Lett.*, **266**, 33-36.
- Niv-Spector, L., D. Gonen-Berger, I. Gourdou, E. Biener, E. E. Gussakovsky, Y. Benomar, K. V. Ramanujan, M. Taouis, B. Herman, I. Callebaut, J. Djiane and A. Gertler, 2005: Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J*, **391**, 221-230.
- Nobuta, H., M. R. Cilio, O. Danhaive, H. H. Tsai, S. Tupal, S. M. Chang, A. Murnen, F. Kreitzer, V. Bravo, C. Czeisler, H. N. Gokozan, P. Gygli, S. Bush, D. E. Weese-Mayer, B. Conklin, S. P. Yee, E. J. Huang, P. A. Gray, D. Rowitch and J. J. Otero, 2015: Dysregulation of locus coeruleus development in congenital central hypoventilation syndrome. *Acta Neuropathol*, **130**, 171-183.
- Nolan, P. C. and T. G. Waldrop, 1993: In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. *Brain Res.*, **630**, 101-114.
- Norgren, R., 1978: Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience*, **3**, 207-218.

- Nowbar, S., K. M. Burkart, R. Gonzales, A. Fedorowicz, W. S. Gozansky, J. C. Gaudio, M. R. Taylor and C. W. Zwillich, 2004: Obesity-associated hypoventilation in hospitalized patients: prevalence, effects, and outcome. *Am J Med*, **116**, 1-7.
- Nunez-Abades, P. A., A. M. Morillo and R. Pasaro, 1993: Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections. *J Auton.Nerv.Syst.*, **42**, 99-118.
- Nurse, C. A. and N. A. Piskuric, 2013: Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin Cell Dev Biol*, **24**, 22-30.
- Nutu, M., B. Weijdegard, P. Thomas, C. Bergh, A. Thurin-Kjellberg, Y. Pang, H. Billig and D. G. Larsson, 2007: Membrane progesterone receptor gamma: tissue distribution and expression in ciliated cells in the fallopian tube. *Mol. Reprod. Dev*, **74**, 843-850.
- O'Donnell, C. P., C. D. Schaub, A. S. Haines, D. E. Berkowitz, C. G. Tankersley, A. R. Schwartz and P. L. Smith, 1999: Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Respir Crit Care Med*, **159**, 1477-1484.
- O'Donnell, C. P., C. G. Tankersley, V. P. Polotsky, A. R. Schwartz and P. L. Smith, 2000: Leptin, obesity, and respiratory function. *Respir Physiol*, **119**, 163-170.
- Obara, N., N. Suzuki, K. Kim, T. Nagasawa, S. Imagawa and M. Yamamoto, 2008: Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*, **111**, 5223-5232.
- Ogawa, Y., H. Masuzaki, N. Isse, T. Okazaki, K. Mori, M. Shigemoto, N. Satoh, N. Tamura, K. Hosoda, Y. Yoshimasa and et al., 1995: Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest*, **96**, 1647-1652.
- Ogilvie, M., X. Yu, V. Nicolas-Metral, S. M. Pulido, C. Liu, U. T. Ruegg and C. T. Noguchi, 2000: Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, **275**, 39754-39761.
- Ohashi, S., M. Izumizaki, T. Atsumi and I. Homma, 2013: CO₂ homeostasis is maintained in conscious humans by regulation of tidal volume, but not of respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol*, **186**, 155-163.
- Ohta, R., N. Shigemura, K. Sasamoto, K. Koyano and Y. Ninomiya, 2003: Conditioned taste aversion learning in leptin-receptor-deficient db/db mice. *Neurobiol Learn Mem*, **80**, 105-112.
- Okada, Y., Z. Chen, W. Jiang, S. Kuwana and F. L. Eldridge, 2002: Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **93**, 427-439.
- Okada, Y., A. Kawai, K. Muckenhoff and P. Scheid, 1998: Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respir. Physiol*, **111**, 55-63.
- Okada, Y., K. Muckenhoff, G. Holtermann, H. Acker and P. Scheid, 1993: Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respir. Physiol*, **93**, 315-326.
- Oldreive, C. E., J. Harvey and G. H. Doherty, 2008: Neurotrophic effects of leptin on cerebellar Purkinje but not granule neurons in vitro. *Neurosci Lett*, **438**, 17-21.
- Olea, E., M. J. Ribeiro, T. Gallego-Martin, S. Yubero, R. Rigual, J. F. Masa, A. Obeso, S. V. Conde and C. Gonzalez, 2015: The Carotid Body Does Not Mediate the Acute Ventilatory Effects of Leptin. *Adv Exp Med Biol*, **860**, 379-385.
- Olson, A. L. and C. Zwillich, 2005: The obesity hypoventilation syndrome. *Am. J. Med*, **118**, 948-956.
- Ongphiphadhanakul, B., R. Rajatanavin, S. Chanprasertyothin, N. Piaseu and L. Chailurkit, 1999: Serum leptin concentrations in relation to body fat, gender, sex hormones and metabolic covariates in Thais. *J Med Assoc Thai*, **82**, 862-867.
- Onimaru, H., A. Arata and I. Homma, 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., A. Arata and I. Homma, 1988: Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.*, **445**, 314-324.
- Onimaru, H., A. Arata and I. Homma, 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., A. Arata and I. Homma, 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., K. Ballanyi and I. Homma, 2003: Contribution of Ca²⁺-dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro. *J Physiol*, **552**, 727-741.
- Onimaru, H. and I. Homma, 2003: A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J. Neurosci*, **23**, 1478-1486.
- Onimaru, H. and I. Homma, 2005a: Developmental changes in the spatio-temporal pattern of respiratory neuron activity in the medulla of late fetal rat. *Neuroscience*, **131**, 969-977.
- Onimaru, H. and I. Homma, 2005b: Optical imaging of respiratory neuron activity from the dorsal view of the lower brainstem. *Clin.Exp Pharmacol.Physiol*, **32**, 297-301.
- Onimaru, H. and I. Homma, 2006: Point:Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Point: the PFRG is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal 14. *Journal of Applied Physiology*, **100**, 2094-2095.
- Onimaru, H., K. Ikeda and K. Kawakami, 2008: CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J. Neurosci*, **28**, 12845-12850.
- Orem, J. and A. Netick, 1982: Characteristics of midbrain respiratory neurons in sleep and wakefulness in the cat. *Brain Research*, **244**, 231-241.
- Oren, J., C. J. Newth, C. E. Hunt, R. T. Brouillette, R. T. Bachand and D. C. Shannon, 1986: Ventilatory effects of almitrine bismesylate in congenital central hypoventilation syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis*, **134**, 917-919.
- Organized jointly by the American Thoracic Society, t. E. R. S. t. E. S. o. I. C. M., F. the Societe de Reanimation de Langue and D. approved by Ats Board of Directors, 2001: International Consensus Conferences in Intensive Care Medicine: noninvasive positive pressure ventilation in acute Respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*, **163**, 283-291.
- Otake, K., H. Sasaki, K. Ezure and M. Manabe, 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.
- Otsuka, M. and S. Konishi, 1974: Electrophysiology of mammalian spinal cord in vitro. *Nature*, **252**, 733-734.
- Overholt, J. L., B. A. Summers, E. Ficker and N. R. Prabhakar, 2001: CO₂/HCO₃⁻ modulates K⁺ and Ca²⁺ currents in glomus cells of the carotid body. *Adv Exp Med Biol*, **499**, 61-66.
- Oyamada, Y., M. Andrzejewski, K. Muckenhoff, P. Scheid and D. Ballantyne, 1999: Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir.Physiol*, **118**, 131-147.
- Oyamada, Y., D. Ballantyne, K. Muckenhoff and P. Scheid, 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., L. Zhang and C. E. Spivak, 2002: Direct noncompetitive inhibition of 5-HT(3) receptor-mediated responses by forskolin and steroids. *Arch Biochem Biophys*, **404**, 293-301.
- Pace, M. C. and P. Thomas, 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., W. A. Janczewski, W. Tan, C. T. Dickson, K. Deisseroth and J. L. Feldman, 2011: Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J. Neurosci*, **31**, 2895-2905.
- Pan, W., H. Hsueh, Y. He, A. Sakharkar, C. Cain, C. Yu and A. J. Kastin, 2008: Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology*, **149**, 2798-2806.
- Pan, W., H. Hsueh, C. Xu, X. Wu, S. G. Bouret and A. J. Kastin, 2011: Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A vy mice. *J Mol Neurosci*, **43**, 478-484.
- Panatier, A., D. T. Theodosis, J. P. Mothet, B. Touquet, L. Pollegioni, D. A. Poulain and S. H. Oliet, 2006: Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, **125**, 775-784.
- Pang, Y., J. Dong and P. Thomas, 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.

