

Régionalisation du tube neural et mise en place des circuits neuronaux: étude du réseau neuronal contrôlant le rythme respiratoire dans le tronc célébral de souris transgéniques.

Fabrice Chatonnet

▶ To cite this version:

Fabrice Chatonnet. Régionalisation du tube neural et mise en place des circuits neuronaux : étude du réseau neuronal contrôlant le rythme respiratoire dans le tronc célébral de souris transgéniques.. Neurobiologie. Université Paris XI, 2003. Français. NNT : . tel-02164688

HAL Id: tel-02164688 https://hal.science/tel-02164688

Submitted on 25 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

2003

2003PA11TO55

THÈSE

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

ÉCOLE DOCTORALE :

SIGNALISATIONS CELLULAIRES, ENDOCRINOLOGIE, REPRODUCTION

SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2003

par

Fabrice CHATONNET

Régionalisation du tube neural et mise en place des circuits neuronaux : étude du réseau neuronal contrôlant le rythme respiratoire dans le tronc cérébral de souris transgéniques.

Directeur de thèse : Dr Jean CHAMPAGNAT

JURY

M. Alain ProchiantzM. Armand BianchiM. Jean ChampagnatM. Pierre DrapeauMme Sylvie Schneider-Maunoury

Président Rapporteur Examinateur Examinateur Rapporteur

À Virginie À Éric et Françoise À Maurice Le travail présenté dans cette thèse a été effectué au sein du laboratoire Neurobiologie Génétique et Intégrative unité de l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, à Gif-sur-Yvette. Je tiens à remercier le directeur de cet institut, le Professeur Jean-Didier Vincent pour m'avoir permis d'y réaliser ce travail.

Je remercie de tout mon cœur le Docteur Jean Champagnat pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son encadrement pendant ces trois années de thèse et pour m'avoir communiqué son enthousiasme sans bornes pour la recherche mêlé de l'optimisme le plus inaltérable.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme le Professeur Micheline Misrahi pour m'avoir permis d'intégrer son École Doctorale, ainsi que Mme le Professeur Lemaire qui m'a autorisé à suivre sa formation doctorale. Je remercie sincèrement M. le Docteur Prochiantz qui a accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi que le M. le Professeur Bianchi et Mme le Docteur Schneider-Maunoury pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail en acceptant de le juger. Je remercie également M. le Professeur Pierre Drapeau qui a accepté de venir participer à ce jury.

Je remercie pour leur aide technique et leur assistance au long de cette thèse Eduardo Domínguez del Toro, l'andalou qui m'a beaucoup appris, Valérie Mézières-Robert, spécialiste ès rongeurs, Sandra Autran, l'as de la PCR, Laura Guimarães, ainsi que les nombreux étudiants qui sont venus au laboratoire partager notre labeur. Plus généralement, je remercie toute l'équipe de Neurobiologie Génétique et Intégrative – Groupe d'étude du tronc cérébral : É. Boudinot, M. Denavit-Saubié, G. Fortin, A.S. Foutz, I. Germon, H. McLean, A. Montreynault, C. Thaeron-Antónô, M. Thoby-Brisson, pour leur accueil, leur bonne humeur, leurs conseils avisés et leur soutien précieux tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier mes camarades thésards, C. Borday, O. Pascual, L. Wrobel qui sont la jeunesse et la fraîcheur du laboratoire et avec qui il est toujours agréable de prendre une pause ou de discuter science, sans compter les conseils bienvenus.

Je remercie sincèrement L. Bernard, V. Borday-Birraux, M. Boudinot, V. Lavallée, G. Levesque, A. Perignon, G. Sadoc, P. Villeneuve pour leur contribution au bon déroulement de ce travail.

Résumé	1
Liste des abréviations	2
INTRODUCTION	5
Introduction générale	6
Chapitre 1 : Le réseau neuronal respiratoire des mammifèr	es : des
groupes de neurones répartis au sein du tronc cérébral.	11
1. Les neurones respiratoires.	11
1.1 Identification des neurones respiratoires dans le tronc cérébra	l. 11
1.2 Propriétés membranaires et neurotransmetteurs des neurones	respiratoires. 15
2. Les groupes respiratoires pontiques.	20
2.1 Le groupe respiratoire pontique (PRG).	20
2.2 Le groupe respiratoire para-facial (pFRG).	22
3. Les centres respiratoires bulbaires.	22
3.1 Le groupe respiratoire dorsal (DRG) et les afférences sensorie	elles. 22
3.1.1 Le noyau du tractus solitaire.	23
3.1.2 Les afférences sensorielles d'origine pulmonaire.	24
3.1.3 Les afférences chémosensorielles : cellules chémoréc	eptrices
périphériques et neurones sensoriels afférents.	25
3.2 Le groupe respiratoire ventral (VRG)	27
3.2.1 Les neurones prémoteurs et la rythmogenèse respirat	oire. 27
3.2.2 Les chémorécepteurs centraux de la face ventrale.	29
3 2 3 Le novau rétrotranézoïde	31

régionalisé à un réseau neuronal cohérent.	35
1. Un exemple de régionalisation : la régionalisation dorso-ventrale et son contrôle.	36
2. Le rhombencéphale segmenté, une compartimentation anatomique.	39
2.1 La segmentation : une compartimentation anatomique du rhombencéphale.	41
2.2 La segmentation : la restriction de compartiments distincts.	43
2.3 La segmentation et les crêtes neurales, relations avec les arcs branchiaux.	44
3. Le contrôle moléculaire de la segmentation : acteurs et rôles.	45
3.1 Les gènes homéotiques HOM/C de la drosophile et leurs homologues	
vertébrés, les gènes <i>Hox</i> .	47
3.1.1 Participation des gènes du complexe HOM/C dans la segmentation	
embryonnaire de l'embryon de drosophile.	47
3.1.2 Rôles des gènes Hox dans les processus de segmentation chez les	
vertébrés.	48
3.1.3 Cas du gène Hoxa2.	49
3.1.3.1 Effets de la mutation Hoxa2.	50
3.1.3.2 Effets de la surexpression de Hoxa2.	51
3.2 Les régulateurs des gènes homéotiques.	51
3.2.1 Les autres facteurs de transcription.	52
Cas du facteur de transcription MafB/kreisler.	52

3.2.2 L'acide rétinoïque.	56
3.2.3 Autres systèmes de contrôle.	59
3.3 Modèle de mise en place de la segmentation : la formation des frontières	
$r_{3/r_{4}}$ et $r_{4/r_{5}}$.	59
3.4 Interactions de la segmentation et de la régionalisation dorso-ventrale.	60
4. La neurogenèse et les événements plus tardifs.	60
Chapitre 3 : Initiation et maturation de l'activité respiratoire du	
réseau embryonnaire à l'activité mature postnatale.	64
1. L'activité rythmogène embryonnaire du réseau neuronal du rhombencéphale.	64
1.1 Description des activités embryonnaires rythmiques enregistrées chez	
l'embryon de poulet et de souris.	64
1.2 La genèse des activités respiratoires de l'embryon est soumise à un contrôle	
segmentaire.	68
2. La maturation fœtale de la respiration.	72
2.1 Description de la respiration fœtale.	72
2.2 Maturation du contrôle respiratoire chémosensible.	74
2.3 La mise en place de l'inhibition noradrénergique.	75
2.4 Le système fœtal cholinergique.	75
3. La maturation post-natale de la respiration.	76
3.1 Caractéristiques de la respiration à la naissance.	76
3.1.1 In vivo.	76
3.1.2 In vitro.	78
3.2 Le développement postnatal des réflexes respiratoires.	79
3.3 L'évolution des propriétés neuronales, des transmissions et de la modulation	
synaptique.	81

MATÉRIEL ET MÉTHODES

ATÉRIEL ET MÉTHODES	84
1. Génotypage des animaux.	86
2. Enregistrements pléthysmographiques.	86
2.1 Pléthysmographie directe.	86
2.2 Pléthysmographie globale.	88
2.3 Calculs des paramètres respiratoires.	89
3. Tests comportementaux.	90
3.1 Température corporelle.	90
3.2 Test de mastication.	90
3.3 Test de retournement.	91
3.4 Test de rejet buccal.	91
3.5 Test de vocalisation.	91
4. Enregistrements électrophysiologiques de la respiration in vitro.	91
4.1 Dissection.	91
4.2 Enregistrements in vitro.	93
4.3 Applications de produits pharmacologiques.	94
5. Étude anatomique.	94
5.1 Perfusion.	94
5.2 Sections et marquages immunohistochimiques.	95
5.3 Reconstructions anatomiques.	96

RÉSULTATS Modifications du réssou respiratoire et de l'anotomie du trone cérébrel	97
chez des souris invalidées ou mutantes pour un gène.	98
Chapitre 1 Identification de l'origine rhombomérique d'un centre	
pontique anti-apnéique.	99
1. Introduction.	99
2. Souris transgeniques Hoxa2.	100
3 Les souris mutantes naturelles <i>kreisler</i> homozygotes	102
Publication 2	103 104
Chapitre 2 : Identification d'un nouveau type de perturbation du réseau	L
neuronal respiratoire chez un mutant hétérozygote.	105
Les souris mutantes naturelles <i>kreisler</i> hétérozygotes : un exemple de phénotype fonctionnel dans un contexte anatomo-pathologique normal.	105
Chapitre 3 : Comparaison des différentes mutations affectant la segmentation du tronc cérébral, et de leurs conséquences sur le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire. Les différentes mutations touchent des populations neuronales sélectives : l'aspect modulaire du réseau neuronal respiratoire. Publication 3	108 108 <i>109</i>
Chapitre 4 : Exemple de compensation fonctionnelle de troubles	110
Les souris invalidées pour le gène de l'acétyloholine estérase, une approche	110
transgénique d'un système neurotransmetteur vital pour le rythme respiratoire.	110
Publication 4	111
Chapitre 5 : Une approche pharmacologique de la segmentation du	
tronc cérébral : traitement des animaux par l'acide rétinoïque. <i>Publication 5</i>	112 114
Chapitre 6 : Du développement embryonnaire à la fonction	
pnysiologique : exemple de la region para-faciale et importance du contrôle néonatal par les opioïdes endogènes. <i>Publication 6</i>	115 <i>117</i>

DISCUSSION GÉNÉRALE	118
Discussion générale : Mise en place du réseau neuronal respiratoire :	
l'importance des mécanismes de segmentation.	120
1. Contrôle du comportement respiratoire pendant la première semaine postnatale	
par les systèmes neuronaux issus de r3/r4.	121
1.1 La fréquence respiratoire au repos.	121
1.2 La respiration apnéique.	122
1.2.1 Occurrence des apnées dans les différents contextes mutants.	122
1.2.2 Effets des neuromodulateurs opioïdes.	123
1.3 La respiration épisodique.	124
1.4 Le contrôle chémosensoriel.	125
1.5 Modification sélective du volume inspiratoire chez les mutants Hoxa2 ^{-/-} .	127
2. Deux ensembles neuronaux distincts contrôlent la rythmogenèse respiratoire à la	
naissance.	128
2.1 Le niveau para-facial.	129
2.2 Le niveau médullaire.	132
3. Des modifications légères du programme de segmentation entraînent des défauts	
permanents du comportement respiratoire.	136
3. 1 La plasticité neuronale limite les conséquences de l'invalidation du gène	
codant pour l'acétylcholine estérase.	136
3.2 Dose-dépendance des effets liés aux troubles développementaux.	137
4. La signalisation impliquée dans la mise en place des réseaux neuronaux rythmiqu	ies
au niveau r3/r4.	138
4.1 La re-spécification des territoires embryonnaires et ses conséquences.	138
4.2 Les perturbations des relations inter-rhombomériques.	140
5. Importance de l'étude des relations entre le développement du cerveau postérieur	et
la physiologie ventilatoire.	143
5.1 Implications cliniques de l'étude du développement du tronc cérébral.	143
5.2 Implications phylogénétiques et évolutives.	144
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	146
La segmentation embryonnaire du rhombencéphale établit un plan	
d'organisation fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire.	147
Etape 1. Mécanismes moléculaires fixant le devenir neuronal : le plan d'organisation	

Etape 2. Mise en marche des activités rythmogènes chez l'embryon : plasticité et

Etape 3. La respiration devient vitale à la naissance : la signification biologique des mécanismes de développement dépend de la fonction du circuit neuronal définitif.

148

149

151

153

fonctionnelle du réseau respiratoire.

BIBLIOGRAPHIE

déterminisme dans le réseau respiratoire.

Résumé

Notre but était de délimiter dans le rhombencéphale segmenté de l'embryon de souris, les territoires importants pour le maintien du comportement respiratoire à la naissance. Nous avons comparé les anomalies de ce comportement (hypoventilation, apnées, respiration épisodique) induites par modification du programme de segementation embryonnaire (invalidation des gènes *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Krox20*, mutation *kreisler*, traitement par l'acide rétinoïque). Nous avons identifié un domaire para-facial dérivé des rhombomères r3 et r4, d'où provient un système neuronal anti-apnéique (i) vital chez la souris pendant le premier jour postnatal, (ii) antagoniste des mécanismes enképhalinergiques déprimant la fréquence respiratoire, (iii) distinct du mécanisme rythmogène médullaire.

Des modifications même légères du programme de segmentation (mutation *kreisler* hétérozygote, acide rétinoïque administré à très faible dose) entraînent des défauts permanents du comportement respiratoire. Ces déficits fonctionnels d'origine segmentaire ne sont donc pas compensés par plasticité neuronale ou synaptique, comme nous l'avons observé, par exemple, après invalidation du gène de l'acétylcholine estérase.

En conclusion, nous subdivisons le générateur respiratoire en deux modules, l'un parafacial, l'autre médullaire, conformément à un plan d'organisation établi dès le début du stade embryonnaire de segmentation. L'oscillateur para-facial assurerait la stabilité et la régularité du rythme respiratoire néonatal, en relation avec la neuro-modulation opioïde au niveau du générateur médullaire.

Mots-clés : Tronc cérébral, segmentation embryonnaire, comportement respiratoire, souris nouveau-née, gènes *Hox, Krox20, kreisler*, acide rétinoïque.

Liste des abréviations

Développement.

BDNF : Brain derived neurotrophic factor BMP : Bone Morphogenetic Protein, protéine morphogénétique de l'os CRABP : cytoplasmic retinoic acid binding protein, protéine cytoplasmique de liaison à l'acide rétinoïque E0 – En : jours de développement embryonnaire FGF : fibroblast growth factor, facteur de croissance fibroblastique HH : stades de développement de l'embryon de poulet selon Hamburger et Hamilton NT-4 : neurotrophine 4 PO - Pn: premier $-(n+1)^e$ jour suivant la naissance p0, p1, p2, p3, pMN: domaines progéniteurs des interneurones V0, V1, V2, V3 et des motoneurones r1-r8 : rhombomères 1 à 8 RALDH : rétinaldéhyde deshydrogénase RAR : récepteur à l'acide rétinoïque RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque RXR : récepteur X aux rétinoïdes Shh: Sonic Hedgehog Trk : récepteur tyrosine kinase

Enzymes

AChE : acétylcholine estérase BChE : butyrylcholine estérase ChAT : choline acétyl-transférase DBH : Dopamine β-hydroxylase TH : tyrosine hydroxylase

Paramètres ventilatoires et physiologiques.

 $\label{eq:respiratoire} \begin{array}{l} fR: fréquence respiratoire\\ M: masse corporelle\\ PaCO_2: pression partielle artérielle en dioxyde de carbone\\ PaO_2: pression partielle artérielle en oxygène\\ Te: temps d'expiration\\ Ti: temps d'inspiration\\ VEH: ventilation épisodique hyperpnéique\\ Vm: volume minute\\ VO_2: volume de consommation d'oxygène\\ V_T: volume courant ou inspiratoire\\ \end{array}$

Pharmacologie, récepteurs, conductances.