- Paoletti, P., 2011: Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci*, **33**, 1351-1365.
- Paoletti, P., C. Bellone and Q. Zhou, 2013: NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, **14**, 383-400.
- Paoletti, P. and J. Neyton, 2007: NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, **7**, 39-47.
- Pardridge, W. M. and L. J. Mietus, 1979: Transport of protein-bound steroid hormones into liver in vivo. *Am. J. Physiol*, **237**, E367-E372.
- Park-Chung, M., A. Malayev, R. H. Purdy, T. T. Gibbs and D. H. Farb, 1999: Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, **830**, 72-87.
- Park-Chung, M., F. S. Wu and D. H. Farb, 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., F. S. Wu, R. H. Purdy, A. A. Malayev, T. T. Gibbs and D. H. Farb, 1997: Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol. Pharmacol*, **52**, 1113-1123.
- Pascual, O., M. P. Morin-Surun, B. Barna, M. avit-Saubie, J. M. Pequignot and J. Champagnat, 2002: Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J. Physiol*, **544**, 511-520.
- Paterson, D. S., F. L. Trachtenberg, E. G. Thompson, R. A. Belliveau, A. H. Beggs, R. Darnall, A. E. Chadwick, H. F. Krous and H. C. Kinney, 2006: Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA*, **296**, 2124-2132.
- Paton, J. F., 1996: The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J Physiol*, **493 (Pt 3)**, 819-831.
- Paton, J. F., 1997: Rhythmic bursting of pre- and post-inspiratory neurones during central apnoea in mature mice. *The Journal of Physiology Online*, **502**, 623-639.
- Patrick, J. M. and A. Howard, 1972: The influence of age, sex, body size and lung size on the control and pattern of breathing during CO₂ inhalation in Caucasians. *Respir. Physiol*, **16**, 337-350.
- Pattyn, A., X. Morin, H. Cremer, C. Goidis and J. F. Brunet, 1997: Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development*, **124**, 4065-4075.
- Pattyn, A., X. Morin, H. Cremer, C. Goidis and J. F. Brunet, 1999: The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*, **399**, 366-370.
- Paul, S. M., J. J. Doherty, A. J. Robichaud, G. M. Belfort, B. Y. Chow, R. S. Hammond, D. C. Crawford, A. J. Linsenhardt, H. J. Shu, Y. Izumi, S. J. Mennerick and C. F. Zorumski, 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. and K. B. Franklin, 2001: *The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition*. San Diego, CA: Academic Press.
- Paxinos, G., G. Halliday, C. Watson, Y. Koutcherov and H. Wang, 2007: *Atlas of the developing mouse brain*. Academic Press.
- Pearce, R. A., R. L. Stornetta and P. G. Guyenet, 1989: Retrotrapezoid nucleus in the rat. *Neurosci. Lett*, **101**, 138-142.
- Peever, J. H., G. F. Tian and J. Duffin, 1999: Temperature and pH affect respiratory rhythm of in-vitro preparations from neonatal rats. *Respir Physiol*, **117**, 97-107.
- Peluso, J. J., A. Pappalardo, R. Losel and M. Wehling, 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., M. A. Parkis, A. K. Tryba and J. M. Ramirez, 2004: Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron*, **43**, 105-117.
- Pepin, J. L., N. Chouri-Pontarollo, O. Orliaguet and P. Levy, 2005: [Alveolar hypoventilation during sleep and domiciliary assisted ventilation]. *Rev Mal Respir*, **22**, 113-125.
- Perrigault, P. F., Y. H. Pouzeratte, S. Jaber, X. J. Capdevila, M. Hayot, G. Boccarda, M. Ramonatxo and P. Colson, 1999: Changes in occlusion pressure (P0.1) and breathing pattern during pressure support ventilation. *Thorax*, **54**, 119-123.

- Perrin-Terrin, A. S., F. Jeton, A. Pichon, A. Frugiere, J. P. Richalet, L. Bodineau and N. Voituron, 2016a: 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*.
- Perrin-Terrin, A. S., F. Joubert, M. N. Fiamma, P. Cardot, A. Frugiere, C. Straus and L. Bodineau, 2015: Facilitation of the respiratory rhythm in mice by acute exposure to a progestin, the Etonogestrel. Involvement of medullary areas. *Acta Physiologica*, **214**, 81-82.
- Perrin-Terrin, A. S., F. Joubert, C. Loiseau, F. Cayetanot, A. Frugiere, N. Voituron and L. Bodineau, 2016b: 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.
- Pete, G., S. O. Mack, M. A. Haxhiu, S. Walbaum and E. B. Gauda, 2002: CO₂-induced c-Fos expression in brainstem preprotachykinin mRNA containing neurons. *Respir. Physiol Neurobiol*, **130**, 265-274.
- Petersen, S. L., K. A. Intlekofer, P. J. Moura-Conlon, D. N. Brewer, J. Del Pino Sans and J. A. Lopez, 2013: Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front Neurosci*, **7**, 164.
- Peterson, T. C., G. D. Anderson, E. D. Kantor and M. R. Hoane, 2012: A comparison of the effects of nicotinamide and progesterone on functional recovery of cognitive behavior following cortical contusion injury in the rat. *J Neurotrauma*, **29**, 2823-2830.
- Petrovic, M., M. Sedlacek, M. Horak, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr., 2005: 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J. Neurosci*, **25**, 8439-8450.
- Phipps, P. R., E. Starritt, I. Caterson and R. R. Grunstein, 2002: Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity. *Thorax*, **57**, 75-76.
- Pichon, A., F. Jeton, R. El Hasnaoui-Saadani, L. Hagstrom, T. Launay, M. Beaudry, D. Marchant, P. Quidu, J. L. Macarlupu, F. Favret, J. P. Richalet and N. Voituron, 2016: Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia (Auckl)*, **4**, 29-39.
- Pierce, A. M. and L. K. Brown, 2015: Obesity hypoventilation syndrome: current theories of pathogenesis. *Curr Opin Pulm Med*, **21**, 557-562.
- Pineda, J. and G. K. Aghajanian, 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., R. C. Agis-Balboa, F. Pibiri, M. Nelson, A. Guidotti and E. Costa, 2008: Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. *Neurochem Res*, **33**, 1990-2007.
- Piper, A. J. and R. R. Grunstein, 2010: Big breathing: the complex interaction of obesity, hypoventilation, weight loss, and respiratory function. *J Appl Physiol (1985)*, **108**, 199-205.
- Piper, A. J. and R. R. Grunstein, 2011: Obesity hypoventilation syndrome: mechanisms and management. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **183**, 292-298.
- Pirker, S., C. Schwarzer, A. Wieselthaler, W. Sieghart and G. Sperk, 2000: GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, **101**, 815-850.
- Piskuric, N. A. and C. A. Nurse, 2012: Effects of chemostimuli on [Ca²⁺]_i responses of rat aortic body type I cells and endogenous local neurons: comparison with carotid body cells. *J Physiol*, **590**, 2121-2135.
- Piskuric, N. A., C. Vollmer and C. A. Nurse, 2011: Confocal immunofluorescence study of rat aortic body chemoreceptors and associated neurons in situ and in vitro. *J Comp Neurol*, **519**, 856-873.
- Pitts, R. F., 1941: The differentiation of respiratory centers. *AJP - Legacy*, **134**, 192-201.
- Pitts, R. F., 1946: Organisation of the respiratory center. *Physiol Rev.*, **26**, 609-630.
- Pitts, R. F., H. W. Magoun and S. W. Ranson, 1939: Localization of the medullary respiratory centers in the cat. *AJP - Legacy*, **126**, 673-688.
- Pletzer, B. A. and H. H. Kerschbaum, 2014: 50 years of hormonal contraception-time to find out, what it does to our brain. *Front Neurosci*, **8**, 256.
- Poets, C. F., R. G. Meny, M. R. Chobanian and R. E. Bonofiglio, 1999: Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr.Res.*, **45**, 350-354.
- Porcu, P., A. M. Barron, C. A. Frye, A. A. Walf, S. Y. Yang, X. Y. He, A. L. Morrow, G. C. Panzica and R. C. Melcangi, 2016: Neurosteroidogenesis Today: Novel Targets for Neuroactive Steroid Synthesis and Action and Their Relevance for Translational Research. *J Neuroendocrinol*, **28**, 12351.

- Porte, D., Jr., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. G. Baskin, D. P. Figlewicz and M. W. Schwartz, 1998: Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*, **41**, 863-881.
- Portillo, F., L. Grelot, S. Milano and A. L. Bianchi, 1994: Brainstem neurons with projecting axons to both phrenic and abdominal motor nuclei: a double fluorescent labeling study in the cat. *Neurosci.Lett.*, **173**, 50-54.
- Porzionato, A., M. Rucinski, V. Macchi, C. Stecco, I. Castagliuolo, L. K. Malendowicz and R. De Caro, 2011: Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the rat and human carotid body. *Brain Res*, **1385**, 56-67.
- Pratt, W. B., 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, W. B. and D. O. Toft, 2003: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)*, **228**, 111-133.
- Preston, M. E., D. Jensen, I. Janssen and J. T. Fisher, 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., T. Yamanishi, J. Aungst, L. S. Milescu, R. Zhang, G. B. Richerson and J. C. Smith, 2009: Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J. Neurosci*, **29**, 3720-3737.
- Pu, S., M. G. Dube, P. S. Kalra and S. P. Kalra, 2000: Regulation of leptin secretion: effects of aging on daily patterns of serum leptin and food consumption. *Regul Pept*, **92**, 107-111.
- Putnam, R. W., 2010: CO₂ chemoreception in cardiorespiratory control. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **108**, 1796-1802.
- Putnam, R. W., S. C. Conrad, M. J. Gdovin, J. S. Erlichman and J. C. Leiter, 2005: Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity. *Respir. Physiol Neurobiol*, **149**, 165-179.
- Putnam, R. W., J. A. Filosa and N. A. Ritucci, 2004: Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **287**, C1493-C1526.
- Quindry, J. C., C. G. Ballmann, E. E. Epstein and J. T. Selsby, 2016: Plethysmography measurements of respiratory function in conscious unrestrained mice. *J Physiol Sci*, **66**, 157-164.
- Quintero, M. C., R. W. Putnam and J. M. Cordovez, 2017: Theoretical perspectives on central chemosensitivity: CO₂/H⁺-sensitive neurons in the locus coeruleus. *PLoS Comput Biol*, **13**, e1005853.
- Rabie, T. and H. H. Marti, 2008: Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 263-274.
- Ramanantsoa, N., M. R. Hirsch, M. Thoby-Brisson, V. Dubreuil, J. Bouvier, P. L. Ruffault, B. Matrot, G. Fortin, J. F. Brunet, J. Gallego and C. Goriadis, 2011: Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *J. Neurosci*, **31**, 12880-12888.
- Ramirez, J. M., T. Dashevskiy, I. A. Marlin and N. Baertsch, 2016: Microcircuits in respiratory rhythm generation: commonalities with other rhythm generating networks and evolutionary perspectives. *Curr Opin Neurobiol*, **41**, 53-61.
- Rapoport, D. M., S. M. Garay, H. Epstein and R. M. Goldring, 1986: Hypercapnia in the obstructive sleep apnea syndrome. A reevaluation of the "Pickwickian syndrome". *Chest*, **89**, 627-635.
- Rasmussen, K., D. A. Morilak and B. L. Jacobs, 1986: Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. I. During naturalistic behaviors and in response to simple and complex stimuli. *Brain Res*, **371**, 324-334.
- Rasmussen, P., E. M. Foged, R. Krogh-Madsen, J. Nielsen, T. R. Nielsen, N. V. Olsen, N. C. Petersen, T. A. Sorensen, N. H. Secher and C. Lundby, 2010: Effects of erythropoietin administration on cerebral metabolism and exercise capacity in men. *J Appl Physiol (1985)*, **109**, 476-483.
- Ray, R. S., A. E. Corcoran, R. D. Brust, J. C. Kim, G. B. Richerson, E. Nattie and S. M. Dymecki, 2011: Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science*, **333**, 637-642.
- Redgate, E. S. and E. Gellhorn, 1958: Respiratory activity and the hypothalamus. *Am J Physiol*, **193**, 189-194.

- Redolfi, S., L. Corda, G. La Piana, S. Spandrio, P. Prometti and C. Tantucci, 2007: Long-term non-invasive ventilation increases chemosensitivity and leptin in obesity-hypoventilation syndrome. *Respir Med*, **101**, 1191-1195.
- Regensteiner, J. G., W. D. Woodard, D. D. Hagerman, J. V. Weil, C. K. Pickett, P. R. Bender and L. G. Moore, 1989: Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **66**, 808-813.
- Reid, I. R. and J. Comish, 2004: Direct actions of leptin on bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, **74**, 313-316.
- Reissmann, K. R., 1950: Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*, **5**, 372-380.
- Rekling, J. C. and J. L. Feldman, 1998: PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu. Rev. Physiol*, **60**, 385-405.
- Remy, I., I. A. Wilson and S. W. Michnick, 1999: Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, **283**, 990-993.
- Ren, J. and J. J. Greer, 2006a: Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J. Neurosci*, **26**, 3721-3730.
- Ren, J. and J. J. Greer, 2006b: Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period. *J. Physiol*, **574**, 535-546.
- Repetto, G. M., R. J. Corrales, S. G. Abara, L. Zhou, E. M. Berry-Kravis, C. M. Rand and D. E. Weese-Mayer, 2009: Later-onset congenital central hypoventilation syndrome due to a heterozygous 24-polyalanine repeat expansion mutation in the PHOX2B gene. *Acta Paediatr*, **98**, 192-195.
- Resch, J. M., B. Maunze, K. A. Phillips and S. Choi, 2014: Inhibition of food intake by PACAP in the hypothalamic ventromedial nuclei is mediated by NMDA receptors. *Physiol Behav*, **133**, 230-235.
- Rex, T. S., Y. Wong, K. Kodali and S. Merry, 2009: Neuroprotection of photoreceptors by direct delivery of erythropoietin to the retina of the retinal degeneration slow mouse. *Exp Eye Res*, **89**, 735-740.
- Ribas-Salgueiro, J. L., S. P. Gaytan, J. Ribas and R. Pasaro, 2005: Characterization of efferent projections of chemosensitive neurons in the caudal parapyramidal area of the rat brain. *Brain Res Bull*, **66**, 235-248.
- Ribas-Salgueiro, J. L., E. R. Matarredona, J. Ribas and R. Pasaro, 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.
- Ribatti, D., M. Presta, A. Vacca, R. Ria, R. Giuliani, P. Dell'Era, B. Nico, L. Roncali and F. Dammacco, 1999: Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, **93**, 2627-2636.
- Ricardo, J. A. and E. T. Koh, 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, G. B., 1995: Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. *J Neurophysiol*, **73**, 933-944.
- Richerson, G. B., 2004: Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci*, **5**, 449-461.
- Richerson, G. B., W. Wang, M. R. Hodges, C. I. Dohle and A. Diez-Sampedro, 2005: Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Exp Physiol*, **90**, 259-266; discussion 266-259.
- Richerson, G. B., W. Wang, J. Tiwari and S. R. Bradley, 2001: Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla. *Respir. Physiol*, **129**, 175-189.
- Richter, D. W., 1982: Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J. Exp. Biol*, **100**, 93-107.
- Richter, D. W., P. Schmidt-Garcon, O. Pierrefiche, A. M. Bischoff and P. M. Lalley, 1999: Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J Physiol*, **514 (Pt 2)**, 567-578.
- Richter, D. W. and K. M. Spyer, 2001: Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci.*, **24**, 464-472.
- Rigatto, H., J. P. Brady and R. de la Torre Verduzco, 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.

- Ritucci, N. A., J. B. Dean and R. W. Putnam, 1997: Intracellular pH response to hypercapnia in neurons from chemosensitive areas of the medulla. *Am J Physiol*, **273**, R433-441.
- Ritucci, N. A., J. B. Dean and R. W. Putnam, 2005a: Somatic vs. dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, **289**, C1094-1104.
- Ritucci, N. A., J. S. Erlichman, J. C. Leiter and R. W. Putnam, 2005b: Response of membrane potential and intracellular pH to hypercapnia in neurons and astrocytes from rat retrotrapezoid nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R851-861.
- Robert, D. and L. Argaud, 2007: Clinical review: long-term noninvasive ventilation. *Crit Care*, **11**, 210.
- Robichaud, M. and G. Debonnel, 2004: Modulation of the firing activity of female dorsal raphe nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids. *J. Endocrinol*, **182**, 11-21.
- Rochester, D. F. and Y. Enson, 1974: Current concepts in the pathogenesis of the obesity-hypoventilation syndrome. Mechanical and circulatory factors. *Am J Med*, **57**, 402-420.
- Rodriguez, E. M., J. L. Blazquez, F. E. Pastor, B. Pelaez, P. Pena, B. Peruzzo and P. Amat, 2005: Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol*, **247**, 89-164.
- Ross, C. A., D. A. Ruggiero and D. J. Reis, 1985: Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol.*, **242**, 511-534.
- Rossert, J. and K. U. Eckardt, 2005: Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*, **20**, 1025-1028.
- Rotter, R., M. Menshykova, T. Winkler, G. Matziolis, I. Stratos, M. Schoen, T. Bittorf, T. Mittlmeier and B. Vollmar, 2008: Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res*, **26**, 1618-1626.
- Roy, A., C. Rozanov, R. Iturriaga, A. Mokashi and S. Lahiri, 1997: Acid-sensing by carotid body is inhibited by blockers of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Brain Res*, **769**, 396-399.
- Rudolph, U. and H. Mohler, 2006: GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr. Opin. Pharmacol*, **6**, 18-23.
- Ruffault, P. L., F. D'Autreaux, J. A. Hayes, M. Nomaksteinsky, S. Autran, T. Fujiyama, M. Hoshino, M. Hagglund, O. Kiehn, J. F. Brunet, G. Fortin and C. Goridis, 2015: The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO₂. *Elife*, **4**.
- Ruffin, M. and S. Nicolaidis, 2000: Intracerebroventricular injection of murine leptin enhances the postprandial metabolic rate in the rat. *Brain Res*, **874**, 30-36.
- Rundqvist, H., E. Rullman, C. J. Sundberg, H. Fischer, K. Eisleitner, M. Stahlberg, P. Sundblad, E. Jansson and T. Gustafsson, 2009: Activation of the erythropoietin receptor in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol*, **161**, 427-434.
- Runold, M., H. Lagercrantz, N. R. Prabhakar and B. B. Fredholm, 1989: Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. *Journal of Applied Physiology*, **67**, 541-546.
- Ruschitzka, F. T., R. H. Wenger, T. Stallmach, T. Quaschnig, C. de Wit, K. Wagner, R. Labugger, M. Kelm, G. Noll, T. Rulicke, S. Shaw, R. L. Lindberg, B. Rodenwaldt, H. Lutz, C. Bauer, T. F. Luscher and M. Gassmann, 2000: Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11609-11613.
- Ryan, J. W. and T. G. Waldrop, 1995: Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. *Respir.Physiol*, **100**, 185-194.
- Ryan, N. K., C. M. Woodhouse, K. H. Van der Hoek, R. B. Gilchrist, D. T. Armstrong and R. J. Norman, 2002: Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod*, **66**, 1548-1554.
- Rybak, I. A., A. P. Abdala, S. N. Markin, J. F. Paton and J. C. Smith, 2007: Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. *Prog Brain Res*, **165**, 201-220.
- Saad, M. F., M. G. Riad-Gabriel, A. Khan, A. Sharma, R. Michael, S. D. Jinagouda, R. Boyadjian and G. M. Steil, 1998: Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 453-459.