AMPA : acide α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique Bambuterol : 1-(3,5-bis-(*N*,*N*-diméthylcarbamyloxy)-phényl)-2-*t*-butylaminoéthanol GABA : acide γ amino butyrique GABAA : récepteur au GABA de type A Ih : courant cationique activé par l'hyperpolarisation I(NaP) : courant sodique persistant Iso-OMPA : tetraisopropylpyrophosphoramide NK1-R : récepteur à la neurokinine 1 NMDA : *N*-méthyle-D-aspartate

Structures anatomiques

4Va : partie antérieure du 4e ventricule A5 : neurones catécholaminergiques du pont rostral Amb : noyau ambigu Cv : cervelet Cx : cortex DRG : groupe respiratoire dorsal DVMN : novau moteur dorsal du vague Lc : locus coeruleus Me : moelle épinière Neurones E : expiratoires I : inspiratoires pré-I: pré-inspiratoires post-I : post inspiratoires NTS : noyau du tractus solitaire OS : olive supérieure pBC : complexe pré-Bötzinger pFRG : groupe respiratoire para-facial Pn : noyau pontique PnC : novau pontique réticulaire caudal PRG : groupe respiratoire pontique Rpc- α : réticulée parvocellulaire, pars α ts : tractus solitaire VCo: novaux vestibulo-cochléaires Ve : noyaux vestibulaires VLL : lemniscus ventro-latéral VRG : groupe respiratoire ventral VRGc : groupe respiratoire ventral caudal VRGi : groupe respiratoire ventral intermédiaire VRGr : groupe respiratoire ventral rostral

Techniques.

BSA : bovine serum albumin, albumine sérique bovine DAB : 3,3'-diaminobenzidine GFP : green fluorescent protein, protéine fluorescente verte HVECoG : high voltage and low frequency LCSA : liquide cérébro-spinal artificiel

LVECoG : low voltage and high frequency PB : section ponto-bulbaire PBS : phosphate buffer saline PCR : polymerase chain reaction, réaction en chaîne de polymérisation

PM : section ponto-mésencéphalique

TF : section trigemino-faciale

INTRODUCTION

Introduction générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but de comparer les effets de différentes altérations du développement du tronc cérébral sur la genèse du rythme respiratoire à la naissance, c'est-à-dire de lier des étapes précoces du développement embryonnaire avec la physiologie post-natale.

L'activité respiratoire post-natale.

La ventilation pulmonaire est une activité motrice rythmique, qui apparaît pendant la vie fœtale et qui devient vitale après la naissance. Elle assure les échanges gazeux au niveau des poumons et participe ainsi au maintien de l'homéostasie. L'appareil ventilatoire est dirigé par la contraction rythmique des muscles respiratoires. Le diaphragme, les muscles intercostaux internes et externes, les muscles abdominaux assurent l'entrée active d'air dans les poumons et sont appelés muscles respiratoires principaux. Les muscles dits accessoires, situés au niveau des voies aériennes supérieures, participent à la modulation du débit respiratoire en modifiant la résistance des voies aériennes. Le rythme respiratoire est généré par des neurones réticulaires du tronc cérébral situés dans la medulla oblongata, et il est transmis aux muscles respiratoires par l'intermédiaire de motoneurones respiratoires spinaux (voir revue par Bianchi et al., 1995). Le réseau respiratoire comporte aussi de nombreux systèmes de contrôle à la fois périphériques et centraux qui permettent l'adéquation de l'activité respiratoire avec les différentes situations comportementales ou environnementales. Ces systèmes de contrôle sont ainsi responsables de la réponse respiratoire à la modification de certains paramètres tels que les variations des pressions partielles sanguines en oxygène ou en dioxyde de carbone.

Le réseau neuronal respiratoire constitue un générateur central de rythme, capable de produire une activité rythmique respiratoire même en absence de toute information afférente. Les mécanismes cellulaires et membranaires à l'origine du rythme respiratoire ont été intensément étudiés, en particulier grâce à l'enregistrement intracellulaire *in vivo* et à l'étude de réseaux rythmiques isolés *in vitro*. Les neurones respiratoires sont identifiables par leur

activité spontanée, synchronisée avec les mouvements ventilatoires. Le réseau formant le générateur central est établi par les connexions synaptiques inhibitrices et excitatrices entre ces différents neurones.

Ce réseau est organisé de façon régionale au sein du tronc cérébral car les neurones qui le constituent sont concentrés en « groupes respiratoires ». Cependant leur identification chez l'animal adulte est difficile car il s'agit de neurones réticulaires, qui ne font donc pas partie de noyaux neuronaux. De plus, les neurones respiratoires sont dispersés parmi les autres neurones réticulaires du tronc cérébral, qui participent à d'autres fonctions : déglutition, vigilance, contrôle cardio-vasculaire.

L'organisation régionale du réseau neuronal respiratoire, présentée dans le premier chapitre de cette introduction, a été étudiée chez l'animal nouveau-né ou adulte. Son origine embryonnaire reste en grande partie inconnue. Il est cependant très important de connaître les bases embryonnaires et génétiques de la mise en place des neurones respiratoires, pour comprendre les fondements biologiques de l'organisation fonctionnelle du réseau chez l'adulte. Cette thèse examine un aspect essentiel du développement du tronc cérébral : la segmentation du rhombencéphale embryonnaire dans le sens antéro-postérieur.

Rythmogenèse et segmentation au sein du tronc cérébral : des phénomènes liés.

Le rhombencéphale, vésicule la plus postérieure de l'encéphale primordial, forme le territoire dont est issu le tronc cérébral. Il subit chez tous les embryons de vertébrés une étape transitoire de segmentation qui entraîne la formation selon l'axe antéro-postérieur d'une série de 7 ou 8 renflements appelés rhombomères (r). Ceux-ci constituent des compartiments développementaux au sein desquels le devenir des précurseurs neuronaux est spécifié en fonction des gènes auxquels ils sont exposés (voir revue Lumsden, 1990). En effet, des gènes de développement, en particulier des facteurs de transcription, sont exprimés de façon différentielle le long de l'axe antéro-postérieur (voir revue par Lumsden & Krumlauf, 1996). Ainsi, les rhombomères sont aussi des compartiments d'expression génique. La segmentation joue un rôle déterminant dans la mise en place des différents noyaux neuronaux et dans l'établissement de leurs interconnexions en établissant un schéma qui définit les identités de chaque groupe selon leur position.

Dès la fin de la segmentation, il apparaît dans le tronc cérébral une activité rythmique qui peut être enregistrée *in vitro* sur le tronc cérébral isolé d'embryon de poulet (Fortin et al., 1994) ou de souris (Abadie et al., 2000). C'est l'une des activités motrices les plus précoces enregistrées dans le système nerveux central. Des expériences de sections étagées ont permis de mettre en évidence que plusieurs générateurs centraux de rythmes sont présents à différents niveaux antéro-postérieurs du tronc cérébral, et que leur organisation suit le schéma rhombomérique (Fortin et al., 1995, 1999). Ainsi, le développement de réseaux neuronaux rythmogènes au sein du tronc cérébral embryonnaire semble conditionné en partie par la segmentation, qui est alors une étape nécessaire à l'établissement d'activités rythmiques.

Les activités motrices rythmiques du tronc cérébral sont à l'origine de mouvements détectables chez l'embryon de poulet et chez le fœtus de mammifère. Chez tous les vertébrés la capacité à produire une activité motrice rythmique associée à la fonction respiratoire est une des fonction des neurones de la formation réticulée. D'autre part, l'épisode de segmentation du tronc cérébral est lui aussi un événement très conservé durant toute la phylogenèse des vertébrés. L'hypothèse suivante peut donc être proposée : l'apparition de réseaux neuronaux rythmiques précoces, dont certains persistent et sont actifs après la naissance, est conditionnée par le phénomène de segmentation du tronc cérébral.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but d'identifier les anomalies fonctionnelles du réseau neuronal rythmique respiratoire qui résultent d'une modification du programme de développement embryonnaire du tronc cérébral, et en particulier du programme de segmentation. Cette étude a été possible grâce aux progrès considérables de notre connaissance des gènes impliqués dans la mise en place des rhombomères.

Le contrôle génique de la segmentation embryonnaire.

La segmentation du tronc cérébral en rhombomères chez l'embryon dépend de l'expression précoce et transitoire de gènes spécifiques. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription en particulier ceux de la famille *Hox*, ainsi que les gènes *Krox20* et *MafB/kreisler*. Ces gènes sont exprimés de façon différentielle le long de l'axe antéropostérieur. Certains sont des gènes de segmentation proprement dits, c'est-à-dire qu'ils dirigent l'établissement des rhombomères et la formation des frontières entre ceux-ci, c'est le cas de *Krox20* (Giudicelli et al., 2001) ou *Hoxa1* (Rossel & Capecchi, 1999). Les autres sont

des gènes d'identité segmentaire, ils sont exprimés dans des rhombomères précis et pas dans d'autres : par exemple, *Hoxb1*, qui n'est exprimé que dans le rhombomère 4 (r4) chez la souris (Studer et al., 1994 ; Popperl et al., 1995).

La fonction de ces gènes a pu être mise en évidence grâce aux expériences de mutagenèse dirigée chez la souris qui permet l'invalidation de gènes déterminés. Chez les mutants du gène *Krox20*, une disparition progressive des rhombomères 3 et 5 a été observée (Schneider-Maunoury et al., 1993 ; Swiatek & Gridley, 1993) ; chez le mutant *Hoxa1* ce sont les rhombomères 4 et 5 qui sont gravement touchés (Lufkin et al., 1991 ; Carpenter et al., 1993 ; Mark et al., 1993). Les territoires affectés par la mutation sont en général les territoires d'expression exclusive des gènes. L'anatomie embryonnaire du tronc cérébral de ces animaux mutants a été étudiée et la mise en place des noyaux moteurs et de leurs projections sont largement connues, car ces noyaux sont facilement identifiables et leur origine rhombomérique est connue. L'origine et la mise en place des neurones réticulaires sont en revanche plus indéterminées.

La comparaison de différents mutants pour des gènes de développement nous permettra de mettre en évidence l'origine de certains neurones réticulaires participant au réseau neuronal respiratoire et de déterminer la contribution des différents rhombomères au réseau respiratoire.

Le réseau neuronal respiratoire présente de nombreux avantages qui sont à l'origine de son choix pour l'étude des neurones réticulaires : son activité rythmique spontanée est facilement enregistrable, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Ce réseau est anatomiquement bien séparé des motoneurones effecteurs qu'il commande, situés dans la moelle épinière. Enfin, ce réseau neuronal est mis en place très tôt au cours du développement embryonnaire et est quasiment mature dès la naissance, ce qui n'est pas le cas d'autres réseaux neuronaux réticulaires liés à d'autres sensations.

Objectifs.

Le but de ce travail est de mettre en évidence et de comprendre le lien entre le développement prénatal du cerveau postérieur et la rythmogenèse respiratoire après la naissance. La stratégie utilisée consiste à perturber la segmentation du tronc cérébral et à

rechercher les conséquences sur la mise en place des différents groupes neuronaux formant le réseau neuronal rythmique respiratoire, en étudiant la fonction ventilatoire à la naissance. Nous avons pour cela suivi trois approches expérimentales :

- i) L'utilisation de souris transgéniques comme *kreisler* ou *Hoxa2*, chez lesquelles le développement du rhombencéphale est perturbé par l'élimination ou la respécification de territoires réticulaires, permet d'identifier l'origine rhombomérique et les gènes d'identité qui définissent un groupe neuronal de fonction déterminée au sein du réseau respiratoire. Nous avons ainsi délimité le champ d'action des gènes de développement importants pour le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire avec les mutants *Hoxa2*.
- ii) Le travail sur des animaux transgéniques à la naissance autorise aussi l'observation des conséquences respiratoires, compensations et altérations, de mutations de gènes essentiels au fonctionnement du réseau respiratoire. Nous avons identifié un mécanisme de compensation lié à une mutation avec les mutants *AChE*.
- iii) Nous avons aussi utilisé une approche pharmacologique, en traitant des embryons par de faibles doses d'acide rétinoïque. Nous avons pu constater que ces doses étaient suffisantes pour entraîner des perturbations de la physiologie respiratoire à la naissance.

La comparaison des différents mutants de gènes de développement a permis de mettre en évidence la nature modulaire du réseau neuronal respiratoire du tronc cérébral. Cette observation nous fait mieux comprendre les mécanismes d'action de chacun des gènes et l'effet des différentes mutations au sein du réseau respiratoire. Nous avons ainsi abouti à l'identification d'une région para-faciale particulièrement importante pour la rythmogenèse respiratoire.

Chapitre 1

Le réseau neuronal respiratoire des mammifères : des groupes de neurones répartis au sein du tronc cérébral.

La respiration est une fonction biologique vitale dès la naissance, dont le but est de maintenir constants les taux tissulaires d'oxygène et de dioxyde de carbone. Elle est constituée d'une succession rythmique d'inspirations et d'expirations. Ce rythme est régulier, spontané, organisé et auto-entretenu pendant toute la vie. L'activité respiratoire est caractérisée in vivo par la valeur de différents paramètres : la fréquence respiratoire (fR) qui correspond au nombre de cycles respiratoires en une minute, le volume inspiratoire ou volume courant (V_T) représentant l'amplitude de la respiration, les temps d'inspiration (Ti) et d'expiration (Te) et le volume inspiré par minute (Vm) qui est le produit de la fréquence et du volume courant. Depuis l'antiquité et les observations de Gallien, le rythme respiratoire était soupçonné de prendre naissance au sein du système nerveux central et en amont de la moelle épinière. Les travaux classiques d'électrophysiologie de Flourens (1851), Lumsden (1923a,b) et Stella (1938) ont démontré que le rythme était effectivement généré dans le tronc cérébral, faisant intervenir à la fois le pont et le bulbe. Les études ultérieures, mettant en œuvre les progrès techniques, ont permis de mettre en évidence une grande diversité de neurones dits « respiratoires », c'est-à-dire dont l'activité électrique est corrélée au rythme respiratoire, ainsi que de préciser leur localisation anatomique, leurs propriétés membranaires et électriques et leur rôle au sein du réseau neuronal respiratoire.

1. Les neurones respiratoires.

1.1 Identification des neurones respiratoires dans le tronc cérébral.

L'identification des neurones respiratoires a d'abord été réalisée sur des animaux vivants, paralysés, vagotomisés et ventilés artificiellement, mais non anesthésiés. En effet, lors des études précédentes, l'anesthésie par les barbituriques, potentialisant les effets inhibiteurs du GABA, masquait l'activité d'un grand nombre de neurones respiratoires. Lors de ces expériences, les cycles respiratoires sont décrits par l'activité du nerf phrénique, nerf



Fig. 1. Enregistrements simultanés d'un neurone inspiratoire et de la décharge du nerf phrénique chez le chat *in vivo*.

La décharge du neurone inspiratoire (haut) correspond à la bouffée de décharge du nerf phrénique (bas), qui commande la contraction du diaphragme, l'inspiration (I). Enregistrements effectués sur un animal anesthésié, vagotomisé, paralysé et ventilé artificiellement. L'activité phrénique représente donc une « respiration fictive » produite par le générateur central indépendamment du gonflement des poumons.

Le neurone est défini comme « respiratoire » car son activité est en phase avec le rythme respiratoire d'origine centrale. Il appartient au sousgroupe des neurones inspiratoires, actifs pendant l'inspiration (cf. Figure 3).

Le début de l'inspiration est appelé "on-switch", la fin de l'inspiration est appelée "off-switch".

Après l'inspiration, la décharge du nerf comporte une composante de faible activité : c'est la post-inspiration (PI).