- Saadani-Makki, F., A. Frugiere, F. Gros, S. Gaytan and L. Bodineau, 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.
- Saaresranta, T., T. Aittokallio, K. Utriainen and O. Polo, 2005: Medroxyprogesterone improves nocturnal breathing in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, **6**, 28.
- Saaresranta, T., P. Polo-Kantola, K. Irjala, H. Helenius and O. Polo, 1999: Respiratory insufficiency in postmenopausal women: sustained improvement of gas exchange with short-term medroxyprogesterone acetate. *Chest*, **115**, 1581-1587.
- Saaresranta, T. and O. Polo, 2002: Hormones and breathing. *Chest*, **122**, 2165-2182.
- Saiyed, R., C. M. Rand, M. S. Carroll, C. M. Koliboski, T. M. Stewart, C. D. Brogadir, A. S. Kenny, E. K. Petersen, D. W. Carley and D. E. Weese-Mayer, 2015: Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS): Circadian temperature variation. *Pediatr. Pulmonol.*
- Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels and J. Auwerx, 1995: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, **377**, 527-529.
- Sampson, M. G. and K. Grassino, 1983: Neuromechanical properties in obese patients during carbon dioxide rebreathing. *Am J Med*, **75**, 81-90.
- Sanchez, P. E., F. P. Navarro, R. P. Fares, J. Nadam, B. Georges, C. Moulin, M. Le Cavorsin, C. Bonnet, P. Ryvlin, A. Belmeguenai, J. Bodennec, A. Morales and L. Bezin, 2009: Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common beta chain expression in the rat brain throughout the life span. *J Comp Neurol*, **514**, 403-414.
- Sanchis-Gomar, F., J. L. Garcia-Gimenez, H. Pareja-Galeano, M. Romagnoli, C. Perez-Quilis and G. Lippi, 2014: Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective. *Int J Cardiol*, **171**, 116-125.
- Saper, C. B., A. D. Loewy, L. W. Swanson and W. M. Cowan, 1976a: Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res*, **117**, 305-312.
- Saper, C. B., L. W. Swanson and W. M. Cowan, 1976b: The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol.*, **169**, 409-442.
- Sarto-Jackson, I. and W. Sieghart, 2008: Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol*, **25**, 302-310.
- Sato, M., J. W. Severinghaus and A. I. Basbaum, 1992: Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **73**, 96-100.
- Satoh, N., Y. Ogawa, G. Katsuura, M. Hayase, T. Tsuji, K. Imagawa, Y. Yoshimasa, S. Nishi, K. Hosoda and K. Nakao, 1997: The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett*, **224**, 149-152.
- Sattler, M. B., D. Merkler, K. Maier, C. Stadelmann, H. Ehrenreich, M. Bahr and R. Diem, 2004: Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ*, **11 Suppl 2**, S181-192.
- Schaab, M. and J. Kratzsch, 2015: The soluble leptin receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **29**, 661-670.
- Schaeffer, M., F. Langlet, C. Lafont, F. Molino, D. J. Hodson, T. Roux, L. Lamarque, P. Verdie, E. Bourrier, B. Dehouck, J. L. Baneres, J. Martinez, P. F. Mery, J. Marie, E. Trinquet, J. A. Fehrentz, V. Prevot and P. Mollard, 2013: Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 1512-1517.
- Schindler, A. E., C. Campagnoli, R. Druckmann, J. Huber, J. R. Pasqualini, K. W. Schweppe and J. H. Thijssen, 2003: Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*, **46 Suppl 1**, S7-S16.
- Schoeller, D. A., L. K. Cella, M. K. Sinha and J. F. Caro, 1997: Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest*, **100**, 1882-1887.
- Schumacher, M., R. Guennoun, A. Ghomari, C. Massaad, F. Robert, M. El-Etr, Y. Akwa, K. Rajkowski and E. E. Baulieu, 2007: Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr. Rev*, **28**, 387-439.

- Schumacher, M., C. Mattern, A. Ghoumari, J. P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A. F. De Nicola and R. Guennoun, 2014: Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog. Neurobiol*, **113**, 6-39.
- Schwab, D. J., R. F. Bruinsma, J. L. Feldman and A. J. Levine, 2010: Rhythmogenic neuronal networks, emergent leaders, and k-cores. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **82**, 051911.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, M. Raskind, E. J. Boyko and D. Porte, Jr., 1996a: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*, **2**, 589-593.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn and D. G. Baskin, 1996b: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, **98**, 1101-1106.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield, P. Burn and D. G. Baskin, 1997: Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, **46**, 2119-2123.
- Scoppetta, C. and F. Grassi, 2004: Erythropoietin: a new tool for muscle disorders? *Med Hypotheses*, **63**, 73-75.
- Scott, M. M., J. L. Lachey, S. M. Sternson, C. E. Lee, C. F. Elias, J. M. Friedman and J. K. Elmquist, 2009: Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*, **514**, 518-532.
- Seaborn, T. and C. Caravagna, 2017: Erythropoietin-Mediated Regulation of Central Respiratory Command. *Vitam Horm*, **105**, 121-142.
- Semenza, G. L., M. K. Nejfelt, S. M. Chi and S. E. Antonarakis, 1991: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5680-5684.
- Severinghaus, J. W., 1998: Hans Loeschcke, Robert Mitchell and the medullary CO₂ chemoreceptors: a brief historical review. *Respir Physiol*, **114**, 17-24.
- Severinghaus, J. W., Mitchell, R.A., 1962: Ondine's curse - failure of respiratory center automaticity while awake. *J. Clin. Res.*
- Severson, C. A., W. Wang, V. A. Pieribone, C. I. Dohle and G. B. Richerson, 2003: Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. *Nat. Neurosci*, **6**, 1139-1140.
- Shahar, E., S. Redline, T. Young, L. L. Boland, C. M. Baldwin, F. J. Nieto, G. T. O'Connor, D. M. Rapoport and J. A. Robbins, 2003: Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **167**, 1186-1192.
- Shanley, L. J., A. J. Irving and J. Harvey, 2001: Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci*, **21**, RC186.
- Shannon, D. C., K. Sullivan, L. Perret and D. H. Kelly, 1983: Use of almitrine bismesylate to stimulate ventilation in congenital central hypoventilation. *Eur J Respir Dis Suppl*, **126**, 295-301.
- Shao, X. M. and J. L. Feldman, 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, S. A., 1997: Life without ventilatory chemosensitivity. *Respir. Physiol*, **110**, 199-210.
- Sheng, M. and M. E. Greenberg, 1990: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**, 477-485.
- Sheng, M. and M. J. Kim, 2002: Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, **298**, 776-780.
- Sheng, M., G. McFadden and M. E. Greenberg, 1990: Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*, **4**, 571-582.
- Shimura, R., K. Tatsumi, A. Nakamura, Y. Kasahara, N. Tanabe, Y. Takiguchi and T. Kuriyama, 2005: Fat accumulation, leptin, and hypercapnia in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest*, **127**, 543-549.
- Shughrue, P. J. and I. Merchenthaler, 2001: Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **436**, 64-81.
- Sieghart, W., J. Ramerstorfer, I. Sarto-Jackson, Z. Varagic and M. Ernst, 2012: A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha(+) beta(-) interface. *Br J Pharmacol*, **166**, 476-485.

- Sieghart, W. and G. Sperk, 2002: Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem*, **2**, 795-816.
- Signore, A. P., F. Zhang, Z. Weng, Y. Gao and J. Chen, 2008: Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem*, **106**, 1977-1990.
- Silva, C. A., M. C. Vicente, L. Tenorio-Lopes, J. Soliz and L. H. Gargaglioni, 2017: Erythropoietin in the Locus coeruleus attenuates the ventilatory response to CO₂ in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, **236**, 11-18.
- Silva, M., D. Grillot, A. Benito, C. Richard, G. Nunez and J. L. Fernandez-Luna, 1996: Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*, **88**, 1576-1582.
- Silverthorn, D., 2007: *Physiologie humaine*.
- Simakajornboon, N., V. Vlastic, H. Li and H. Sawnani, 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., B. Fleury, S. Launois, H. P. Cathala, P. Bouche and J. P. Derenne, 1989: Cervical magnetic stimulation: a new painless method for bilateral phrenic nerve stimulation in conscious humans. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **67**, 1311-1318.
- Similowski, T., C. Straus, A. Duguet, I. Arnulf and J. P. Derenne, 1996: *Contrôle de la respiration*.
- Sinha, M. K., I. Opentanova, J. P. Ohannesian, J. W. Kolaczynski, M. L. Heiman, J. Hale, G. W. Becker, R. R. Bowsher, T. W. Stephens and J. F. Caro, 1996: Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*, **98**, 1277-1282.
- Siren, A. L., M. Fratelli, M. Brines, C. Goemans, S. Casagrande, P. Lewczuk, S. Keenan, C. Gleiter, C. Pasquali, A. Capobianco, T. Mennini, R. Heumann, A. Cerami, H. Ehrenreich and P. Ghezzi, 2001: Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4044-4049.
- Sirois, J. E., Q. Lei, E. M. Talley, C. Lynch, 3rd and D. A. Bayliss, 2000: The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci*, **20**, 6347-6354.
- Sitaraman, S., X. Liu, L. Charrier, L. H. Gu, T. R. Ziegler, A. Gewirtz and D. Merlin, 2004: Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J*, **18**, 696-698.
- Sitruk-Ware, R., 2004a: New progestogens: a review of their effects in perimenopausal and postmenopausal women. *Drugs Aging*, **21**, 865-883.
- Sitruk-Ware, R., 2004b: Pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, **47**, 277-283.
- Sitruk-Ware, R., 2008: Pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, **61**, 151-157.
- Skatrud, J. B., J. A. Dempsey and D. G. Kaiser, 1978a: Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. *J. Appl. Physiol Respir. Environ. Exerc. Physiol*, **44**, 939-944.
- Skatrud, J. B., J. A. Dempsey and D. G. Kaiser, 1978b: Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, **44**, 939-944.
- Slatkowska, L., D. Jensen, G. A. Davies and L. A. Wolfe, 2006: Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. *Respir. Physiol Neurobiol*, **154**, 379-388.
- Sluka, K. A., J. Danielson, L. Rasmussen and L. F. DaSilva, 2012: Exercise-induced pain requires NMDA receptor activation in the medullary raphe nuclei. *Med. Sci. Sports Exerc*, **44**, 420-427.
- Smart, T. G. and P. Paoletti, 2012: Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, J. De Johnston, E. D. Lancey, S. G. Hassink and V. L. Funanage, 1998: Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1810-1813.
- Smith, C. A., G. M. Blain, K. S. Henderson and J. A. Dempsey, 2015: Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂ : role of carotid body CO₂. *J Physiol*, **593**, 4225-4243.
- Smith, C. A., H. V. Forster, G. M. Blain and J. A. Dempsey, 2010: An interdependent model of central/peripheral chemoreception: evidence and implications for ventilatory control. *Respir Physiol Neurobiol*, **173**, 288-297.