La phase d'inactivité du nerf phrénique correspond à l'expiration (E).

moteur du diaphragme. Le début de la phase inspiratoire, ou « on-switch » est caractérisé par une augmentation transitoire de l'activité du nerf phrénique au commencement de l'inspiration (Figure 1). Ensuite, l'activité devient permanente et forme une « rampe inspiratoire » qui croît progressivement pendant toute la durée de l'inspiration. Celle-ci est brutalement interrompue par l'arrêt de l'activité ou « off-switch », qui marque l'entrée dans la phase expiratoire. Cet « off-switch » est suivi d'une faible activité résiduelle du nerf phrénique pendant la « post-inspiration », puis d'un silence complet pendant l'expiration (Richter, 1982; Bianchi et al., 1995). Ces trois différentes phases sont générées et synchronisées par un réseau de « neurones respiratoires » dont l'activité est corrélée au cycle respiratoire : soit ces neurones accompagnent la rampe inspiratoire, soit ils sont actifs pendant la post-inspiration ou l'expiration. Plusieurs catégories de neurones respiratoires, classés en fonction du moment de leur pic d'activité par rapport au cycle respiratoire, ont pu être identifiées par Richter en 1986 (Richter et al., 1986). Ainsi, au moins six classes de neurones sont différenciées (Figure 2) : les neurones pré-inspiratoires (ou pré-I) qui déchargent juste avant l'initiation de l'inspiration, les neurones inspiratoires (I) précoces, globaux ou tardifs selon qu'ils sont actifs pendant toute l'inspiration ou au début ou à la fin seulement, les neurones post-inspiratoires (post-I), et les neurones expiratoires (E).

Les expériences suivantes sur la génération du rythme respiratoire ont utilisé la préparation de tronc cérébral / moelle épinière isolés de rat nouveau-né, mise au point par Suzue en 1984. Celui-ci fut le premier à mettre en évidence que le tronc cérébral entier, plongé dans une chambre d'enregistrement était capable de générer spontanément in vitro un rythme assimilable au rythme respiratoire. Ces préparations ont été largement utilisées pour étudier les mécanismes centraux de la genèse et du contrôle neuronal du rythme respiratoire. Au sein de ces préparations in vitro, l'activité des neurones respiratoires du tronc cérébral est synchronisée avec l'activité enregistrée au niveau des racines motrices des nerfs crâniens (Figure 3). De nombreuses expériences montrent que les neurones respiratoires identifiés précédemment in vivo peuvent être retrouvés dans ces préparations de tronc cérébral isolé in vitro (Feldman, 1986; Morin-Surun et al., 1992; Rekling et al., 1996). C'est en particulier le cas pour les neurones pré-inspiratoires, qui ont pu être reconnus in vitro dès 1987 par Onimaru et Homma. Ces préparations peuvent aussi être réalisées sur des animaux adultes, et même avec des espèces de grande taille comme le cobaye, ce qui nécessite toutefois pour la survie de l'organe isolé in vitro un système de perfusion utilisant le système vasculaire de l'animal (Morin-Surun & Denavit-Saubié, 1989).



Fig. 2. Enregistrement de six types de décharges des neurones bulbaires respiratoires en fonction du cycle respiratoire *in vivo* (modifié d'après Richter et al., 1986).

L'enregistrement de ces neurones a été permis par l'emploi d'animaux qui n'étaient pas anesthésiés mais décérébrés, paralysés et ventilés artificiellement. Ces neurones bulbaires sont répartis dans différentes aires du tronc cérébral, formant le réseau neuronal respiratoire. L'enregistrement intracellulaire et l'étude pharmacologique des relations synaptiques ont montré l'existence de puissantes inhibitions, par exemple entre les neurones I précoces et I rampe. Ces relations inhibitrices ainsi que les propriétés électriques membranaires sont importantes pour la genèse du rythme respiratoire normale chez l'adulte.

La localisation fonctionnelle des neurones respiratoires au sein du réseau rythmique peut être déduite des sites de projection axonale de ces neurones. Pour connaître ces sites de projection, la technique mise en œuvre consiste à stimuler électriquement une région du système nerveux central supposée recevoir l'axone du neurone respiratoire dont l'activité est enregistrée. Si l'axone est effectivement présent dans l'aire stimulée, un potentiel d'action est généré et se propage de façon antidromique vers le corps cellulaire du neurone, où il est détecté. Dans le réseau neuronal respiratoire, trois types de neurones caractérisés par leur projection axonale ont ainsi pu être mis en évidence (Merrill, 1970; Bianchi, 1971): des motoneurones bulbaires, des interneurones bulbospinaux (projetant du bulbe dans la moelle) et des interneurones propriobulbaires (créant des connexions à l'intérieur du bulbe). Les motoneurones respiratoires bulbaires, répondent à la stimulation des nerfs vagues et des nerfs supérieurs laryngés, par l'émission d'un potentiel d'action antidromique. Ces motoneurones innervent les muscles lisses des voies aériennes supérieures telles que le larynx, innervé par le nerf laryngé récurrent (cf. revue Bartlett, 1989). Les interneurones bulbospinaux, inspiratoires et expiratoires, forment l'étage pré-moteur du réseau et présentent une réponse antidromique à une stimulation de l'étage cervical ou phrénique de la moelle épinière. Ces neurones sont chargés de véhiculer l'information prémotrice issue des centres respiratoires bulbaires vers les centres moteurs spinaux qui innervent le diaphragme ou les muscles intercostaux (Nakayama & von Baumgarten, 1964; Merrill, 1970; Bianchi, 1971). Les interneurones propriobulbaires sont des neurones qui ne sont pas sensibles à la stimulation de la moelle épinière, ni à celle du nerf vague. Leur projection axonale se situe donc à l'intérieur du bulbe, à moins que le site de projection ne soit pas encore connu. Ces neurones présentent un intérêt particulier pour la génération du rythme respiratoire. En effet, leur statut d'interneurones, conféré par leurs connexions internes au bulbe, pourrait leur permettre de constituer la base du réseau rythmogène. L'hypothèse actuelle propose que le rythme est produit au niveau de certains de ces neurones propriobulbaires, avant d'être transmis aux neurones bulbospinaux puis aux motoneurones spinaux et bulbaires.

1.2 Propriétés membranaires et neurotransmetteurs des neurones respiratoires.

Les neurones respiratoires constituent un réseau organisé, dont les connexions sont établies par des synapses chimiques. L'interaction entre les neurotransmetteurs et les neuromodulateurs et les propriétés membranaires des neurones post-synaptiques sont



Fig. 3. Enregistrements de l'activité respiratoire *in vitro* grâce à diverses préparations.

A. Tranche coronale de tronc cérébral permettant d'avoir accès aux neurones du complexe pré-Bötzingzer (pBC) en enregistrement intracellulaire (haut). L'emploi d'une électrode extracellulaire autorise l'enregistrement de l'activité de toute la population neuronale du pBC (pBC int, bas), tandis que l'enregistrement intracellulaire des neurones respiratoires (neurone, bas) donne accès à l'étude de leurs propriétés membranaires et électriques. 12 : noyau moteur hypoglosse, 12n : nerf hypoglosse, IO : olive inférieure, NA : noyau ambigu, NTS : noyau du tractus solitaire, Sp5 : faisceau spinal du trijumeau (d'après Thoby-Brisson & Ramirez, 2001)..

B. Préparation de tronc cérébral isolé (haut, voir méthodes). Cette préparation consiste à prélever l'ensemble du tronc cérébral, ainsi qu'une portion de moelle épinière. Elle permet en particulier d'enregistrer l'activité de l'ensemble du réseau, d'effectuer des sections et d'avoir accès au pont, qui contient de nombreux neurones modulateurs du rythme respiratoire, tels que les neurones du groupe A5. L'activité enregistrée au niveau des nerfs crâniens ou spinaux (bas) correspond aux bouffées inspiratoires.

probablement à la base de la rythmogenèse respiratoire. Les neurotransmetteurs impliqués comprennent essentiellement des acides aminés excitateurs tels que le glutamate et des acides aminés inhibiteurs, comme le GABA et la glycine. Les acides aminés excitateurs participent non seulement aux connexions du réseau neuronal respiratoire mais aussi au fonctionnement des afférences sensorielles pulmonaires. Le déroulement d'un cycle respiratoire d'un neurone inspiratoire serait le suivant. L'« on-switch », marquant le début de l'inspiration est caractérisé par un signal dépolarisant bref, probablement constitué d'un courant calcique transitoire (cf. revue Bianchi et al., 1995). Ce signal déclenche par re-excitation dans tout le réseau neuronal une vague décroissante d'activités glutamatergiques, relayée ensuite par une activité croissante, constituant la rampe inspiratoire et régulée par des courants potassiques et des seconds messagers intracellulaires. Cette activité se poursuit pendant toute l'inspiration et s'accompagne de l'activation de récepteurs au glutamate de type NMDA, qui jouent un rôle central dans l'« off-switch », la terminaison de l'inspiration. L'accumulation de calcium intracellulaire active alors des canaux potassiques qui repolarisent la membrane en fin d'inspiration. L'action des neurotransmetteurs inhibiteurs, GABA et glycine, maintien la membrane hyperpolarisée pendant toute la durée de l'expiration.

Une grande diversité de neuromodulateurs interviennent au sein du réseau respiratoire pour réguler le rythme généré au niveau du bulbe. Ces modulations, qu'elles favorisent ou dépriment le rythme respiratoire, sont réalisées par des neurones réticulaires du tronc cérébral. En particulier, les neurones enképhalinergiques et noradrénergiques sont responsables du contrôle des variations du potentiel membranaire des neurones respiratoires (cf. revue Bianchi et al., 1995). La noradrénaline exerce des effets inhibiteurs sur les neurones inspiratoires bulbaires in vivo (Champagnat et al., 1979). Certains de ces neurones, localisés au sein du groupe A5, dans le pont caudal et ventral, diminuent la fréquence du rythme respiratoire généré par le bulbe in vitro (Hilaire et al., 1989; Errchidi et al., 1991). Ce groupe neuronal présente des caractéristiques intéressantes : d'une part, il peut être identifié facilement anatomiquement en réalisant une détection immnunohistochimique contre la tyrosine hydroxylase, enzyme de la voie de biosynthèse de la noradrénaline ; d'autre part ce groupe A5 est aussi actif in vitro ce qui permet de tester son efficacité dans différents contextes. Les drogues opiacées ont une effet inhibiteur sur la respiration, parfois responsable de la mort par overdose. Leurs cibles sont des récepteurs membranaires post-synaptiques dont les ligands naturels sont les opioïdes endogènes et en particulier les enképhalines. De nombreux neurones enképhalinergiques sont répartis dans le tronc cérébral, à la fois dans le bulbe et dans le pont (Elde et al., 1976; Simantov et al., 1977; Arvidsson et al., 1995). Les enképhalines exercent

un effet inhibiteur sur les neurones respiratoires bulbaires et pontiques *in vivo* en diminuant l'efficacité de la transmission synaptique glutamatergique (Denavit-Saubié et al., 1978 ; Morin-Surun et al., 1984a). Ce rôle des opioïdes endogènes sur la respiration a récemment été mis en évidence *in vitro*, tout en montrant un rôle différent des sous-types de récepteurs aux opioïdes (Morin-Surun et al., 1984b ; Morin-Surun et al., 2001). De plus, ces neuromodulateurs opioïdes agissent différemment sur les neurones inspiratoires bulbaires et les neurones pré-I plus rostraux, ralentissant la fréquence de décharge des premiers, alors que les seconds y sont insensibles. Ainsi, les opioïdes endogènes participeraient de façon importante dans la transmission synaptique et la coordination des activités entre les neurones pré-I et les neurones inspiratoires bulbaires, de façon à obtenir un rythme respiratoire régulier et stable (Mellen et al., 2003). Cette neuromodulation principalement inhibitrice peut être antagonisée artificiellement *in vivo* et *in vitro* par un bloqueur sélectif des récepteurs enképhalinergiques, la naloxone.

Un autre système neuromodulateur important pour la rythmogenèse respiratoire implique les systèmes cholinergiques. Des neurones cholinergiques sont trouvés dans les noyaux parabrachial médian et Kölliker-Fuse, qui constituent le groupe respiratoire pontique et qui envoient des projections vers les sites respiratoires du bulbe ventro-latéral. De nombreuses aires liées à la respiration possèdent des récepteurs nicotiniques, comme le noyau du tractus solitaire et les noyaux moteurs des nerfs crâniens ; des récepteurs nicotiniques et muscariniques sont présents (cf. revue Bianchi et al., 1995) dans le groupe respiratoire ventral (voir plus loin). L'inhibition de l'acétylcholine estérase, la principale enzyme de dégradation de l'acétylcholine entraîne un excès d'acétylcholine suivi d'une dépression respiratoire, tandis que l'application localisée d'acétylcholine au niveau du bulbe ventral stimule la ventilation. Les effets de l'acétylcholine sur la respiration sont donc parfois contradictoires, et dépendent beaucoup de l'espèce utilisée, du mode d'anesthésie et des agonistes ou antagonistes utilisés. Toutefois, il semble que l'acétylcholine soit impliquée principalement dans des mécanismes de modulation du rythme respiratoire liés aux états de vigilance (cf. revue Bellingham & Funk, 2000) et à la chémosensibilité centrale. La plupart de ces effets passent par les récepteurs muscariniques dont l'activation est susceptible d'affecter un courant potassique impliqué dans le contrôle des oscillations du potentiel membranaire des neurones respiratoires. Ainsi, l'action des récepteurs muscariniques concerne principalement la modulation de l'activité du générateur central du rythme respiratoire, alors que les récepteurs nicotiniques interviennent au niveau de la sortie motrice, ainsi que dans la régulation du tonus



Fig. 4. Représentations schématiques des groupes respiratoires du tronc cérébral, de leurs interactions et de leur localisation.

A. Projection dans un plan horizontal, B. projection dans un plan sagittal. Structures et noyaux : 4Va : partie antérieure du 4e ventricule, 5 : noyau moteur trijumeau, 6 : noyau moteur abducens, 7 : noyau moteur facial, 7n : nerf facial, 12 : noyau de l'hypoglosse, Amb : noyau ambigu, DVMN : noyau moteur dorsal du vague, Lc : locus coeruleus, Nts : noyau du tractus solitaire, OS : olive supérieure, Pn : noyau pontique, PnC : noyau pontique caudal, Rpc- α : réticulée parvocellulaire pars α , ts : tractus solitaire, VCo : noyaux vestibulo-cochléaires, Ve : noyaux vestibulaires, VLL : lemniscus ventro-latéral.

Les groupes respiratoires du tronc cérébral (en bleu) sont organisés à la fois selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Groupes respiratoires ventraux : A5 : neurones catécholaminergiques du groupe A5, pBC : complexe pré-Bötzinger, pFRG : groupe respiratoire para-facial, VRG : groupe respiratoire ventral. Groupes respiratoires dorsaux : DRG : groupe respiratoire dorsal, PRG : groupe respiratoire pontique. Les groupes bleu clair sont modulateurs, les bleus foncés sont les cnetres générateurs supposés.

des muscles lisses des voies aériennes (Chamberlin et al., 2002) et au niveau de la jonction neuromusculaire des muscles respiratoires (cf. revue Bianchi et al., 1995).

2. Les groupes respiratoires pontiques (Figure 4).

2.1 Le groupe respiratoire pontique (PRG).

Les travaux de T. Lumsden en 1923 (1923a,b), effectués sur le chat anesthésié, vagotomisé et maintenu sous respiration artificielle à l'aide d'une pompe ont identifié, grâce à des expériences de sections étagées du tronc cérébral, plusieurs groupes respiratoires. L'un de ceux-ci, dont l'ablation entraîne une respiration formée d'inspirations très longues, dite « apneustique », a été appelé centre pneumotaxique. D'autres expériences ont montré que ce groupe comprenait les neurones des noyaux parabrachial médian et Kölliker-Fuse, puisque le même type de respiration était obtenu après lésion de ces noyaux (Cohen & Wang, 1959 ; Bertrand & Hugelin, 1971 ; Feldman & Gautier, 1976 ; von Euler et al., 1976).

Dans cette région pontique respiratoire, appelée ensuite groupe respiratoire pontique ou PRG (Feldman, 1986), trois types de neurones dont la décharge suit le rythme respiratoire sont observés : des neurones inspiratoires, des neurones expiratoires et des neurones de transition dont l'activité commence au cours d'une phase et se finit dans l'autre (Bertrand & Hugelin, 1971).

Ces structures pontiques reçoivent de nombreuses afférences en provenance du noyau du tractus solitaire (Loewy & Burton, 1978 ; Norgren, 1978 ; King, 1980) et des régions proches de la surface du bulbe ventral (Loewy et al., 1981). Des projections réciproques sont établies entre ces régions pontiques et le noyau dorso-médian du noyau du tractus solitaire (Saper et al., 1976), ainsi qu'avec le groupe respiratoire ventral (Riche et al., 1979 ; King, 1980). Les neurones des régions respiratoires pontiques projettent vers le thalamus et l'hypothalamus (Saper et al., 1976), reçoivent des afférences supérieures en provenance du cortex et de l'hypothalamus (Moga et al., 1990) et établissent des interconnexions réciproques avec des populations neuronales de l'amygdale et du noyau paraventriculaire (Ricardo & Koh, 1978 ; Takeuchi et al., 1982).

Au cours de nombreuses expériences, il a été démontré chez le chat adulte *in vivo* que la terminaison de l'inspiration ou « off-switch » requérait la présence de deux systèmes intacts, projetant sur le générateur central bulbaire du rythme respiratoire : le PRG rostral,

c'est-à-dire le centre pneumotaxique proprement dit, et les afférences en provenance des récepteurs pulmonaires à l'étirement. En effet, la section de cette partie du pont accompagnée de la déafférentation par vagotomie entraîne l'apparition d'une respiration apneustique (Lumsden, 1923a,b). La lésion sélective des noyaux parabrachial médian et Kölliker-Fuse conduit à l'apparition du même type de respiration (Feldman & Gautier, 1976 ; von Euler et al., 1976 ; Caille et al., 1981). Cette respiration apneustique est aussi observée lors de l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA, l'un des trois grands sous-types de récepteurs au glutamate, à des chats vagotomisés (Foutz et al., 1988a,b). Ces observations suggèrent que les antagonistes NMDA interrompent les mécanismes de terminaison de l'inspiration mis en jeu par le groupe pneumotaxique au niveau du générateur central du rythme. Par ailleurs, la fin de la phase inspiratoire résulterait d'une interaction entre les afférences pulmonaires sensibles à l'étirement, véhiculant une information sur l'état de gonflement des poumons, et un mécanisme central, basé dans le PRG, qui ferait intervenir le glutamate et les récepteurs NMDA.

Des expériences plus récentes effectuées chez le rat, viennent confirmer les observations réalisées auparavant chez le chat. Ainsi, des lésions électrolytiques bilatérales du pont dorso-latéral produisent une respiration apneustique chez des rats anesthésiés, vagotomisés et ventilés sous pompe (Wang et al., 1993). Une augmentation de la durée des phases inspiratoire et expiratoire est observée lors de la lésion du pont parabrachial chez des rats décérébrés non anesthésiés (Morrison et al., 1994). De plus, la lésion chimique ou électrique du pont ventro-latéral induit l'apparition d'une respiration apneustique chez le rat anesthésié, vagotomisé, paralysé et ventilé (Jodkowski et al., 1994). L'ensemble des ces expériences tend à démontrer qu'il existe chez le rat comme chez le chat des neurones pontiques situés dans des groupes précis et qui jouent un rôle dans la terminaison de l'inspiration et le contrôle de la durée des différentes phases du cycle respiratoire.

Un autre mécanisme de contrôle du rythme respiratoire particulièrement important en provenance d'un groupe pontique est la modulation inhibitrice jouée par les neurones noradrénergiques du groupe A5 (Figure 4). Ces neurones sont capables de déprimer le rythme respiratoire dans des préparations de tronc cérébral isolé de rat ou de souris nouveau-né (Hilaire et al., 1989 ; Errchidi et al., 1991). Si ces neurones sont stimulés électriquement, une inhibition du générateur central de rythme est observée, mais celle-ci ne se produit pas en présence d'antagonistes noradrénergiques (Hilaire et al., 1989). L'élimination du pont dans les préparations de tronc cérébral isolé conduit à une augmentation de la fréquence des bouffées inspiratoires enregistrées (Errchidi et al., 1991). Une des caractéristiques très

intéressante de ce contrôle en provenance du groupe A5, c'est qu'il est actif et son effet est visible sur les préparations de tronc cérébral isolé *in vitro*, contrairement à d'autres systèmes de régulation et de modulation du rythme respiratoire qui ne sont pas conservés lors du passage *in vivo* à *in vitro* (Morin-Surun et al., 1995a).

2.2 Le groupe respiratoire para-facial (pFRG, Figure 4).

Récemment, une étude combinant l'enregistrement intracellulaire de neurones respiratoires et l'enregistrement optique de l'activité neuronale grâce à des molécules fluorescentes voltage-dépendantes a montré l'importance fonctionnelle d'une population de neurones respiratoires dans le tronc cérébral, à proximité du noyau moteur facial (Onimaru & Homma, 2003). Ce groupe, appelé groupe respiratoire para-facial ou pFRG, serait constitué de neurones pré-I en étroite relation avec des neurones inspiratoires bulbaires. Ces neurones commencent à décharger avant les activités respiratoires enregistrées sur les racines motrices des nerfs crâniens. Une lésion électrolytique bilatérale du pFRG perturbe fortement la rythmogenèse respiratoire, provoquant une baisse importante de la fréquence de décharge ainsi que l'allongement de la durée du pic d'activité et de la décharge inspiratoire. Ces neurones pré-I seraient les mêmes que ceux identifiés précédemment par les mêmes auteurs, qui ont montré que ces neurones étaient capables d'autorythmicité (Onimaru & Homma, 1987; Onimaru et al., 1995). Ces observations sont particulièrement intéressantes en liaison avec les études récentes de (Mellen et al., 2003) concernant les rôles différentiels des neuromodulateurs opioïdes sur les neurones pré-I et inspiratoires. Ainsi, les inter-relations opioïde-sensibles des neurones inspiratoires bulbaires et des neurones pré-I du pFRG, participeraient activement à la génération d'un rythme respiratoire stable et régulier.

3. Les centres respiratoires bulbaires.

3.1 Le groupe respiratoire dorsal (DRG) et les afférences sensorielles.

Le groupe respiratoire dorsal (« <u>D</u>orsal <u>R</u>espiratory <u>G</u>roup, DRG) est une structure bilatérale, localisée au niveau de l'obex, dans la partie dorsale et médiane du bulbe (Bianchi, 1971, Figure 4). Il est constitué de la partie ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (NTS) et s'étend rostralement par rapport à l'obex. Au niveau du NTS, les afférences sensorielles primaires impliquées dans le contrôle des activités végétatives cardio-vasculaires,

respiratoires et digestives se projettent et interagissent pour assurer le maintien de l'homéostasie.

3.1.1 Le noyau du tractus solitaire.

Au niveau du tractus solitaire se terminent les principales afférences périphériques contrôlant le rythme respiratoire. En particulier, les afférences vagales d'origine pulmonaire provenant des récepteurs pulmonaires à l'étirement projettent dans la partie ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (Kalia & Mesulam, 1980). Les terminaisons des afférences glossopharyngiennes en provenance des chémorécepteurs périphériques y sont aussi présentes (Davies & Edwards, 1973 ; Jordan & Spyer, 1977 ; Lipski et al., 1977). La diversité d'origine des afférences qui projettent dans cette aire du NTS en fait un site d'intégration majeur des informations issues de la périphérie.

Le NTS participe activement à l'intégration de phénomènes somatiques et végétatifs impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, pour assurer son rôle, il est donc connecté à diverses structures centrales et périphériques. Ainsi, les neurones du NTS projettent vers de nombreuses structures. Le noyau moteur dorsal du vague contient des neurones pré-ganglionnaires impliqués dans le contrôle des fonctions cardio-vasculaire ou digestive. Le noyau du tractus solitaire projette vers le complexe thalamique, le cortex cérébral et l'hypothalamus via un relais situé dans le pont au niveau du noyau parabrachial médian et du PRG (Herbert et al., 1990 ; Ter Horst et al., 1989). Les neurones du noyau du tractus solitaire envoient également des projections à l'intérieur du bulbe et du tronc cérébral, en particulier grâce à des axones dirigés ventralement . Ces projections concernent en particulier des neurones du NTS qui vont se connecter à des régions impliquées dans la rythmogenèse respiratoire, notamment le PRG et le bulbe ventral (Norgren, 1978 ; Ross et al., 1985) ; Otake et al., 1989 ; Zheng et al., 1998).

Grâce à ses multiples connexions, le NTS est donc capable d'intégrer des informations d'origine centrale et périphérique ; de plus, il est en relation étroite avec des groupes neuronaux du tronc cérébral, dont les centres respiratoires. *In vivo*, une activité respiratoire persiste au sein du NTS après section des afférences vagales. Cependant, les conséquences de la destruction du NTS *in vivo* semblent contradictoires : certains décrivent des effets similaires à ceux d'une vagotomie (Allen, 1927), d'autres rapportent l'apparition d'une respiration apneustique (Koepchen et al., 1967), ou au contraire décrivent une apnée (Morin-Surun et al., 1984c). Ces différentes observations peuvent être liées à la précision de la destruction et à la région affectée : comme le NTS intègre un grand nombre d'informations,

une destruction partielle entraîne une réponse similaire à celle obtenue lors de la destruction du centre émetteur / récepteur de l'information ou de la voie de transport de cette information.

Le DRG contient principalement des neurones inspiratoires bulbospinaux qui conduisent l'activité respiratoire bulbaire vers les neurones inspiratoires de la moelle épinière. Il contient aussi des neurones propriobulbaires qui véhiculent l'information inspiratoire vers les neurones inspiratoires et respiratoires du bulbe ventral (Merrill, 1979 ; Merrill, 1981). À l'intérieur du NTS, sont aussi localisés des neurones activés exclusivement par les afférences vagales des récepteurs pulmonaires à l'étirement, appelés « neurones pompes » (Berger, 1977). La fonction du DRG pour la rythmogenèse respiratoire proprement dite est assez mal connue, d'autant plus que comme dans le cas du PRG, les neurones du DRG ne sont pas actifs *in vitro*, puisque leur ablation n'entraîne pas de modification de l'activité respiratoire enregistrée sur les préparations de tronc cérébral isolé.

3.1.2 Les afférences sensorielles d'origine pulmonaire.

Le complexe solitaire intervient dans le contrôle des activités liées aux fonctions végétatives, en particulier à la fonction respiratoire. Cette activité respiratoire centrale est contrôlée par des afférences vagales et glossopharyngiennes intégrées au niveau du noyau du tractus solitaire et qui modulent le rythme respiratoire généré par le tronc cérébral (Spyer & Richter, 1986 ; Bonham & McCrimmon, 1990). Une partie des afférences vagales véhicule l'activité de récepteurs broncho-pulmonaires sensibles à l'étirement : lors de chaque inspiration, l'inflation pulmonaire entraîne une augmentation de la pression alvéolaire, ce qui déclenche l'activité de ces récepteurs pulmonaires à l'étirement. Leur excitation produit un arrêt de l'activité inspiratoire au niveau de l'ensemble du système respiratoire et favorise la transition de phase grâce à l'action de neurones du DRG excités par les récepteurs à l'étirement : c'est le réflexe d'Hering-Breuer. Ce réflexe joue en rôle très important chez les mammifères quadrupèdes. Chez l'humain adulte, ce réflexe est en grande partie relayé par le réflexe myotatique d'étirement des muscles intercostaux et du diaphragme ; il est surtout important chez le nourrisson, chez lequel il participe à la stabilisation du rythme respiratoire. Le NTS reçoit de plus des projections en provenance du centre pneumotaxique, formé par les noyaux Kölliker-Fuse et parabrachial médian (von Euler, 1986), qui interviennent dans l'arrêt de l'inspiration et la transition de phase vers l'expiration. En effet, une destruction du centre pneumotaxique sur des animaux vagotomisés entraîne une respiration de type apneustique, avec une augmentation du temps d'inspiration (Schweitzer et al., 1990). Le NTS, le centre

pneumotaxique, ainsi que la région du noyau ambigu participent donc à l'élaboration du rythme respiratoire central (Ezure, 1990).

Plusieurs autres types de récepteurs, situés au niveau des différentes parties des voies aériennes, envoient des projections vers la NTS par l'intermédiaire du nerf vague. Ces récepteurs contrôlent différents réflexes participant à la régulation de la résistance et de l'intégrité des voies aériennes. Il s'agit entre autres des récepteurs pulmonaire « J », impliqués dans les réponses à l'œdème ou la congestion pulmonaire, des récepteurs laryngo-trachéaux, capables d'initier le réflexe de la toux et des récepteurs à l'irritation des voies aériennes, dont l'activité entraîne une constriction des voies aériennes et donc une augmentation de leur résistance.

3.1.3 Les afférences chémosensorielles : cellules chémoréceptrices périphériques et neurones sensoriels afférents.

Le but de la fonction ventilatoire est de maintenir les pressions partielles artérielles en dioxygène et en dioxyde de carbone dans des limites compatibles avec la survie de l'organisme. Elle permet d'assurer le maintien de l'homéostasie gazeuse en effectuant les échanges O_2 / CO_2 avec l'air ambiant au niveau des poumons. Cette fonction s'adapte aux besoins de l'organisme et aux paramètres de l'environnement extérieur. C'est pourquoi les informations concernant les pressions partielles artérielles d' O_2 (Pa O_2) et de CO₂ (PaCO₂) jouent un rôle dans le contrôle de l'activité respiratoire, ces informations proviennent de chémorécepteurs périphériques et centraux.

Dès 1927 (Heymans & Heymans, 1927), l'implication de structures localisées au niveau de la crosse aortique et des bifurcations carotidiennes a été démontrée, puis confirmée par la suite (Heymans et al., 1931). Ces structures sont nommées corps carotidiens et aortiques. Les corps carotidiens sont des organes chémosensoriels capables de répondre à des modifications de la PaO₂, de la PaCO₂ et du pH artériels, et sont les principaux médiateurs de la réponse cardio-respiratoire à l'hypoxie (diminution de la PaO₂). Les corps carotidiens sont les sites chémorécepteurs périphériques les plus importants lors de la réponse à l'hypoxie (Lahiri et al., 1981). Ces corps aortiques possèdent essentiellement une innervation efférente supportée par le nerf du sinus carotidien ou nerf sinusal, une branche du nerf glossopharyngien. Cette innervation provient de neurones sensoriels dont le corps cellulaire est localisé dans le ganglion pétreux. Des études menées chez le rat ont montré que ce ganglion est constitué en partie d'une population de neurones dopaminergiques, caractérisés par l'expression des enzymes de synthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase et la

dopadécarboxylase (Katz et al., 1983; Katz & Black, 1986; Finley et al., 1992). Ces neurones représentent 15 à 20% du total des neurones sensoriels du ganglion pétreux et 84% de ces neurones projettent exclusivement vers les corps carotidiens (Katz & Black, 1986), où ils terminent leur projection par une terminaison synaptique sur les chémorécepteurs (Finley et al., 1992). Des études consistant à enregistrer l'activité du nerf sinusal ont été menées in vivo (Biscoe & Purves, 1967) et in vitro (Hayashida et al., 1980) pour connaître le rôle des chémorécepteurs carotidiens dans le contrôle de la respiration. Ces expériences montrent que la stimulation des chémorécepteurs entraîne une augmentation de l'activité ventilatoire, c'està-dire une hyperventilation. La stimulation des chémorécepteurs peut être évoquée par l'hypoxie, l'hypercapnie (augmentation de la PaCO₂) ou l'acidose (diminution du pH). De plus, il a été décrit une modulation de l'activité spontanée de ces chémorécepteurs carotidiens au cours de la respiration normale (eupnée) en normoxie (PaO₂ normale). Ces variations sont synchronisées avec l'activité rythmique respiratoire (Biscoe & Purves, 1967). Le rôle des chémorécepteurs périphériques peut être étudié plus sélectivement au cours d'expériences d'hyperoxie : l'individu respire un air dont la teneur en O₂ est augmentée, voire de l'oxygène pur. Dans ces conditions, l'activité basale des chémorécepteurs carotidiens cesse et les effets de cette élimination réversible de l'activité chémoréceptrice périphérique peuvent être mesurés. Les chémorécepteurs carotidiens possèdent à leur surface des canaux potassiques sensibles à la PaO₂ (Lopez-Barneo et al., 1988; Buckler et al., 2000; revu dans Peers & Kemp, 2001). Lors d'une hypoxie, ces canaux se ferment, induisant une entrée massive de calcium et une transmission synaptique qui génère un influx nerveux sur le neurone sensoriel connecté au chémorécepteur. Ensuite, le neurone sensoriel libère de la dopamine au niveau du NTS, ce qui déclenche la réponse ventilatoire adaptée.