- Smith, J. C., A. P. Abdala, H. Koizumi, I. A. Rybak and J. F. Paton, 2007: Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol*, **98**, 3370-3387.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, I. A. Rybak and J. F. Paton, 2009: Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**, 2577-2587.
- Smith, J. C., R. J. Butera, N. Koshiya, N. C. Del, C. G. Wilson and S. M. Johnson, 2000: Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respir.Physiol*, **122**, 131-147.
- Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter and J. L. Feldman, 1991: Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, **254**, 726-729.
- Smith, J. C., J. J. Greer, G. S. Liu and J. L. Feldman, 1990: Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol*, **64**, 1149-1169.
- Smith, J. C., D. E. Morrison, H. H. Ellenberger, M. R. Otto and J. L. Feldman, 1989: Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J. Comp Neurol*, **281**, 69-96.
- Smith, J. L., B. R. Kupchak, I. Garitaonandia, L. K. Hoang, A. S. Maina, L. M. Regalla and T. J. Lyons, 2008: Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*, **73**, 1160-1173.
- Smith, K. J., A. J. Bleyer, W. C. Little and D. C. Sane, 2003: The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res*, **59**, 538-548.
- Snyder, B., B. Shell, J. T. Cunningham and R. L. Cunningham, 2017: Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration. *Physiol Rep*, **5**.
- Sobhani, I., A. Bado, C. Vissuzaine, M. Buyse, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, S. Attoub, T. Lehy, D. Henin, M. Mignon and M. J. Lewin, 2000: Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, **47**, 178-183.
- Sola, A., M. Rogido, B. H. Lee, T. Genetta and T. C. Wen, 2005: Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res*, **57**, 481-487.
- Soliz, J., M. Gassmann and V. Joseph, 2007a: Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol*, **583**, 329-336.
- Soliz, J., V. Joseph, C. Soulage, C. Becskei, J. Vogel, J. M. Pequignot, O. Ogunshola and M. Gassmann, 2005: Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J Physiol*, **568**, 559-571.
- Soliz, J., C. Soulage, D. M. Hermann and M. Gassmann, 2007b: Acute and chronic exposure to hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice overexpressing erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**, R1702-1710.
- Soliz, J., J. J. Thomsen, C. Soulage, C. Lundby and M. Gassmann, 2009: Sex-dependent regulation of hypoxic ventilation in mice and humans is mediated by erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R1837-1846.
- Solomon, I. C., N. H. Edelman and M. H. O'Neal, 3rd, 2000: CO₂/H⁺ chemoreception in the cat pre-Botzinger complex in vivo. *J Appl Physiol (1985)*, **88**, 1996-2007.
- Song, M. and R. O. Messing, 2005: Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol. Life Sci*, **62**, 119-127.
- Soulier, V., C. Gestreau, N. Borghini, Y. Dalmaz, J. M. Cottet-Emard and J. M. Pequignot, 1997: Peripheral chemosensitivity and central integration: neuroplasticity of catecholaminergic cells under hypoxia. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, **118**, 1-7.
- Souma, T., N. Suzuki and M. Yamamoto, 2015: Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front Physiol*, **6**, 167.
- Sovik, S. and K. Lossius, 2004: Development of ventilatory response to transient hypercapnia and hypercapnic hypoxia in term infants. *Pediatr Res*, **55**, 302-309.

- Spyer, K. M., N. Dale and A. V. Gourine, 2004: ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp. Physiol*, **89**, 53-59.
- Sritippayawan, S., R. Hamutcu, S. S. Kun, Z. Ner, M. Ponce and T. G. Keens, 2002: Mother-daughter transmission of congenital central hypoventilation syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **166**, 367-369.
- Stamp, J. A. and K. Semba, 1995: Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res*, **677**, 39-49.
- Start, R. D., C. M. Layton, S. S. Cross and J. H. Smith, 1992: Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol*, **45**, 1120-1121.
- Stastna, E., H. Chodounska, V. Pouzar, V. Kapras, J. Borovska, O. Cais and L. Vyklicky, 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, H. W. and R. Nieuwenhuys, 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 significance 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, R. L. and P. G. Guyenet, 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, R. L., T. S. Moreira, A. C. Takakura, B. J. Kang, D. A. Chang, G. H. West, J. F. Brunet, D. K. Mulkey, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet, 2006: Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J. Neurosci*, **26**, 10305-10314.
- Stornetta, R. L., D. L. Rosin, J. R. Simmons, T. J. McQuiston, N. Vujovic, M. C. Weston and P. G. Guyenet, 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, R. L., D. L. Rosin, H. Wang, C. P. Sevigny, M. C. Weston and P. G. Guyenet, 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.
- Straus, C., 2005: [How is respiratory muscle function controlled?]. *Rev Mal Respir*, **22**, 2S19-28.
- Straus, C. and M. N. Fiamma, 2009: Contrôle de la ventilation. In: F. M. Sciences (ed.), *Traité de pneumologie*.
- Straus, C., Z. Samara, M. N. Fiamma, N. Bautin, A. Ranohavimparany, P. Le Coz, J. L. Golmard, P. Darre, M. Zelter, C. S. Poon and T. Similowski, 2011: Effects of maturation and acidosis on the chaos-like complexity of the neural respiratory output in the isolated brainstem of the tadpole, *Rana esculenta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**, R1163-1174.
- Straus, C., H. Trang, M. H. Becquemin, P. Touraine and T. Similowski, 2010: Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. *Respir. Physiol Neurobiol*, **171**, 171-174.
- Stunden, C. E., J. A. Filosa, A. J. Garcia, J. B. Dean and R. W. Putnam, 2001: Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir. Physiol*, **127**, 135-155.
- Su, T. P., E. D. London and J. H. Jaffe, 1988: Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science*, **240**, 219-221.
- Suzue, T., 1984: Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol*, **354**, 173-183.
- Suzuki, N., 2015: Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J Exp Med*, **235**, 233-240.
- Suzuki, N., I. Hirano, X. Pan, N. Minegishi and M. Yamamoto, 2013: Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nat Commun*, **4**, 2902.
- Suzuki, N., N. Obara, X. Pan, M. Watanabe, K. Jishage, N. Minegishi and M. Yamamoto, 2011: Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Mol Cell Biol*, **31**, 3896-3905.

- Suzuki, N., N. Obara and M. Yamamoto, 2007: Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Methods Enzymol*, **435**, 157-177.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, E. Colombari, G. H. West, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet, 2006a: Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J. Physiol*, **572**, 503-523.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, E. Colombari, G. H. West, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet, 2006b: Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats 5. *J Physiol*, **572**, 503-523.
- Talley, E. M., J. E. Sirois, Q. Lei and D. A. Bayliss, 2003: Two-pore-Domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist*, **9**, 46-56.
- Tan, C. C., K. U. Eckardt, J. D. Firth and P. J. Ratcliffe, 1992: Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*, **263**, F474-481.
- Tan, W., W. A. Janczewski, P. Yang, X. M. Shao, E. M. Callaway and J. L. Feldman, 2008: Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat. Neurosci*, **11**, 538-540.
- Tan, W., D. Sherman, J. Turesson, X. M. Shao, W. A. Janczewski and J. L. Feldman, 2012: Reelin demarcates a subset of pre-Botzinger complex neurons in adult rat. *J. Comp Neurol*, **520**, 606-619.
- Tang, Y. T., T. Hu, M. Arterburn, B. Boyle, J. M. Bright, P. C. Emtage and W. D. Funk, 2005: PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J. Mol. Evol*, **61**, 372-380.
- Tankersley, C., S. Kleeberger, B. Russ, A. Schwartz and P. Smith, 1996: Modified control of breathing in genetically obese (ob/ob) mice. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **81**, 716-723.
- Tankersley, C. G., M. A. Haxhiu and E. B. Gauda, 2002: Differential CO₂-induced c-fos gene expression in the nucleus tractus solitarii of inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **92**, 1277-1284.
- Tankersley, C. G., C. O'Donnell, M. J. Daood, J. F. Watchko, W. Mitzner, A. Schwartz and P. Smith, 1998: Leptin attenuates respiratory complications associated with the obese phenotype. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **85**, 2261-2269.
- Taouis, M., J. W. Chen, C. Daviaud, J. Dupont, M. Derouet and J. Simon, 1998: Cloning the chicken leptin gene. *Gene*, **208**, 239-242.
- Taraborrelli, S., 2015: Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **94 Suppl 161**, 8-16.
- Taraviras, S., T. Olli-Lahdesmaki, A. Lymperopoulos, D. Charitonidou, M. Mavroidis, J. Kallio, M. Scheinin and C. Flordellis, 2002: Subtype-specific neuronal differentiation of PC12 cells transfected with alpha2-adrenergic receptors. *Eur J Cell Biol*, **81**, 363-374.
- Tartaglia, L. A., 1997: The leptin receptor. *J Biol Chem*, **272**, 6093-6096.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe and R. I. Tepper, 1995: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, **83**, 1263-1271.
- Tatsumi, K., 1999: [Effects of female hormones on respiratory and cardiovascular regulation]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, **37**, 359-367.
- Tatsumi, K., M. Mikami, T. Kuriyama and Y. Fukuda, 1991: Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. *J. Appl. Physiol (1985.)*, **71**, 37-42.
- Taylor, N. C., A. Li and E. E. Nattie, 2005: Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J Physiol*, **566**, 543-557.
- Teng, L., C. Kou, C. Lu, J. Xu, J. Xie, J. Lu, Y. Liu, Z. Wang and D. Wang, 2014: Involvement of the ERK pathway in the protective effects of glycyrrhizic acid against the MPP⁺-induced apoptosis of dopaminergic neuronal cells. *Int J Mol Med*, **34**, 742-748.
- Teng, R., O. Gavrilova, N. Suzuki, T. Chanturiya, D. Schimel, L. Hugendubler, S. Mammen, D. R. Yver, S. W. Cushman, E. Mueller, M. Yamamoto, L. L. Hsu and C. T. Noguchi, 2011: Disrupted erythropoietin

- signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. *Nat Commun*, **2**, 520.
- Tenney, S. M. and L. C. Ou, 1977: Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO₂. *Respir Physiol*, **29**, 81-92.
- Teppema, L. J., A. Berkenbosch, J. G. Veening and C. N. Olivier, 1994: Hypercapnia induces c-fos expression in neurons of retrotrapezoid nucleus in cats. *Brain Res*, **635**, 353-356.
- Teppema, L. J. and A. Dahan, 2010: The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev*, **90**, 675-754.
- Teppema, L. J., J. G. Veening, A. Kranenburg, A. Dahan, A. Berkenbosch and C. Olivier, 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.
- Ter Horst, G. J., B. P. de, P. G. Luiten and J. D. van Willigen, 1989: Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*, **31**, 785-797.
- Teran, F. A., C. A. Massey and G. B. Richerson, 2014: Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: where are we now? *Progress in Brain Research*, **209**, 207-233.
- Thoby-Brisson, M., B. Cauli, J. Champagnat, G. Fortin and D. M. Katz, 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., M. Karlen, N. Wu, P. Charnay, J. Champagnat and G. Fortin, 2009: Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex. *Nat. Neurosci.*, **12**, 1028-1035.
- Thoby-Brisson, M. and J. M. Ramirez, 2001: Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol.*, **86**, 104-112.
- Thoby-Brisson, M., J. B. Trinh, J. Champagnat and G. Fortin, 2005: Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J Neurosci*, **25**, 4307-4318.
- Thomas, A. J., R. P. Nockels, H. Q. Pan, C. I. Shaffrey and M. Chopp, 1999: Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*, **24**, 2134-2138.
- Thomas, C. G., J. J. Krupp, E. E. Bagley, R. Bauzon, S. F. Heinemann, B. Vissel and G. L. Westbrook, 2006: Probing N-methyl-D-aspartate receptor desensitization with the substituted-cysteine accessibility method. *Mol. Pharmacol*, **69**, 1296-1303.
- Thomas, P., 2008: Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol*, **29**, 292-312.
- Thomas, P. and Y. Pang, 2012: Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*, **96**, 162-171.
- Thomas, P., Y. Pang and J. Dong, 2014: Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin 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., Y. Zhu and M. Pace, 2002: Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids*, **67**, 511-517.
- Thor, K. B. and C. J. Helke, 1989: Serotonin and substance P colocalization in medullary projections to the nucleus tractus solitarius: dual-colour immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *J. Chem. Neuroanat*, **2**, 139-148.
- Thornton, J. E., B. Nock, H. H. Feder and B. S. McEwen, 1989: Sex differences in cytosolic progesterin receptors in microdissected regions of the hypothalamus/preoptic area of guinea pigs. *Brain Res*, **503**, 253-257.
- Timmer, C. J., N. Srivastava, T. O. Dieben and A. F. Cohen, 1999: Bioavailability and bioequivalence of etonogestrel from two oral formulations of desogestrel: Cerazette and Liseta. *Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet*, **24**, 335-343.

- Timmers, H. J., W. Wieling, J. M. Karemaker and J. W. Lenders, 2003: Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol*, **553**, 3-11.
- Tiveron, M. C., M. R. Hirsch and J. F. Brunet, 1996: The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J Neurosci*, **16**, 7649-7660.
- Torrealba, F. and A. Claps, 1988a: The carotid sinus connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Res.*, **455**, 134-143.
- Torrealba, F. and A. Claps, 1988b: The vagal connection of the carotid sinus. *Neurosci.Lett.*, **93**, 186-190.
- Trang, H., S. Bouregda, I. Denjoy, M. Alia and M. Kabaker, 2003: 24-hour BP in children with congenital central hypoventilation syndrome. *Chest*, **124**, 1393-1399.
- Trang, H., J. F. Brunet, H. Rohrer, J. Gallego, J. Amiel, T. Bachetti, K. H. Fischbeck, T. Similowski, C. Straus, I. Ceccherini, D. E. Weese-Mayer, M. Frerick, K. Bieganska, L. Middleton, F. Morandi, G. Ottonello and C. European Central Hypoventilation Syndrome, 2014: Proceedings of the fourth international conference on central hypoventilation. *Orphanet J Rare Dis*, **9**, 194.
- Trang, H., M. Dehan, F. Beauvils, I. Zaccaria, J. Amiel and C. Gaultier, 2005: The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: general data, phenotype, and genotype. *Chest*, **127**, 72-79.
- Traynelis, S. F. and S. G. Cull-Candy, 1990: Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, **345**, 347-350.
- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine, 2010: Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev*, **62**, 405-496.
- Tree, K. C., P. M. Scotto di, J. Peyronnet and F. Cayetanot, 2014: In utero cannabinoid exposure alters breathing and the response to hypoxia in newborn mice. *Eur. J. Neurosci*.
- Trochet, D., S. J. Hong, J. K. Lim, J. F. Brunet, A. Munnich, K. S. Kim, S. Lyonnet, C. Goridis and J. Amiel, 2005: Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum. Mol. Genet*, **14**, 3697-3708.
- Tsai, P. T., J. J. Ohab, N. Kertesz, M. Groszer, C. Matter, J. Gao, X. Liu, H. Wu and S. T. Carmichael, 2006: A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, **26**, 1269-1274.
- Tsuchiya, T., H. Shimizu, T. Horie and M. Mori, 1999: Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol*, **365**, 273-279.
- Tu, H., A. J. Kastin, H. Hsueh and W. Pan, 2008: Soluble receptor inhibits leptin transport. *J Cell Physiol*, **214**, 301-305.
- Ulrich-Lai, Y. M., S. Fulton, M. Wilson, G. Petrovich and L. Rinaman, 2015: Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*, **18**, 381-399.
- Ur, E., D. A. Wilkinson, B. A. Morash and M. Wilkinson, 2002: Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. *Neuroendocrinology*, **75**, 264-272.
- Vairano, M., C. Dello Russo, G. Pozzoli, A. Battaglia, G. Scambia, G. Tringali, M. A. Aloe-Spiriti, P. Preziosi and P. Navarra, 2002: Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci*, **16**, 584-592.
- Valera, S., M. Ballivet and D. Bertrand, 1992: Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **89**, 9949-9953.
- Valerio, A., V. Ghisi, M. Dossena, C. Tonello, A. Giordano, A. Frontini, M. Ferrario, M. Pizzi, P. Spano, M. O. Carruba and E. Nisoli, 2006: Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*, **281**, 12950-12958.
- van den Top, M., K. Lee, A. D. Whyment, A. M. Blanks and D. Spanswick, 2004: Orexin-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci*, **7**, 493-494.
- van Dielen, F. M., C. van 't Veer, W. A. Buurman and J. W. Greve, 2002: Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1708-1716.

- Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader and H. R. Davis, Jr., 1997: Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest*, **99**, 385-390.
- Vanderlaan, M., C. R. Holbrook, M. Wang, A. Tuell and D. Gozal, 2004: Epidemiologic survey of 196 patients with congenital central hypoventilation syndrome. *Pediatr. Pulmonol*, **37**, 217-229.
- Vauthier, V., C. Derviaux, N. Douayry, T. Roux, E. Trinquet, R. Jockers and J. Dam, 2013: Design and validation of a homogeneous time-resolved fluorescence-based leptin receptor binding assay. *Anal Biochem*, **436**, 1-9.
- Veasey, S. C., C. A. Fornal, C. W. Metzler and B. L. Jacobs, 1995: Response of serotonergic caudal raphe neurons in relation to specific motor activities in freely moving cats. *J Neurosci*, **15**, 5346-5359.
- Veasey, S. C., C. A. Fornal, C. W. Metzler and B. L. Jacobs, 1997: Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. *Neuroscience*, **79**, 161-169.
- Venkatesha, S., M. Toporsian, C. Lam, J. Hanai, T. Mammoto, Y. M. Kim, Y. Bdolah, K. H. Lim, H. T. Yuan, T. A. Libermann, I. E. Stillman, D. Roberts, P. A. D'Amore, F. H. Epstein, F. W. Sellke, R. Romero, V. P. Sukhatme, M. Letarte and S. A. Karumanchi, 2006: Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, **12**, 642-649.
- Verhoeven, C. H., S. F. Krebbers, G. N. Wagenaars and R. M. Vos, 1998: In vitro and in vivo metabolism of desogestrel in several species. *Drug Metab Dispos*, **26**, 927-936.
- Vertes, R. P. and A. M. Crane, 1996: Descending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: Phaseolus vulgaris leucoagglutinin analysis in the rat. *J. Comp Neurol*, **374**, 607-631.
- Vettor, R., G. De Pergola, C. Pagano, P. Englaro, E. Laudadio, F. Giorgino, W. F. Blum, R. Giorgino and G. Federspil, 1997: Gender differences in serum leptin in obese people: relationships with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest*, **27**, 1016-1024.
- Vibert, J. F., D. Caille, F. Bertrand, H. Gromysz and A. Hugelin, 1979: Ascending projection from the respiratory centre to mesencephalon and diencephalon. *Neurosci. Lett*, **11**, 29-33.
- Vicente, M. C., M. B. Dias, E. M. Fonseca, K. C. Bicego and L. H. Gargaglioni, 2016: Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO₂ ventilatory response. *Pflugers Arch*, **468**, 763-774.
- Viemari, J. C., 2008: Noradrenergic modulation of the respiratory neural network. *Respir. Physiol Neurobiol*, **164**, 123-130.
- Viemari, J. C., M. Bevingut, H. Burnet, P. Coulon, J. M. Pequignot, M. C. Tiveron and G. Hilaire, 2004a: Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J. Neurosci*, **24**, 928-937.
- Viemari, J. C., M. Bevingut, P. Coulon and G. Hilaire, 2004b: Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. *J Neurophysiol.*, **91**, 746-758.
- Viemari, J. C., H. Burnet, M. Bevingut and G. Hilaire, 2003: Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Neurosci*, **17**, 1233-1244.
- Viemari, J. C., G. Maussion, M. Bevingut, H. Burnet, J. M. Pequignot, V. Nepote, V. Pachnis, M. Simonneau and G. Hilaire, 2005: Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *Eur. J. Neurosci*, **22**, 2403-2412.
- Villafuerte, F. C., J. L. Macarlupu, C. Anza-Ramirez, D. Corrales-Melgar, G. Vizcardo-Galindo, N. Corante and F. Leon-Velarde, 2014: Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-altitude excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol (1985)*, **117**, 1356-1362.
- Vizek, M., C. K. Pickett and J. V. Weil, 1987: Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin. *J. Appl. Physiol*, **63**, 1658-1664.
- Vogel, J. and M. Gassmann, 2011: Erythropoietic and non-erythropoietic functions of erythropoietin in mouse models. *J Physiol*, **589**, 1259-1264.
- Voituron, N., A. Frugiere, J. Champagnat and L. Bodineau, 2006: Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. *J. Physiol*, **577**, 55-68.
- Voituron, N., A. Frugiere, F. Gros, J. M. Macron and L. Bodineau, 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., A. Frugiere, L. C. Mc Kay, R. Romero-Granados, E. Dominguez-Del-Toro, F. Saadani-Makki, J. Champagnat and L. Bodineau, 2011: The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience*, **194**, 95-111.
- Voituron, N., F. Jeton, Y. Cholley, R. E. Hasnaoui-Saadani, D. Marchant, P. Quidu, F. Favret, J. P. Richalet and A. Pichon, 2014: Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep*, **2**, e00223.
- Von Euler, C., 1986: Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In: N. S. Cherniack and J. G. Widdicombe (eds.), *Handbook of physiology, the respiratory system. Volume 2: Control of breathing*. Am. Physiol. Soc.
- Von Euler, U. S. and B. Pernow, 1956: Neurotropic effects of substance P. *Acta Physiol Scand*, **36**, 265-275.
- Wabitsch, M., W. F. Blum, R. Muche, M. Braun, F. Hube, W. Rascher, E. Heinze, W. Teller and H. Hauner, 1997: Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest*, **100**, 808-813.
- Wakai, J., D. Takamura, R. Morinaga, N. Nakamuta and Y. Yamamoto, 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, T. G., 1991: Posterior hypothalamic modulation of the respiratory response to CO₂ in cats. *Pflugers Arch.*, **418**, 7-13.
- Waldrop, T. G., D. C. Mullins and M. C. Henderson, 1986: Effects of hypothalamic lesions on the cardiorespiratory responses to muscular contraction. *Respir. Physiol*, **66**, 215-224.
- Waldrop, T. G. and J. P. Porter, 1995: Hypothalamic involvement in respiratory and cardiovascular regulation. In: J. A. Dempsey and A. I. Pack (eds.), *Regulation of breathing*. Marcel Dekker, New York.
- Waldvogel, H. J. and R. L. Faull, 2015: The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol*, **73**, 223-264.
- Walker, D. W., 1995: Hypoxic inhibition of breathing and motor activity in the foetus and newborn. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **22**, 533-536.
- Walker, D. W., B. Lee and I. Nitsos, 2000: Effect of hypoxia on respiratory activity in the foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **27**, 110-113.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza, 1993: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, **268**, 21513-21518.
- Wang, H., R. L. Stornetta, D. L. Rosin and P. G. Guyenet, 2001a: Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J. Comp Neurol*, **434**, 128-146.
- Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai and L. Rossetti, 1998a: A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, **393**, 684-688.
- Wang, L., M. Chopp, S. R. Gregg, R. L. Zhang, H. Teng, A. Jiang, Y. Feng and Z. G. Zhang, 2008: Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J Cereb Blood Flow Metab*, **28**, 1361-1368.
- Wang, L., L. Di and C. T. Noguchi, 2014: Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system. *Int J Biol Sci*, **10**, 921-939.
- Wang, L., R. Teng, L. Di, H. Rogers, H. Wu, J. B. Kopp and C. T. Noguchi, 2013a: PPARalpha and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. *Diabetes*, **62**, 4122-4131.
- Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard and R. H. Unger, 1996: A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett*, **392**, 87-90.
- Wang, S., N. Benamer, S. Zanella, N. N. Kumar, Y. Shi, M. Bevorgut, D. Penton, P. G. Guyenet, F. Lesage, C. Gestreau, J. Barhanin and D. A. Bayliss, 2013b: TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J. Neurosci*, **33**, 16033-16044.
- Wang, S., Y. Shi, S. Shu, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss, 2013c: Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci*, **33**, 7756-7761.

- Wang, W., J. H. Pizzonia and G. B. Richerson, 1998b: Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. *J. Physiol*, **511 (Pt 2)**, 433-450.
- Wang, W. and G. B. Richerson, 1999: Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience*, **90**, 1001-1011.
- Wang, W., J. K. Tiwari, S. R. Bradley, R. V. Zaykin and G. B. Richerson, 2001b: Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. *J. Neurophysiol*, **85**, 2224-2235.
- Washburn, C. P., D. A. Bayliss and P. G. Guyenet, 2003: Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir Physiol Neurobiol*, **138**, 19-35.
- Washburn, C. P., J. E. Sirois, E. M. Talley, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss, 2002: Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *J Neurosci*, **22**, 1256-1265.
- Watanabe, D., K. Suzuma, S. Matsui, M. Kurimoto, J. Kiryu, M. Kita, I. Suzuma, H. Ohashi, T. Ojima, T. Murakami, T. Kobayashi, S. Masuda, M. Nagao, N. Yoshimura and H. Takagi, 2005: Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, **353**, 782-792.
- Watanabe, M., Y. Inoue, K. Sakimura and M. Mishina, 1993: Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol*, **338**, 377-390.
- Watkins, J. C. and R. H. Evans, 1981: Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **21**, 165-204.
- Watson, S., P. Gallagher, R. J. Porter, M. S. Smith, L. J. Herron, S. Bulmer, G. North-East Mood Disorders Clinical Research, A. H. Young and I. N. Ferrier, 2012: A randomized trial to examine the effect of mifepristone on neuropsychological performance and mood in patients with bipolar depression. *Biol Psychiatry*, **72**, 943-949.
- Weaver, C. E., M. B. Land, R. H. Purdy, K. G. Richards, T. T. Gibbs and D. H. Farb, 2000: Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca²⁺ accumulation and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **293**, 747-754.
- Webb, T. I. and J. W. Lynch, 2007: Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des*, **13**, 2350-2367.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis, I. Ceccherini, T. G. Keens, D. A. Loghmanee and H. Trang, 2010: An official ATS clinical policy statement: Congenital central hypoventilation syndrome: genetic basis, diagnosis, and management. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **181**, 626-644.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis and L. Zhou, 2005: Adult identified with congenital central hypoventilation syndrome--mutation in PHOX2b gene and late-onset CHS. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, **171**, 88.
- Weese-Mayer, D. E., E. M. Berry-Kravis, L. Zhou, B. S. Maher, J. M. Silvestri, M. E. Curran and M. L. Marazita, 2003: Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. *Am. J. Med. Genet. A*, **123A**, 267-278.
- Weese-Mayer, D. E., C. E. Hunt, R. T. Brouillette and J. M. Silvestri, 1992a: Diaphragm pacing in infants and children. *J. Pediatr*, **120**, 1-8.
- Weese-Mayer, D. E., J. M. Silvestri, L. J. Menzies, A. S. Morrow-Kenny, C. E. Hunt and S. A. Hauptman, 1992b: Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis, management, and long-term outcome in thirty-two children. *J. Pediatr*, **120**, 381-387.
- Weesner, K. M. and R. J. Boyle, 1985: Successful management of central sleep hypoventilation in an infant using enteral doxapram. *J Pediatr*, **106**, 513-515.
- Weitzenblum, E., R. Kessler, M. Canuet and A. Chaouat, 2008: [Obesity-hypoventilation syndrome]. *Rev Mal Respir*, **25**, 391-403.
- Wells, H. H., J. Kattwinkel and J. D. Morrow, 1980: Control of ventilation of Ondine's curse. *J Pediatr*, **96**, 865-867.
- Wen, D., J. P. Boissel, T. E. Tracy, R. H. Gruninger, L. S. Mulcahy, J. Czelusniak, M. Goodman and H. F. Bunn, 1993: Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, **82**, 1507-1516.