Les corps aortiques sont des structures plus diffuses, trouvées en plusieurs emplacements au niveau de la crosse aortique. Ces chémorécepteurs sont innervés par le nerf de Ludwig-Cyon, une branche du nerf vague. Ces projections sont issues de neurones sensoriels dont le soma est situé dans le ganglion noueux. Ces corps aortiques sont sensibles à la fois à la PaO2 et à la teneur totale du sang en oxygène, contrairement aux corps carotidiens qui sont surtout sensibles à la PaO2.

3.2 Le groupe respiratoire ventral (VRG, Figure 4).

3.2.1 Les neurones prémoteurs et la rythmogenèse respiratoire.

Le groupe respiratoire ventral (« <u>V</u>entral <u>R</u>espiratory <u>G</u>roup », VRG) forme un groupe respiratoire complexe contenant des motoneurones vagaux et glossopharyngiens, des neurones prémoteurs bulbospinaux et des interneurones, dont certains constituent le seul générateur central du rythme respiratoire connu dans le tronc cérébral fœtal et post-natal (Bianchi, 1971).

Le VRG a été décrit pour la première fois en 1971 (Bianchi, 1971). Il s'agit d'un groupe bilatéral formant une colonne longitudinale dans le bulbe ventrolatéral chez le chat. Cette colonne s'étend depuis la limite bulbo-pontique (en arrière du noyau moteur facial) jusqu'à la limite bulbo-spinale et est subdivisée en trois régions : une caudale, une intermédiaire, et une rostrale.

La partie caudale (VRGc) s'étend de l'obex jusqu'à la limite bulbospinale et comprend le noyau rétro-ambigu (Merrill, 1970). Cette région contient une majorité de neurones expiratoires bulbospinaux qui vont donc projeter vers la moelle épinière (Bianchi, 1971). La partie intermédiaire (VRGi) correspond aux régions proches des noyaux ambigu et paraambigu (Merrill, 1970; Bianchi, 1971). Le noyau ambigu contient des motoneurones laryngés qui sont actifs à la fois pendant l'inspiration et l'expiration. Le noyau para-ambigu est constitué de pré-motoneurones bulbospinaux respiratoires envoyant des connexions sur les motoneurones spinaux qui innervent les muscles respiratoires thoraciques. Le VRGi contient aussi des neurones propriobulbaires chargés de coordonner l'activité des muscles ayant un rôle de pompe avec les systèmes gérant la résistance des voies aériennes, jouant ainsi un rôle clé au sein du générateur central du rythme respiratoire (Bianchi, 1971). La partie la plus rostrale du VRG (VRGr), localisée à proximité du noyau rétro-facial (partie la plus antérieure du noyau ambigu), englobe un ensemble dense de motoneurones pharyngés inspiratoires et expiratoires (Bianchi et al., 1988). Le VRGr inclut aussi des interneurones respiratoires projetant dans le bulbe caudal et vers la moelle épinière (Bystrzycka, 1980; Bianchi & Barillot, 1982). Parmi ces interneurones, certains sont caractérisés par une décharge expiratoire croissante et forment un groupe appelé complexe Bötzinger (Feldman, 1986). Ces neurones envoient des collatérales axonales qui vont connecter d'autres régions du VRGr et du VRGi (Otake et al., 1987).

Les neurones du VRG sont particulièrement résistants à l'isolement du tronc cérébral in vitro. Une région proche du complexe Bötzinger a été fortement impliquée dans la rythmogénèse respiratoire in vitro (Smith et al., 1991). Au cours de cette étude, il a été montré que lorsque des sections coronales successives étaient effectuées sur un tronc cérébral de rat nouveau-né isolé in vitro, l'activité respiratoire enregistrée cessait lorsqu'une région immédiatement caudale au complexe Bötzinger était lésée. Cette aire est nommée « complexe pré-Bötzinger » (pBC). D'autres expériences ont démontré l'existence d'une région équivalente (Oku et al., 1992), localisée entre le noyau rétro-facial et la partie rostrale du noyau ambigu. Le complexe pré-Bötzinger contient des neurones qui déchargent lors de la transition entre l'inspiration et l'expiration, ces neurones envoient des projections vers d'autres aires respiratoires du tronc cérébral en particulier le DRG, le VRGi et le complexe Bötzinger. Plus récemment, il a été mis en évidence que le pBC pouvait être à l'origine des différentes activités respiratoires, que ce soit l'eupnée, le hoquet ou le soupir (Lieske et al., 2000). D'autre part, des neurones pacemakers inspiratoires, capable de générer un rythme de façon autonome, ont été identifiés à l'intérieur du pBC (Johnson et al., 1994; Koshiya & Smith, 1999; Thoby-Brisson & Ramirez, 2001). Il semble que ces neurones représentent une sous-population du pBC caractérisée par l'expression du récepteur membranaire à la neurokinine-1 (NK1-R) et du récepteur µ aux opioïdes (Gray et al., 1999). Des expériences d'ablation sélective des neurones NK1-R positifs in vivo entraînent chez le rat l'apparition d'une respiration instable et très irrégulière, accompagnée de valeurs très altérées du pH et des taux gazeux sanguins, ainsi que des réponses anormales aux tests hypoxique et hyperoxique (Gray et al., 2001). Certains neurones pacemakers portent à leur surface une conductance cationique activée par l'hyperpolarisation et induisant un courant entrant dépolarisant, connu sous le nom de courant Ih (Thoby-Brisson et al., 2000a). Ce courant participe aux phénomènes autorythmiques dans d'autres structures telles que l'hippocampe et le cœur. Cependant, son inhibition in vitro ne perturbe pas l'activité des neurones pacemakers respiratoires (Thoby-Brisson et al., 2000a). D'autres études, basées sur des expériences de simulation computationnelle (Butera et al., 1999a,b) proposent qu'un courant sodique persistant I(NaP) soit particulièrement important pour reconnaître les neurones pacemakers (Del Negro et al., 2001 ; Del Negro et al., 2002a), cependant comme dans le cas du courant Ih, le blocage de I(NaP) in vitro n'affecte pas la rythmogenèse respiratoire (Del Negro et al., 2002b). Une des caractéristiques des neurones pacemakers pourrait être leur capacité à générer un rythme autonome et à maintenir leur potentiel membranaire dans une grande gamme de concentration extracellulaire en potassium, due à des propriétés membranaires
« stabilisatrices » (Tryba et al., 2003). Les neurones pacemakers ne représentent qu'une faible fraction des neurones du pBC, dont la plupart, bien que déchargeant de façon synchronisée avec la décharge inspiratoire enregistrée au niveau de la racine motrice du nerf hypoglosse, sont des interneurones propriobulbaires qui sont entraînés par les neurones pacemakers.

Les neurones du pBC portent à leur surface des récepteurs pour un grand nombre de neurotransmetteurs ou neuromodulateurs. Les neurones NK1-R positifs reçoivent entre autres des connexions excitatrices glutamatergiques (Liu et al., 2001 ; Liu et al., 2003) et inhibitrices GABAergiques et glycinergiques (Liu et al., 2001 ; Liu et al., 2002). Il a été établi que les agonistes cholinergiques participait aussi à la régulation du rythme respiratoire au niveau du pBC, grâce à l'expression de récepteurs muscariniques et nicotiniques par les neurones du pBC (Shao & Feldman, 2000, 2001, 2002). Il semble que la synchronisation de décharge des pacemakers soit obtenue par des mécanismes glutamatergiques (Johnson et al., 1994 ; Rekling et al., 2000), tandis que la glycine intervient dans les mécanismes d'inhibitions réciproques entre les neurones inspiratoires et expiratoires (Shao & Feldman, 1997).

Les modèles les plus actuels pour schématiser la génération du rythme respiratoire au sein du tronc cérébral tiennent compte à la fois de la propriété pacemaker de certains neurones et aussi de l'effet de réseau obtenu par la multiplicité des connexions établies entre les différents neurones répartis dans plusieurs groupes respiratoires (Smith et al., 2000). En effet, les études de simulation prévoient l'importance d'une population de neurones autorythmiques, capables de générer un rythme de façon spontanée et couplés entre eux afin de synchroniser la décharge respiratoire (Butera et al., 1999a,b). Cependant, les études montrant que le blocage des courants susceptibles d'apporter la propriétés d'auto-rythmicité aux neurones n'affecte pas la rythmogenèse respiratoire *in vitro* favorisent plutôt le rôle du réseau neuronal (Del Negro et al., 2002b). Toutefois, la diversité des techniques utilisées *in vivo*, *in vitro* et *in silico*, ainsi que les différences observées entre ces préparations (Richter & Spyer, 2001) ne permettent pas de choisir définitivement un modèle réaliste et solide de la rythmogenèse respiratoire dans le bulbe caudal.

3.2.2 Les chémorécepteurs centraux de la face ventrale (Figure 4).

La chémosensibilité centrale a été soupçonnée lors d'expériences sur des animaux totalement déafférentés qui présentaient malgré tout une réponse respiratoire à la baisse de pH et à l'hypercapnie. Les changements de la PaO₂ sur ces mêmes individus n'entraînent qu'une très faible réponse ventilatoire. Les premiers potentiels d'action évoqués par la stimulation chimique des centres respiratoires, en l'occurrence avec le CO₂, ont été obtenus par von Euler

et Soederberg sur des préparations de tronc cérébral complètement dénervé (von Euler & Soederberg, 1952a,b). Ensuite, les expériences de Leusen (1954a,b) montrent qu'une injection de solutions acides dans le ventricule entraîne une réponse respiratoire. Loeschcke et al. (1958) démontrent que ce sont les ion H^+ qui sont les stimuli des chémorécepteurs centraux en injectant des solution à bas pH mais à CO₂ constant dans le 4^e ventricule, et en observant la réponse respiratoire qui consiste en une augmentation du volume courant. Inversement, l'emploi de solutions à pH constant mais à forte teneur en CO₂ n'induit qu'une faible diminution du volume courant. Ainsi, ces auteurs ont à la fois proposé que les ions H⁺ jouaient le rôle de signal pour les chémorécepteurs centraux et que ceux-ci se trouvaient à la surface du tronc cérébral puisque le CO₂, qui peut diffuser rapidement et profondément ne provoque pas de réponse importante. La première description d'une zone chémosensible à la surface du bulbe situe celle-ci caudalement à la limite bulbo-pontique, et cette région sera par la suite nommée « zone M » (Mitchell et al., 1963). Des études complémentaires ont prouvé l'existence d'autres régions centrales chémosensibles : la zone M est la plus rostrale, la zone S est une zone intermédiaire (Schlaefke & Loeschcke, 1967), la zone L est la partie caudale (Loeschcke et al., 1970). Les réponses ventilatoires obtenues lors des différentes expériences permettent de proposer l'hypothèse selon laquelle les aires M et L convergent vers la zone S avant de projeter vers les régions bulbaires respiratoires. Cependant, il n'existe pas pour l'instant de support anatomique ou cellulaire autorisant l'identification d'une population neuronale impliquée directement dans les réponses centrales chémosensibles. La chémosensibilité centrale, testée in vitro chez le rat fait intervenir les systèmes cholinergiques, particulièrement les récepteurs muscariniques (Nattie et al., 1989; Monteau et al., 1990). Chez le chat adulte in vivo, ces mécanismes cholinergiques sont retrouvés, en interaction avec les neuromodulateurs opioïdes (Trouth et al., 1993).

Plus récemment, l'existence d'un réelle chémosensibilité centrale à l'hypercapnie a été établie *in vitro*. En effet, une pression partielle en CO_2 élevée est nécessaire à l'obtention d'un rythme respiratoire régulier dans les préparations de tronc cérébral isolé. De plus, si la préparation est soumise à un milieu hypercapnique, le rythme respiratoire enregistré s'accélère (Morin-Surun et al., 1994 ; Morin-Surun et al., 1995b).

Récemment, une certaine sensibilité centrale à l'hypoxie a pu être mise en évidence au niveau du NTS. L'enregistrement intracellulaire de neurones du NTS sur tranche *in vitro* montre que certains de ces neurones répondent à une hypoxie légère par une modification de leur potentiel de membrane. Chez certains neurones, cette réponse se traduit par une hyperpolarisation et une réduction de l'activité spontanée, tandis que chez d'autres l'hypoxie

provoque une dépolarisation et une augmentation de l'activité spontanée (Pascual et al., 2002). Ces effets sont réversibles rapidement par l'action de la progestérone (Pascual et al., 2002) ce qui traduit de mécanismes non-géniques, mais d'autres travaux montrent que l'hypoxie légère déclenche *in vivo* des phénomènes géniques (Pascual et al., 2001). D'autres études proposent que le complexe pré-Bötzinger lui-même soit un site chémosensible participant à une réponse centrale à l'hypoxie (Solomon et al., 2000). Les neurones pacemakers seraient responsables de l'augmentation de la fréquence respiratoire observée sous hypoxie, puisque ceux-ci répondent à l'hypoxie en augmentant transitoirement leur fréquence de décharge, puis soit en étant inactifs, soit en revenant à un rythme plus faible (Thoby-Brisson & Ramirez, 2000b), mimant ainsi la réponse biphasique à l'hypoxie du réseau respiratoire entier.

3.2.3 Le noyau rétrotrapézoïde.

Le noyau rétrotrapézoïde est situé à proximité de la surface ventrale du bulbe chez le chat, près de la limite bulbo-pontique. Les neurones de ce noyau établissent des connexions monosynaptiques avec le VRG et le DRG (Smith et al., 1989 ; Nunez-Abades et al., 1993 ; Bodineau et al., 2000a). Les neurones du noyau rétrotrapézoïde modulent la respiration chez le chat (Connelly et al., 1990) et chez le rat (Pearce et al., 1989). La stimulation électrique de ces neurones au milieu de l'expiration provoque un recyclage (« resetting ») du cycle respiratoire induisant le déclenchement prématuré de l'inspiration (Connelly et al., 1990). La micro-injection de glutamate dans le noyau rétrotrapézoïde conduit à une augmentation de l'activité respiratoire enregistrée au niveau du nerf phrénique (Nattie & Li, 1994) tandis que l'application d'un antagoniste du glutamate diminue l'amplitude de l'activité inspiratoire du nerf phrénique (Nattie et al., 1993). Les lésions électrolytiques ou chimiques, par application d'acide kaïnique, du noyau rétrotrapézoïde provoquent une diminution de l'activité respiratoire pouvant finalement aboutir à une apnée chez le chat (Nattie et al., 1991), tandis qu'elles n'ont pas d'effet sur la respiration de base chez le rat (Akilesh et al., 1997). Il semblerait que ce noyau soit aussi impliqué dans les phénomènes de chémosensibilité. En effet, il a été observé qu'une hypercapnie induisait une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du noyau rétrotrapézoïde chez le chat (Nattie et al., 1993a) et chez le rat éveillé (Li et al., 1999), et que cette réponse est abolie lors de lésions de ce noyau (Nattie et al., 1991 ; Nattie & Li, 1994b ; Akilesh et al., 1997). La sensibilité du noyau rétrotrapézoïde au CO₂ semble toutefois liée très étroitement à la vigilance de l'animal (Li et al., 1999; revue par Nattie, 2001).



Fig. 5. Le réseau respiratoire des mammifères est construit comme un arc réflexe.

Le rythme généré dans le groupe respiratoire ventral (VRG), au sein du complexe pré-Bötzinger, est transmis aux motoneurones phréniques par l'intermédiaire de neurones prémoteurs bulbospinaux. Le diaphragme, innervé par le nerf phrénique se contracte en suivant ce rythme généré centralement. Le pont et les afférences sensorielles modulent le rythme, en particulier les afférences qui projettent dans le groupe respiratoire dorsal (DRG), en provenance des chémorécepteurs périphériques et des récepteurs à l'étirement des poumons. Le réseau respiratoire est donc conçu comme un arc réflexe, comprenant une sortie motrice commandée par un circuit central et des régulations sensorielles adaptant la fonction ventilatoire aux paramètres environnementaux.

Cv: cervelet, Cx: cortex, Me: moelle épinière, Pn: pont.

En réponse à une hypoxie, les neurones respiratoires sont tout d'abord excités puis une dépression de ces neurones est observée. Les neurones du noyau rétrotrapézoïde qui produisent une activité tonique présentent une augmentation de leur activité au cours de ces deux phases chez le chat (Bodineau et al., 2000b) et chez le rat *in vitro* (Bodineau et al., 2000c), ce qui suggère qu'ils interviennent dans la dépression respiratoire liée à l'hypoxie, bien que certains auteurs n'obtiennent aucun effet de la lésion du noyau rétrotrapézoïde sur la réponse à l'hypoxie *in vivo* (Akilesh et al., 1997). L'expression du facteur de transcription Fos comme marqueur d'activité lors de situations d'hypoxie confirme le rôle du noyau rétrotrapézoïde dans la réponse à l'hypoxie *in vivo* (Bodineau ét al., 2001).

L'étude de la rythmogenèse respiratoire peut être abordée par des approches variées et complémentaires, et nous avons utilisé des observations réalisées in vivo et in vitro pour accomplir les travaux présentés dans cette thèse. L'approche in vitro, malgré ses limitations, devient primordiale pour détailler et localiser certains mécanismes au sein du réseau neuronal respiratoire du tronc cérébral. Toutefois, le fait que certains groupes importants du réseau, tels que le DRG et le PRG, ne fonctionnent pas normalement in vitro devra être pris en compte, ainsi que l'absence des systèmes de contrôle chémosensibles périphériques.

In vivo, les différents groupes respiratoires en liaison avec les différentes afférences chémosensorielles contribuent à la production d'un rythme respiratoire normal, caractérisé par sa fréquence et son amplitude, le volume courant. Une anomalie dans le fonctionnement de ces groupes respiratoires ou dans leurs inter-connexions peut donc entraîner des anomalies respiratoires observables in vivo et même in vitro si le groupe concerné est actif. L'importance des afférences sensorielles centrales et périphériques est soulignée par le fait que le rythme respiratoire in vivo et in vitro s'arrête quand la PaCO₂ circulante est réduite. Le réseau neuronal respiratoire dans son ensemble, pourvu d'un circuit générateur, d'une sortie motrice et d'afférences sensorielles modulatrices peut donc être assimilé à un arc réflexe complexe (Figure 5).

Le complexe pré-Bötzinger semble déclencher l'inspiration car l'élimination de ce dernier in vitro entraîne l'arrêt de l'activité respiratoire. Le PRG et les afférences pulmonaires interviennent dans l'arrêt de l'inspiration et dans la transition de phase entre l'inspiration et l'expiration in vivo puisque la destruction du PRG ou le blocage des récepteurs NMDA conduit à un type de respiration dite « apneustique » caractérisée par des temps d'inspiration très longs. Enfin, de nombreux neuromodulateurs en provenance de divers groupes neuronaux du tronc cérébral régulent le rythme respiratoire : les agonistes cholinergiques modifient les décharges des neurones du complexe pré-Bötzinger ; les neurones noradrénergiques du groupe A5 inhibent le VRG de façon importante, et cette inhibition peut être levée in vitro en réalisant une section ponto-bulbaire ; les opioïdes endogènes semblent intervenir pour coordonner l'activité des neurones inspiratoires du pré-Bötzinger avec les neurones pré-I du groupe respiratoire para-facial de façon à obtenir un rythme stable et régulier.

Chapitre 2

Le développement du tronc cérébral : du tube neural régionalisé à un réseau neuronal cohérent.

Chez les vertébrés, le système nerveux central se développe à partir d'un tube clos, issu de l'ectoderme et localisé dans la partie dorsale de l'embryon, appelé tube neural. Cette position dorsale et centrale du système nerveux est une caractéristique des animaux dits « épineuriens », qui constituent le phylum des Chordés, dont les vertébrés font partie. La première étape du développement du système nerveux central consiste en l'induction neurale, c'est-à-dire la spécification au sein des cellules de l'ectoderme du programme de différenciation neurale. Au cours de la gastrulation, un épaississement de l'ectoderme forme la plaque neurale, composée de cellules neuroépithéliales. Cette plaque neurale s'établit sous l'action de signaux issus du mésoderme et de la notochorde. La partie antérieure de cette plaque, plus large, correspond au futur encéphale tandis que la partie postérieure, plus étroite, constitue la future moelle épinière. Pendant l'étape de neurulation, la plaque neurale se creuse le long de l'axe antéro-postérieur et se referme dorsalement pour former le tube neural, qui s'isole sous l'ectoderme adjacent.

Dès que le tube neural est formé, sa partie antérieure se divise en trois vésicules : la plus antérieure ou prosencéphale va se développer en hémisphères cérébraux, ganglions de la base, hypothalamus et thalamus, le cerveau moyen ou mésencéphale d'où proviennent notamment les relais des voies optiques (tels que les toits optiques) et le noyau oculomoteur (3^e paire de nerfs crâniens) et le cerveau postérieur ou rhombencéphale qui est à l'origine du tronc cérébral et dont la partie antérieure, appelée métencéphale participe avec la partie postérieure du mésencéphale à la mise en place du cervelet. Le tronc cérébral contient une grande partie des neurones formant l'arc réflexe du réseau respiratoire (Figure 5), son développement est donc susceptible d'influencer la physiologie ventilatoire après la naissance.

Le tube neural subit ensuite des étapes de régionalisations qui induisent différentes populations neuronales en fonction de l'emplacement des progéniteurs neuraux. Au sein du tronc cérébral, deux régionalisations jouent des rôles particulièrement importants : la régionalisation dorso-ventrale et la segmentation le long de l'axe antéro-postérieur. De nombreux autres mécanismes, tels que la neurogenèse et la mort cellulaire programmée interviennent tout au long de la vie embryonnaire pour transformer le neuroépithélium primordial en un réseau de neurones complexe et fonctionnel, intégrant une grande diversité de connexions, de types neuronaux et de propriétés membranaires et synaptiques différentes.

1. Un exemple de régionalisation : la régionalisation dorsoventrale et son contrôle.

Il est connu que lors du développement du système nerveux central, des signaux en provenance de la plaque du plancher et de la notochorde d'une part, et de la plaque du toit d'autre part interviennent dans la spécification des identités dorso-ventrales au sein du tube neural. Parmi les signaux ventraux ou « ventralisants », secrétés par la plaque du plancher et la notochorde, la protéine diffusible Sonic Hedgehog (Shh), joue un rôle central (Ericson et al., 1995). Le gène shh est un homologue de hedeghog (hh), gène de la drosophile impliqué dans la détermination de la polarité des segments (Lee et al., 1992). Les signaux dorsaux et « dorsalisants » comprennent plusieurs membres de la famille BMP (Bone Morphogenetic Protein) en particulier BMP4 et 7 (Liem et al., 1995 ; Tanabe & Jessell, 1996), de la famille Pax, parmi lesquels Pax3, Pax6, Pax7 (Tanabe & Jessell, 1996) et localement de la famille Wnt (homologues de wingless, wng, Tanabe & Jessell, 1996). Selon les hypothèses actuelles, les signaux dorsaux et ventraux constituent deux gradients opposés, régulant l'expression différentielle de gènes de différenciation au sein des populations de progéniteurs neuronaux le long de l'axe dorso-ventral. Comme pour les gènes *Hox* et l'acide rétinoïque (voir plus loin), ces gènes présentent des sensibilités graduelles à Shh ou aux BMP définissant des domaines d'expression bien définis avec des limites franches, à l'instar de ce qui est observé dans les rhombomères (Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 1999). En particulier, il apparaît que les gènes dont l'expression est réprimée ventralement par Shh, tels que Pax3 et Pax7, sont les mêmes que ceux qui répondent positivement à la signalisation BMP (Liem et al., 1995). Cependant, aucune frontière analogue à celles établies entre les rhombomères, qui restreignent les migrations cellulaires (voir plus loin), n'a été jusqu'à présent mise en évidence entre ces différents domaines dorso-ventraux.

Des études plus récentes, principalement menées au niveau de la moelle épinière embryonnaire ventrale montrent que les gènes peuvent être classés en deux groupes : le



Fig. 6. Régionalisation dorso-ventrale du tube neural : exemple de la moelle épinière embryonnaire.

A. Répartition de différents gènes impliqués dans la régionalisation dorso-ventrale. La ligne pointillée représente la ligne centrale de l'embryon. Les expressions différentielles de ces gènes définissent 5 domaines ventraux de progéniteurs, de p3, le plus ventral à p0 le plus dorsal.

B. Mécanismes de formation des domaines de progéniteurs. Sous l'influence de Sonic Hedgehog (Shh) en provenance de la plaque du plancher, certains gènes sont réprimés (classe I) ou induits (classe II). Ensuite, les produits de ces gènes s'inhibent réciproquement pour former des limites franches, créant ainsi des domaines d'expression.

C. Les domaines de progéniteurs donnent naissance à des sous-types précis de neurones en activant l'expression de facteurs de transcription spécifiques à chaque domaine : par exemple, le domaine p3, induit par l'expression de Nkx2.2, exprime ensuite des marqueurs d'interneurones V3, tels que Sim1. PP : plaque du plancher. (Selon Briscoe et al., 2000).

Ces observations montrent que plusieurs types neuronaux se forment à un même niveau antéro-postérieur du tube neural. En particulier, l'ensemble de l'arc réflexe comprenant les neurones sensoriels, les interneurones (V0-V3) et les motoneurones (MN) implique une régionalisation dorso-ventrale. groupe I contient les gènes dont l'expression est inhibée par Shh, le groupe II réunit les gènes qui sont régulés positivement par Shh (Briscoe et al., 2000). Les domaines dorso-ventraux sont établis par les interactions négatives réciproques entre un gène de groupe I et un autre gène de groupe II, comme dans le cas de *Pax6* (classe I) et *Nkx2.2* (classe II, Ericson et al., 1997 ; Briscoe et al., 2000). Les différents facteurs d'une même classe n'ont pas les mêmes limites d'expression. Ainsi, dans le tube neural ventral de la moelle, cinq domaines sont ainsi définis par l'expression d'une combinaison de cinq facteurs de transcription de classe I (Pax7, Irx3, Dbx1, Dbx2, Pax6) et deux protéines de classe II, Nkx6.1 et Nkx2.2 : p3, le plus ventral, pMN, p2, p1, p0 étant le plus dorsal (Briscoe et al., 2000, Figure 6). Les domaines progéniteurs p3, p2, p1 et p0 donnent ensuite naissance à différentes classes d'interneurones (appelés respectivement interneurones V3, V2, V1 et V0) caractérisés par leur trajet axonal et les progéniteurs du domaine pMN se différencient en motoneurones. Ces programmes de différenciation sont mis en œuvre sous l'influence de facteurs de transcription induits spécifiquement dans chaque domaine par la combinaison des facteurs de classe I et II (Briscoe et al., 2000; Pierani et al., 2001; Vallstedt et al., 2001). Ces facteurs de transcription comprennent les gènes evx1 (V0), en1 (V1), Chx10 (V2), des gènes à homéodomaine des familles *lim* comme *lim3* et *Isl1/2* (MN) et *mnx* (*mnr2*, *hb9*) et le gène *phox2b* (Figure 6). L'expression différentielle de plusieurs de ces gènes intervient de plus dans le choix du soustype de motoneurone (Tanabe et al., 1998 ; William et al., 2003)

Au niveau du rhombencéphale, la situation est plus complexe. Les domaines et les gènes qui les définissent sont retrouvés de façon quasi-identique à ce qui est observé dans la moelle. Cependant, il n'existe pas de domaine pMN au niveau du rhombencéphale rostral, le domaine p3 étant à l'origine (Ericson et al., 1997; Tanabe et al., 1998) des motoneurones branchiaux (innervant le muscle strié issu des arcs branchiaux) et viscéraux (innervant le muscle lisse viscéral). De plus, il existe des différences d'expression des gènes selon l'axe antéro-postérieur, puisque les mêmes sous-types neuronaux ne sont pas induits à tous les niveaux du rhombencéphale : par exemple les rhombomères r2-r4 ne renferment que des motoneurones branchiaux, alors que les rhombomères plus postérieurs (r5-r8) contiennent les trois types de motoneurones : branchiaux, viscéraux et somatiques (innervant le muscle strié issu des somites).

2. Le rhombencéphale segmenté, une compartimentation anatomique.

Le tronc cérébral contient les neurones réticulaires nécessaires à la génération du rythme respiratoire chez les mammifères. Cette partie du système nerveux central subit un processus de développement embryonnaire particulier, conservé dans toute la phylogénie des vertébrés. Il s'agit d'une segmentation transitoire en compartiments cellulaires distincts, appelés rhombomères, qui sont des territoires clonaux, représentant une régionalisation génique et anatomique le long de l'axe antéro-postérieur (Fraser et al., 1990 ; Lumsden et al., 1994 ; revu par Lumsden & Krumlauf, 1996). Cette segmentation joue un rôle particulièrement décisif dans la détermination des identités cellulaires et dans la future organisation des circuits neuronaux du tronc cérébral. Des études précédentes ont montré que la perturbation de la segmentation pouvaient avoir des conséquences sur la physiologie respiratoire (Jacquin et al., 1996 ; Domínguez del Toro et al., 2001).

Chez tous les vertébrés, le rhombencéphale contient la majorité des paires de nerfs crâniens, en particulier pour les mammifères, les paires IV (trochléaire) à XII (hypoglosse) y sont présentes. De même, la stratégie précoce de développement du rhombencéphale est identique et très conservée chez tous les vertébrés et consiste en une étape transitoire de segmentation le long de l'axe antéro-postérieur, similaire aux mécanismes observés lors du développement de l'embryon de drosophile. Cette segmentation a lieu à un stade très précis du développement embryonnaire, appelée stade phylotypique, pendant lequelle les embryons de toutes les classes de vertébrés présentent la particularité de se ressembler, ce qui n'est le cas ni avant, ni après ce stade (cf. publication 3). En effet, les premières divisions cellulaires de l'œuf sont très différentes selon les espèces, et les embryons ou les fœtus présentent déjà certaines caractéristiques de leur espèce lors d'étapes plus tardives du développement. Cette segmentation conduit à la formation de 7 ou 8 compartiments distincts, appelés rhombomères numérotés de 1, le plus antérieur à 8, le plus postérieur, limitrophe de la moelle épinière (r1 à r8). Elle est étroitement associée aux arcs branchiaux, structures embryonnaires caractéristiques des chordés, qui sont l'ébauche du système des branchies chez les poissons et des structures maxillo-faciales et du cou chez les mammifères.

La segmentation débute vers la troisième semaine de grossesse chez l'humain, au jour embryonnaire 8 (E8) chez la souris et à E1,5 chez le poulet (stade 9 selon Hamburger et Hamilton, HH9). Le processus de segmentation est achevé au stade 12 chez le poulet (E8,5



Fig. 7. La segmentation du rhombencéphale, une compartimentation anatomique (d'après Lumsden, 1990).