- Wen, D. X., Y. F. Xu, D. E. Mais, M. E. Goldman and D. P. McDonnell, 1994: The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell Biol*, **14**, 8356-8364.
- Wenger, R. H. and M. Gassmann, 1997: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem*, **378**, 609-616.
- Wenker, I. C., O. Kreneisz, A. Nishiyama and D. K. Mulkey, 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.
- West, J. B., 2014a: Joseph Priestley, oxygen, and the enlightenment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **306**, L111-119.
- West, J. B., 2014b: Robert Hooke: early respiratory physiologist, polymath, and mechanical genius. *Physiology (Bethesda)*, **29**, 222-233.
- Weston, M. C., R. L. Stornetta and P. G. Guyenet, 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, C. H., B. Hermann, C. Behl, E. Pestel, G. Rammes, W. Zieglgansberger, F. Holsboer and R. Rupprecht, 1998: Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol*, **12**, 1441-1451.
- White, D. P., N. J. Douglas, C. K. Pickett, J. V. Weil and C. W. Zwillich, 1983: Sexual influence on the control of breathing. *J. Appl. Physiol Respir. Environ. Exerc. Physiol*, **54**, 874-879.
- Whitelaw, W. A. and J. P. Derenne, 1993: Airway occlusion pressure. *J Appl Physiol (1985)*, **74**, 1475-1483.
- Whiting, P. J., 2003: The GABAA receptor gene family: new opportunities for drug development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel*, **6**, 648-657.
- Wiegratz, I. and H. Kuhl, 2004: Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 277-285.
- Wiessner, C., P. R. Allegrini, D. EkatoDRAMIS, U. R. Jewell, T. Stallmach and M. Gassmann, 2001: Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 857-864.
- Willam, C., C. Warnecke, J. C. Schefold, J. Kugler, P. Koehne, U. Frei, M. Wiesener and K. U. Eckardt, 2006: Inconsistent effects of acidosis on HIF-alpha protein and its target genes. *Pflugers Arch*, **451**, 534-543.
- Winocur, G., C. E. Greenwood, G. G. Piroli, C. A. Grillo, L. R. Reznikov, L. P. Reagan and B. S. McEwen, 2005: Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci*, **119**, 1389-1395.
- Wisden, W., D. J. Laurie, H. Monyer and P. H. Seeburg, 1992: The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci*, **12**, 1040-1062.
- Witthuhn, B. A., F. W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura and J. N. Ihle, 1993: JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, **74**, 227-236.
- Wohlfarth, K. M., M. T. Bianchi and R. L. Macdonald, 2002: Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J. Neurosci*, **22**, 1541-1549.
- Wollmuth, L. P. and A. I. Sobolevsky, 2004: Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci*, **27**, 321-328.
- Wong-Riley, M. T., 1989: Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*, **12**, 94-101.
- Wong-Riley, M. T., Q. Liu and X. P. Gao, 2013: Peripheral-central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol*, **185**, 156-169.
- Woo, M. S., M. A. Woo, D. Gozal, M. T. Jansen, T. G. Keens and R. M. Harper, 1992: Heart rate variability in congenital central hypoventilation syndrome. *Pediatr. Res*, **31**, 291-296.
- Woodruff, M. L., R. H. Baisden, D. L. Whittington and J. E. Kelly, 1986: Inputs to the pontine A5 noradrenergic cell group: a horseradish peroxidase study. *Exp Neurol*, **94**, 782-787.

- Wu, F. S., T. T. Gibbs and D. H. Farb, 1990: Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol. Pharmacol*, **37**, 597-602.
- Wu, F. S., T. T. Gibbs and D. H. Farb, 1991: Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol*, **40**, 333-336.
- Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch and H. F. Lodish, 1995: Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, **83**, 59-67.
- Wu, Z., M. Bidlingmaier, C. Liu, E. B. De Souza, M. Tschop, K. M. Morrison and C. J. Strasburger, 2002: Quantification of the soluble leptin receptor in human blood by ligand-mediated immunofunctional assay. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 2931-2939.
- Xenocostas, A., W. K. Cheung, F. Farrell, C. Zakszewski, M. Kelley, A. Lutynski, M. Crump, J. H. Lipton, T. L. Kiss, C. Y. Lau and H. A. Messner, 2005: The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol*, **61**, 189-195.
- Xu, X., H. Dai and Y. Shi, 2009: Erythropoietin protects primary cultures of rat cortical neurons from hypoxia-induced toxicity through attenuating both glutamate release and NMDA receptor evoked neurotoxicity pathway. *Pharmazie*, **64**, 210-213.
- Xue, B. and M. Hay, 2003: 17beta-estradiol inhibits excitatory amino acid-induced activity of neurons of the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, **976**, 41-52.
- Yalcin, M., F. Ak, I. T. Cangul and M. Erturk, 2007: The effect of centrally administered erythropoietin on cardiovascular and respiratory system of anaesthetized rats. *Auton Neurosci*, **134**, 1-7.
- Yamamoto, K. K., G. A. Gonzalez, W. H. Biggs, 3rd and M. R. Montminy, 1988: Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, **334**, 494-498.
- Yamashita, T., T. Murakami, S. Otani, M. Kuwajima and K. Shima, 1998: Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 752-759.
- Yamazaki, S., T. Souma, I. Hirano, X. Pan, N. Minegishi, N. Suzuki and M. Yamamoto, 2013: A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat Commun*, **4**, 1950.
- Yang, J. J., Y. C. Chou, M. T. Lin and T. H. Chiu, 1997: Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in rat locus coeruleus neurons. *Life Sci*, **61**, 1763-1773.
- Yao, Q., H. Pho, J. Kirkness, E. E. Ladenheim, S. Bi, T. H. Moran, D. D. Fuller, A. R. Schwartz and V. Y. Polotsky, 2016: Localizing Effects of Leptin on Upper Airway and Respiratory Control during Sleep. *Sleep*, **39**, 1097-1106.
- Yee, B. J., J. Cheung, P. Phipps, D. Banerjee, A. J. Piper and R. R. Grunstein, 2006: Treatment of obesity hypoventilation syndrome and serum leptin. *Respiration*, **73**, 209-212.
- Yeh, E. R., B. Erokwu, J. C. LaManna and M. A. Haxhiu, 1997: The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci.Lett.*, **232**, 63-66.
- Yet, M. G. and S. S. Jones, 1993: The extracytoplasmic domain of the erythropoietin receptor forms a monomeric complex with erythropoietin. *Blood*, **82**, 1713-1719.
- Yokota, S., S. Kaur, V. G. VanderHorst, C. B. Saper and N. L. Chamberlin, 2015: Respiratory-related outputs of glutamatergic, hypercapnia-responsive parabrachial neurons in mice. *J Comp Neurol*, **523**, 907-920.
- Yoshii, A. and M. Constantine-Paton, 2014: Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling. *Front Synaptic Neurosci*, **6**, 6.
- Yoshimura, A. and K. Arai, 1996: Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist*, **1**, 337-339.
- Yu, S. Y., G. M. Wang, H. Wang, H. Zhang and Q. Li, 2011: Raphe pallidus modulates Botzinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rats. *Eur. J. Neurosci*, **34**, 1113-1120.
- Yu, X., J. J. Shacka, J. B. Eells, C. Suarez-Quian, R. M. Przygodzki, B. Beleslin-Cokic, C. S. Lin, V. M. Nikodem, B. Hempstead, K. C. Flanders, F. Costantini and C. T. Noguchi, 2002: Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*, **129**, 505-516.
- Zafiriou, M. P., C. Noack, B. Unsold, M. Didie, E. Pavlova, H. J. Fischer, H. M. Reichardt, M. W. Bergmann, A. El-Armouche, W. H. Zimmermann and L. C. Zelarayan, 2014: Erythropoietin responsive cardiomyogenic cells contribute to heart repair post myocardial infarction. *Stem Cells*, **32**, 2480-2491.

-
- Zanella, S., J. C. Roux, J. C. Viemari and G. Hilaire, 2005: Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir. Physiol Neurobiol*.
- Zanella, S., J. C. Roux, J. C. Viemari and G. Hilaire, 2006: Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir. Physiol Neurobiol*, **153**, 126-138.
- Zanjani, E. D., J. L. Ascensao, P. B. McGlave, M. Banisadre and R. C. Ash, 1981: Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest*, **67**, 1183-1188.
- Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, L. M. Churgay, D. K. Clawson, R. D. DiMarchi, T. C. Furman, J. E. Hale, H. M. Hsiung, B. E. Schoner, D. P. Smith, X. Y. Zhang, J. P. Wery and R. W. Schevitz, 1997: Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, **387**, 206-209.
- Zhang, W., L. F. Hayward and P. W. Davenport, 2005: Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1338-1347.
- Zhang, X., Q. Zhang, J. Tu, Y. Zhu, F. Yang, B. Liu, D. Brann and R. Wang, 2015: Prosurvival NMDA 2A receptor signaling mediates postconditioning neuroprotection in the hippocampus. *Hippocampus*, **25**, 286-296.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman, 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425-432.
- Zhao, Z. Q., M. Scott, S. Chiechio, J. S. Wang, K. J. Renner, R. W. t. Gereau, R. L. Johnson, E. S. Deneris and Z. F. Chen, 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.
- Zhao, Z. Y., Y. R. Fu, X. H. Li, Y. Y. Li, A. Bogdan and Y. Touitou, 2002: Age-related modifications of circadian rhythm of serum leptin in healthy men. *Gerontology*, **48**, 309-314.
- Zheleznova, N. N., A. Sedelnikova and D. S. Weiss, 2009: Function and modulation of delta-containing GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology*, **34 Suppl 1**, S67-S73.
- Zheng, Y., J. C. Barillot and A. L. Bianchi, 1991: Patterns of membrane potentials and distributions of the medullary respiratory neurons in the decerebrate rat. *Brain Res*, **546**, 261-270.
- Zhu, Y., J. Bond and P. Thomas, 2003a: Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 2237-2242.
- Zhu, Y., C. D. Rice, Y. Pang, M. Pace and P. Thomas, 2003b: Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 2231-2236.
- Zuloaga, D. G., S. L. Yahn, Y. Pang, A. M. Quihuis, M. G. Oyola, A. Reyna, P. Thomas, R. J. Handa and S. K. Mani, 2012: Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor-beta in the female rat brain. *Endocrinology*, **153**, 4432-4443.
- Zwillich, C. W., M. R. Natalino, F. D. Sutton and J. V. Weil, 1978: Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. *J. Lab Clin. Med*, **92**, 262-269.
- Zwillich, C. W., F. D. Sutton, D. J. Pierson, E. M. Greagh and J. V. Weil, 1975: Decreased hypoxic ventilatory drive in the obesity-hypoventilation syndrome. *Am J Med*, **59**, 343-348.