Vue dorsale du rhombencéphale segmenté d'un embryon de poulet au stade HH21 montrant les correspondances anatomiques entre les rhombomères (r1 à r8), les noyaux branchiomoteurs (à droite, 5, 7, 9, 10, 11), les arcs branchiaux (b1 à b3), les noyaux moteurs somatiques (à gauche, 4, 6, 12) et les ganglions des nerfs crâniens (g5 à g10). fp : plaque du plancher (floor plate), i : isthme, ov : vésicule otique, 9 : noyau moteur glossopharyngien, 10 : noyau moteur du vague, 11 : noyau moteur spinal. Noter la relation anatomique stricte des noyaux branchiomoteurs et des rhombomères avec les points de sorties des nerfs 5n, 7n et 9n respectivement dans les rhombomères pairs r2, r4 et r6. Les régions respiratoires (cf. Figure 3) appartiennent aux domaines trigéminaux (A5), facial (pFRG) ou vagal-glossopharyngien (VRG, DRG, pBC).

chez la souris) et les rhombomères ne sont plus visibles dès le stade 24 (E4,5) chez le poulet, à E11,5 chez la souris et à la fin du premier mois de grossesse chez l'humain. Au cours de ce processus, un grand nombre de neurones et de structures neuronales sont générés au sein du rhombencéphale. La segmentation persiste au sein de l'épithélium germinatif jusqu'au stade 36 chez le poulet (Wingate & Lumsden, 1996). Cet épisode de segmentation, qui ressemble à la métamérie des invertébrés, détermine le devenir des neurones issus de chaque rhombomère en fixant pour chaque cellule une information de position qui va spécifier sa participation à des circuits neuronaux précis.

2.1 La segmentation : une compartimentation anatomique du rhombencéphale.

La segmentation se produit au sein du rhombencéphale déjà formé, c'est-à-dire qu'il s'agit de la restriction d'un territoire en territoires plus petits et pas de la formation de nouvelles unités par bourgeonnement et extension du tube neural (voir revue Lumsden, 1990). Les premières restrictions, qui apparaissent au stade HH9 chez le poulet, vont délimiter la paire de rhombomères r4 / r5. Ensuite, des constrictions plus tardives vont séparer les territoires restants en rhombomères uniques. Les premiers neurones à apparaître et à étendre leur axone au sein du rhombencéphale sont des neurones réticulaires. Ces neurones apparaissent d'abord dans les rhombomères pairs au stade 11/12 (Lumsden & Keynes, 1989), puis dans les rhombomères impairs au stade suivant. Ce déséquilibre dans les populations neuronales des rhombomères pairs et impairs s'accentue au stade 16, lors de l'apparition de neurones moteurs au sein des rhombomères pairs puis s'estompe finalement au stade 17, quand les rhombomères impairs produisent à leur tour des neurones moteurs.

La segmentation produit au niveau du rhombencéphale une organisation anatomique très précise des neurones. En effet, 8 types de neurones réticulaires, classés en fonction du trajet de leur projection axonale, sont réitérés dans chaque rhombomère (Clarke & Lumsden, 1993), certains types étant plus abondants dans certains compartiments que dans d'autres. De même, l'organisation des neurones branchiomoteurs suit un schéma répétitif basé sur une séquence de deux rhombomères. Pour chaque noyau branchiomoteur, le point de sortie du nerf moteur est situé dans un rhombomère pair antérieur, les corps cellulaires des neurones branchiomoteurs étant localisés au sein de ce rhombomère pair et du rhombomère impair immédiatement postérieur (Figure 7). Ainsi, le noyau moteur trijumeau (V) dérive des rhombomères 2 et 3, le point de sortie du nerf trijumeau est situé dans r2, le noyau moteur



Fig. 8. La segmentation du rhombencéphale : une régionalisation génique.

Vue sagittale d'un embryon de souris à E9 montrant le rhombencéphale segmenté en 8 rhombomères (r1 à r8, partie grisée) et la correspondance des frontières rhombomériques avec les limites des domaines d'expression de certains gènes impliqués dans l'induction, le maintien de la segmentation et la spécification des identités rhombomériques. Ces signalisations moléculaires concernent soit des facteurs de transcription (*Krox20, MafB/kreisler, Hox*) ou des protéines membranaires (*Eph / ephrine*). Noter que les nerfs branchiomoteurs innervent un arc branchial défini. d : diencéphale, m : mésencéphale, t : télencéphale, vo : vésicule otique. Les nerfs crâniens sont indiqués en chiffres arabes : 3 : oculaire moteur commun, 4 : trochléaire, 5 : trijumeau, 7 : facial, 9 : glossopharyngien, 10 : vague.

facial (VII) provient de r4 et r5 et le noyau moteur glossopharyngien (IX) provient de r6 et r7 (Lumsden & Keynes, 1989 ; Clarke & Lumsden, 1993).

Une fois que les limites des rhombomères ont disparu, l'origine rhombomérique des cellules devient plus difficile à déterminer. En effet, la proportion de chaque type réticulaire peut varier au sein de chaque rhombomère, les cellules se mélangent, certains groupes de neurones moteurs suivent des migrations importantes au sein du rhombencéphale. Cependant, des expériences de cartographie du devenir cellulaire, obtenues par greffes homotopiques caille / poulet (Marin & Puelles, 1995), montrent qu'il est possible de déterminer l'origine rhombomérique de certaines populations neuronales adultes du tronc cérébral.

2.2 La segmentation : la restriction de compartiments distincts.

Cette compartimentation anatomique et morphologique du futur tronc cérébral, qui pose les bases des relations entre les cellules et qui définit l'identité de chaque cellule sur la base de sa position selon l'axe antéro-postérieur, est étroitement liée et contrôlée par un processus de segmentation génétique et moléculaire. Chaque rhombomère constitue en effet un territoire distinct de ses voisins dont il est séparé par les frontières. Au sein de ce territoire, les cellules sont exposées à l'expression de gènes particuliers et spécifiques qui participent à l'élaboration et au maintien de la segmentation, mais aussi à la détermination de l'identité rhombomérique. Les zones frontières semblent provenir de régions du rhombencéphale où la prolifération cellulaire est moins intense, créant ainsi des constrictions entre des zones où la prolifération est plus importante : la mise en place de l'aspect segmenté du rhombencéphale serait due à des phénomènes de prolifération « segmentée ». Ces frontières empêchent le mixage et la libre migration des cellules tant que la segmentation est maintenue, chaque rhombomère devient donc un compartiment de lignage cellulaire au sein duquel les cellules en division sont restreintes et ne peuvent pas interagir avec les cellules de rhombomères voisins, mais uniquement avec des cellules à l'intérieur du même rhombomère. La composition de ces frontières reste encore largement inconnue, même s'il paraît de plus en plus évident que les molécules de la famille des ephrines et de leurs récepteurs Eph soient impliquées (Gilardi-Hebenstreit et al., 1992 ; Becker et al., 1994). Ces protéines membranaires sont exprimées au niveau des rhombomères de façon différentielle : EphA4, EphB2 et EphB3 dans les rhombomères 3 et 5, ephrinB1, B2 et B3 dans les rhombomères 2, 4 et 6 (Figure 8, Xu et al., 1999). Au niveau des zones de contact entre rhombomères pairs et impairs, le contact des ephrines avec leurs récepteurs crée des zones de répulsion et empêche le mélange des cellules

provenant de rhombomère de parité différente, selon Mellitzer et al. (1999). Cependant, il semble que ce mécanisme n'explique pas tous les phénomènes d'exclusion puisque des cellules issues de rhombomères différents mais de même parité (r3 et r5 ou r2 et r4) peuvent se mélanger alors qu'elles n'ont pas la même identité. Les gènes codant pour les protéines Eph et ephrines sont sous le contrôle de gènes maîtres de la segmentation, tel *Krox20* (Seitanidou et al., 1997 ; Theil et al., 1998), il apparaît donc que les frontières sont mises en place par le phénomène de segmentation lui-même et qu'elles ne sont pas pré-existantes à la segmentation.

L'analyse de l'expression de gènes précoces de développement chez l'embryon au moment où les rhombomères et leurs frontières sont encore visibles nous indique que l'expression de certains gènes semble restreinte très spécifiquement à des territoires rhombomériques précis. Ainsi, de nombreux gènes ont été identifiés, pour lesquels les frontières rhombomériques constituent aussi les limites d'expression (Figure 8) : le gène *Hoxb1* dont l'expression est réduite au rhombomère 4 chez la souris (Studer et al., 1994 ; Popperl et al., 1995), *Krox20* qui ne s'exprime que dans r3 et r5 (Schneider-Maunoury et al., 1993), *MafB/kreisler* limité à r5 et r6 (Cordes & Barsh, 1994), *Hoxa2* dont la limite antérieure d'expression correspond à la frontière entre r1 et r2 (Rijli et al., 1993).

2.3 La segmentation et les crêtes neurales, relations avec les arcs branchiaux.

La segmentation du rhombencéphale est liée aux arcs branchiaux, qui sont présents au stade phylotypique, lorsque la segmentation a lieu. Ces structures caractéristiques des chordés, qui sont à l'origine d'une grande partie des structures maxillo-faciales et subthoraciques, se présentent chez les embryons des différentes classes de vertébrés sous la forme de renflements. Les trois premiers arcs s'établissent au même niveau antéro-postérieur que le rhombencéphale, chaque arc étant étroitement en relation avec une paire de rhombomères (Figures 7 et 8). Ainsi, le premier arc branchial est positionné face à r2/r3, le second face à r4/r5, et le troisième face à r6/r7 (Figure 7, Lumsden, 1990). De plus, chaque nerf branchiomoteur, provenant, comme vu précédemment, des mêmes paires de rhombomères, innerve un arc branchial précis : le nerf trijumeau innerve le premier arc, le nerf facial le second arc, et le nerf glossopharyngien innerve le troisième.

Les cellules des crêtes neurales, d'origine neuro-ectodermique, provenant de zones à proximité du toit du tube neural, sont capables de se détacher du tube et de migrer

ventralement et latéralement dans le mésoderme environnant tout au long de l'axe antéropostérieur. Chaque rhombomère donne naissance à des crêtes neurales dont les cellules migrent au sein des arcs branchiaux. Ces crêtes neurales sont à l'origine de nombreux dérivés, en particulier les cellules gliales associées aux nerfs branchiomoteurs, une partie des neurones des ganglions sensoriels crâniens ainsi que le mésectoderme des arcs branchiaux (Le Lievre & Le Douarin, 1975 ; Le Lievre, 1978 ; Noden, 1983 ; revue par Bronner-Fraser, 1994). Ce mésectoderme donne naissance aux os constituant les mâchoires et le squelette facial, aux cartilages et à une partie de la vascularisation des arcs branchiaux, le mésoderme céphalique ayant surtout un potentiel myogénique (Couly et al., 1992). Il existe chez le poulet et la souris des phénomènes d'apoptose différentielle qui touchent en particulier les crêtes neurales issues des rhombomères 3 et 5 (Graham et al., 1993 ; Ellies et al., 2002). Sous l'influence de signaux en provenance des rhombomères pairs, en particulier de r4, BMP4 et *msx2* sont exprimés en r3 et r5 et induisent l'apoptose des cellules de crête neurale qui dérivées de r3 et r5 (Graham et al., 1994 ; Ellies et al., 2000). Ainsi, chez le poulet et la souris, le premier arc n'est colonisé que par des cellules de crête neurale de r1 et r2, le second arc majoritairement par des cellules de r4, le troisième par des crêtes neurales issues de r6 et r7 (Lumsden et al., 1991). Par ailleurs, des études montrent que la régionalisation des arcs branchiaux ne dépend pas uniquement de la migration des cellules des crêtes neurales, mais fait intervenir d'autres tissus, comme l'endoderme (Couly et al., 2002), le mésoderme ainsi que l'ectoderme de surface. L'expression du gène *Hoxa2* semble particulièrement déterminante dans le contrôle de ce processus de régionalisation des arcs branchiaux (voir revue Trainor & Krumlauf, 2001).

La segmentation du rhombencéphale et son contrôle moléculaire interviennent donc directement non seulement sur la mise en place des circuits neuronaux centraux du tronc cérébral, mais aussi sur le développement des structures situées à la périphérie et innervées par les nerfs crâniens.

3. Le contrôle moléculaire de la segmentation : acteurs et rôles.

Chez l'embryon de drosophile, la segmentation de l'embryon en compartiments correspondant à la future métamérie de l'animal adulte est sous le contrôle des gènes du



Fig. 9. Les gènes *Hox*, homologues des gènes du complexe HOM/C de la drosophile, sont impliqués dans la segmentation.

Haut : vue schématique d'un embryon de drosophile, présentant la segmentation antéro-postérieur de l'organisme et les gènes spécifiques à chaque segment qui s'y expriment. Le complexe HOM/C est constitué de deux ensembles, ANT/C : lab : *labial*, pb : *proboscipedia*, Dfd : *deformed*, Scr : *sex combs reduced*, Antp : *antennapedia*, et BX/C : Ubx : *ultrabithorax*, AbdA/B : *abdominal* A/B.

Bas : relations existant entre les gènes du complexe HOM/C de drosophile et les gènes des complexes *Hox* de l'amphioxus, un chordé non vertébré et de la souris. Les gènes de complexes différents mais ayant la même position sont appelés paralogues. Noter que les gènes importants pour la segmentation du rhombencéphale sont en position 3' (à gauche, a1-a3, b1-b3) et s'expriment plus rostralement.

complexe HOM/C, les homologues de ces gènes chez les vertébrés, appelés gènes *Hox*, participent au contrôle et au maintien de la segmentation (voir revue Krumlauf, 1994).

3.1 Les gènes homéotiques HOM/C de la drosophile et leurs homologues vertébrés, les gènes *Hox*.

3.1.1 Participation des gènes du complexe HOM/C dans la segmentation embryonnaire de l'embryon de drosophile.

Chez la drosophile, l'action des gènes homéotiques a été mise en évidence dans les années 1970, grâce à l'obtention de mutants de développement par Lewis. Ainsi, 8 gènes homéotiques ont été identifiés, formant sur le chromosome un complexe appelé HOM/C et lui-même constitué de deux sous-groupes (Figure 9) : les gènes du groupe *antennapedia* (ANT/C) régulant plutôt le développement de la partie antérieure de la drosophile (Wakimoto & Kaufman, 1981 ; Wakimoto et al., 1984) et les gènes du groupe *bithorax* (BX/C) contrôlant la mise en place des segments postérieurs correspondant au thorax et à l'abdomen (Lewis, 1978). La mutation de l'un de ces gènes produit des effets d'homéose, c'est-à-dire la transformation complète d'un segment ou d'un territoire en un autre plus antérieur ou plus postérieur. Par exemple dans le cas de la mutation du gène *antennapedia*, les animaux mutants possèdent des pattes à la place des antennes.

Les protéines codées par ces gènes sont des facteurs de transcription à homéodomaine, membres d'une famille de gènes possédant plusieurs caractéristiques communes. L'homéodomaine est formé d'un enchaînement conservé de 60 acides aminés qui constitue le domaine de liaison à l'ADN et qui est codé au niveau du gène par une séquence de bases appelée homéoboîte (ou « homeobox »). Ce domaine reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN contenant le motif 5'-TAAT-3' (voir revue Gehring et al., 1994). L'organisation de ces gènes sur le chromosome au sein du complexe HOM/C présente une particularité intéressante appelée colinéarité (Figure 9) : l'emplacement des gènes au sein du complexe reflète exactement leurs domaines d'expression selon l'axe antéro-postérieur (Lewis, 1978 ; voir revue Harding et al., 1985). De plus, tous ces gènes, à l'exception de *Dfd*, possèdent la même orientation de transcription, au contraire de ce qui est observé dans la majorité des complexes géniques. La colinéarité concerne donc aussi l'expression de ces gènes : les plus en 3' sont les gènes qui s'expriment le plus antérieurement, les gènes les plus en 5' sont les gènes qui s'expriment dans les domaines les plus postérieurs. Ainsi, l'identité de chaque segment de l'embryon de drosophile est déterminée par l'expression d'un gène du complexe

HOM/C spécifique. La perte ou le gain de fonction de ces gènes perturbe le développement en modifiant l'identité segmentaire, les segments affectés par ces transformations étant ceux où le gène s'exprime fortement habituellement.

3.1.2 Rôles des gènes Hox dans les processus de segmentation chez les vertébrés.

Dans toutes les classes de vertébrés, des complexes de gènes homologues des gènes du complexe HOM/C ont été identifiés, appelés complexes Hox. L'étonnante conservation de la séquence de l'homéodomaine au cours de l'évolution a permis d'isoler ces gènes homologues chez les vertébrés (voir revue Gehring et al., 1994). Par exemple, la séquence de l'homéodomaine du gène Hoxa7 chez l'humain ne diffère que d'un acide aminé par rapport à la séquence de son homologue présumé antennapedia. Le nombre de complexes varie en fonction de la classe étudiée, il est de quatre chez les Mammifères, appelés complexes HoxA, B, C, D (Scott, 1992) et provenant a priori de deux événements distincts de duplication totale au cours de l'évolution (voir revue Lundin, 1993). Ces complexes sont situés sur des chromosomes différents, respectivement sur les chromosomes 6, 11, 15 et 2 chez la souris et 7, 17, 12 et 2 pour l'homme. Chacun de ces complexes contient un certain nombre de gènes, numérotés de 1 à 13, provenant d'événements de duplication partielle au sein des différents complexes. Par exemple, le complexe HoxA contient 11 gènes : Hoxal à Hoxa7, Hoxa9 à Hoxall et Hoxal3. Des gènes qui ont une structure et une fonction similaires, occupent la même position au sein de complexes différents et sont appelés gènes paralogues : par exemple Hoxa2 et Hoxb2; ils dérivent d'un ancêtre commun (pb). Des gènes provenant d'un ancêtre commun mais dont la fonction ou la structure a divergé au cours de l'évolution, occupant des places différentes au sein du même complexe (Hoxa2 et Hoxa3), sont appelés gènes orthologues. Au total, les quatre complexes des mammifères regroupent 38 gènes. Ceux-ci participent à la régulation de la définition des identités selon l'axe antéro-postérieur, en particulier dans le tube neural. La règle de colinéarité est retrouvée dans les domaines d'expression de ces gènes chez les embryons de poulet et de souris (Duboule & Dollé, 1989 ; Graham et al., 1989; McGinnis & Krumlauf, 1992): les gènes paralogues du groupe 1 sont situés plus en 3'.

Chez l'embryon de poulet et de souris, les gènes *Hox* sont exprimés dans le tube neural depuis la partie la plus caudale jusqu'à une limite antérieure qui correspond exactement à une limite rhombomérique précise (Duboule & Dollé, 1989; Graham et al., 1989). Par exemple, le gène *Hoxa2* s'exprime jusqu'à la limite entre r1 et r2, tandis que la limite d'expression d'*Hoxb2* est décalée d'un rhombomère et se situe à la frontière r2/r3. Ainsi,

chaque rhombomère est exposé à une combinaison unique de gènes homéotiques, définissant une identité de position spécifique pour chaque segment, sauf r1 qui est dépourvu de l'expression de tout gène Hox (Figure 8). Malgré la conservation de l'homéodomaine, chaque gène Hox possède des cibles spécifiques, en particulier grâce à des associations avec des cofacteurs protéiques (voir revue Chariot et al., 1999), comme les membres de la famille PBX (Di Rocco et al., 1997; Manzanares et al., 2001). Comme pour l'embryon de drosophile, la perturbation du code homéotique dans le rhombencéphale segmenté produit des perturbations de l'identité segmentaire et de l'organisation des différents segments les uns par rapport aux autres. Cependant, il paraît moins facile d'identifier de réels phénomènes de transformation homéotique d'un rhombomère en un autre, en particulier à cause de la duplication des complexes et de l'existence de gènes paralogues qui peuvent jouer un rôle redondant, permettant ainsi la compensation au moins partielle de certaines mutations (Greer et al., 2000). Des expériences de greffes effectuées avant que la segmentation ne soit visible ont montré la prévalence des caractères postérieurs sur l'identité antérieure : si des territoires postérieurs sont greffés en position plus antérieure, ils maintiennent l'expression des gènes Hox qui leur est caractéristique. Au contraire, des rhombomères déplacés caudalement adoptent l'identité correspondant à leur nouvelle position tant au niveau des gènes exprimés que du devenir des cellules issues de ce rhombomère (Grapin-Botton et al., 1995).

Enfin, il a été démontré que les cellules des crêtes neurales dérivées du rhombencéphale sont généralement exposées au même système d'identité de position que celui imposé par les gènes *Hox* au sein du rhombencéphale segmenté (Hunt et al., 1991a,b) : par exemple, les crêtes neurales dérivées de r4 expriment *Hoxa2*, *Hoxa1* et *Hoxb1*. Ceci suggère qu'il existe un « code *Hox* » au niveau des arcs branchiaux (Hunt et al., 1991a; Couly et al., 1998).

3.1.3 Cas du gène Hoxa2.

Le gène *Hoxa2* est un gène homéotique localisé à l'extrémité 3' du complexe *HoxA*. Il code pour une protéine à homéodomaine qui est un facteur de transcription. Il est exprimé dans toute la partie caudale du tube neural jusqu'à une limite antérieure constituée par la limite r1/r2 (Prince & Lumsden, 1994 ; Lumsden & Krumlauf, 1996). Ce gène présente une caractéristique particulièrement intéressante, c'est d'être le seul gène homéotique à être exprimé en r2, c'est donc le gène *Hox* dont l'expression est la plus antérieure, venant ainsi perturber la règle de colinéarité. Son expression est renforcée dans les rhombomères 3 et 5 grâce à l'action de *Krox20* (Nonchev et al., 1996 ; Maconochie et al., 2001). De plus *Hoxa2*

est exprimé dans les cellules de crête neurale issues de r4 et cette expression se maintien au cours de la migration, jouant un rôle déterminant dans le développement des structures dérivées des crêtes neurales et des arcs branchiaux (Rijli et al., 1993 ; Couly et al., 1998 ; Couly et al., 2002). Au contraire, la régulation différentielle d'*Hoxa2* dans le tube neural et dans les crêtes neurales (Prince & Lumsden, 1994) entraîne l'absence d'expression gènes *Hox* dans les cellules de crête neurale issues de r2, contribuant ainsi à la colonisation du premier arc branchial avec les cellules de crête neurale dérivées de r1 (Couly et al., 1998).

3.1.3.1 Effets de la mutation Hoxa2.

L'invalidation du gène *Hoxa2* a été réalisée par recombinaison homologue, insertion d'un gène de sélection (Neo, gène de résistance à la néomycine) et/ou d'une séquence d'un gène rapporteur, celui de la GFP (<u>G</u>reen <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein, ou protéine fluorescente verte) ou *LacZ*, qui code une sous-unité catalytique de la β -galactosidase bactérienne. Les animaux hétérozygotes pour la mutation sont normaux, mais les animaux homozygotes meurent peu de temps après la naissance ou naissent mort-nés (Rijli et al., 1993 ; Gendron-Maguire et al., 1993).

L'étude du développement embryonnaire des mutants Hoxa2^{-/-} a montré que, contrairement à d'autres mutants de gènes homéotiques, par exemple Hoxal (Lufkin et al., 1991; Carpenter et al., 1993; Mark et al., 1993; Domínguez del Toro et al., 2001), cette mutation ne conduisait pas à des pertes ou éliminations de territoires rhombomériques, ni à des perturbations de la segmentation anatomique des rhombomères ou des crêtes neurales (Rijli et al., 1993). Les modifications liées à l'invalidation de Hoxa2 au sein du rhombencéphale sont plus subtiles. Un défaut de migration de certains axones constituant habituellement le nerf trijumeau est observé et une partie de ces axones rejoignent le point de sortie du nerf facial en r4 (Gavalas et al., 1997; Davenne et al., 1999). De plus, la frontière rhombomérique entre r1 et r2 n'est pas strictement maintenue et devient floue. En effet, l'expression de divers marqueurs comme Mash1 ou Phox2b est modifiée chez les animaux mutants Hoxa2^{-/-}, donnant l'impression que r1 s'étend caudalement au dépens des rhombomères 2 et 3 (Davenne et al., 1999; Barrow et al., 2000). Cette impression est renforcée par l'étude de l'expression du gène de la dopamine β-hydroxylase (DBH), spécifique du locus coeruleus, qui est habituellement restreinte à r1 et dont le domaine s'allonge pour chevaucher sur r2 chez les mutants $Hoxa2^{-/-}$. De plus, certains aspects du développement dorso-ventral sont altérés chez ces animaux : l'expression de pax3 est étendue

ventralement et l'expression d'*evx1* dans des colonnes d'interneurones ventraux disparaît dans les rhombomères 2 et 3.

Le développement du squelette maxillo-facial est aussi très perturbé par la mutation du gène *Hoxa2* chez la souris (Rijli et al., 1993 ; Gendron-Maguire et al., 1993) et chez le poulet (Couly et al., 1998). Ainsi, les structures dérivant du deuxième arc branchial et des cellules de crête neurale qui y migrent, qui expriment habituellement *Hoxa2* sont transformées en structures du premier arc branchial, une zone dépourvue de gène *Hox* colonisée par des cellules de crête neurale qui ne présentent pas d'expression de *Hox*. Cette transformation homéotique a permis de mettre en évidence le rôle central d'*Hoxa2* et de l'interaction entre des crêtes neurales exprimant ou non des gènes *Hox* avec des territoires branchiaux aux propriétés identiques pour construire une mâchoire inférieure (Couly et al., 1998 ; Cohn, 2002).

3.1.3.2 Effets de la surexpression de Hoxa2.

Des expériences de gain de fonction du gène *Hoxa2* dans des territoires qui ne l'expriment habituellement pas, menées chez le poulet (Grammatopoulos et al., 2000) et chez le xénope (Pasqualetti et al., 2000), montrent que cette surexpression conduit une transformation homéotique inverse de celle observée chez les souris invalidées pour *Hoxa2*, c'est-à-dire une transformation des os et cartilages du premier arc en éléments du second arc branchial. D'autres expériences de surexpression démontrent l'importance de la restriction de *Hoxa2* à une région bien précise du tube neural pour la formation correcte du squelette craniofacial, à laquelle participe des populations de crêtes neurales *Hox*-négatives, en provenance de l'encéphale antérieur, de r1 et de r2 et *Hox*-positives, issues des rhombomères postérieurs à r2 (Creuzet et al., 2002).

Les animaux invalidés pour le gène *Hoxa2* présentent donc des caractéristiques intéressantes puisqu'ils étendent caudalement la zone dépourvue d'expression de gène *Hox*, transformant le territoire r2 en un territoire d'identité modifiée, proche de celle de r1.

3.2 Les régulateurs des gènes homéotiques.

L'expression des gènes *Hox* dans le rhombencéphale au cours de la segmentation est contrôlée par différents facteurs parmi lesquels l'acide rétinoïque, d'autres facteurs de transcription et les facteurs de croissance fibroblastiques ou FGF (<u>F</u>ibroblast <u>G</u>rowth <u>F</u>actor).

Il semblerait en fait que la plupart des gènes *Hox* impliqués dans la segmentation soient surtout nécessaires à son maintien et à la détermination des identités de position au sein des rhombomères déjà formés, mais que certains facteurs agissant plus précocement sont à la base même de la segmentation et de l'apparition des frontières.

3.2.1 Les autres facteurs de transcription.

Deux principaux facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation de l'expression des différents gènes *Hox* le long de l'axe antéro-postérieur dans le rhombencéphale : *Krox20* et *MafB/kreisler*. *Krox20* s'exprime dans r3 et r5 exclusivement (Schneider-Maunoury et al., 1993,1997) dans lesquels il induit l'expression d'*Hoxa2* (Nonchev et al., 1996) et d'*Hoxb2* (Sham et al., 1993 ; Vesque et al., 1996), ainsi que d'autres gènes *a priori* impliqués dans le processus de segmentation comme *EphA4*, un récepteur des ephrines (Seitanidou et al., 1997 ; Theil et al., 1998). Des études récentes montrent que *Krox20* intervient très précocement (E8 chez la souris) et qu'il est un des acteurs majeurs de la mise en place de la segmentation du rhombencéphale (voir plus loin). L'élimination de son expression par knock-out entraîne la disparition des rhombomères 3 et 5 (Schneider-Maunoury et al., 1993 ; Swiatek & Gridley, 1993), bien que des études plus récentes (Voiculescu et al., 2001) montrent que cette élimination est secondaire à une re-spécification des identités impaires (r3 ou r5) en identités paires (r2, r4 ou r6).

Cas du facteur de transcription MafB/kreisler.

Le gène *MafB/kreisler* s'exprime au sein du rhombencéphale dans les rhombomères r5 et r6 exclusivement (Cordes & Barsh, 1994), sans doute sous le contrôle partiel de l'acide rétinoïque (Grapin-Botton et al., 1998). Au cours de la segmentation, il active l'expression d'*Hoxa3* dans ces deux rhombomères et d'*Hoxb3* dans le rhombomère 5 uniquement grâce à des sites de régulation géniques différents (Manzanares et al., 1997 ; Manzanares et al., 1999a). La régulation d'*Hoxb3* en r5 se fait en coopération avec *Krox20* (Manzanares et al., 2002). À la fin de la segmentation, l'extinction de l'expression de *MafB/kreisler* est nécessaire au développement ultérieur du rhombencéphale (Theil et al., 2002).

La mutation naturelle de ce gène chez la souris appelée *kreisler* a été induite par un traitement au rayon X par P. Hertwig en 1942 qui a noté les premiers traits comportementaux des animaux *kreisler* homozygotes (*kr/kr*), qui sont viables : surdité, hyperactivité, incapacité à nager, locomotion en cercle (*kreis* = cercle en allemand), mouvements stéréotypés de la tête (Hertwig, 1942,1944) liés à une absence d'oreille interne qui a été étudiée plus en détail par



Fig. 10. Défauts d'expression de marqueurs rhombomériques chez les mutants *kreisler*.

A. L'expression de *MafB* en r5 et r6 est normale chez les mutants hétérozygotes (+/*kr*) et abolie chez les homozygotes (*kr/kr*) de *kreisler* aux stades 4 somites (gauche), 9 somites (centre) et 13 somites (droite). Noter l'expression dans r3 chez les deux mutants (d'après Giudicelli et al., 2003). La mutation *kreisler* n'est donc pas une mutation nulle du gène *MafB/kreisler*. Noter en particulier la forte expression dans la plaque du toit (dorsale) à 13 s. Vue de tubes neuraux ouverts dorsalement et disposés à plat ("flat mount") : l'axe ventral est médian, l'axe dorsal est latéral, l'avant est vers le haut.

B. Expression d'un marqueur de r5, Hoxa3, en r3 chez les animaux +/kr et kr/kr (d'après Manzanares et al., 1999b). Vue latérale (haut) et dorsale (bas) d'embryons entiers, l'avant est vers le haut.

La mutation du gène de segmentation MafB/kreisler induit des défauts d'expression de deux types : élimination en r5/r6 (kr/kr), respécifications des cellules de r3 (+/kr, kr/kr). Des progéniteurs de r3 expriment des propriétés de r5 (MafB, Hoxa3).

Deol, 1964. La souche *kreisler* a ensuite été oubliée pendant 30 ans, puis les modifications anatomiques et comportementales observées précédemment ont orienté des études vers la recherche de défauts de segmentation chez ces animaux (Frohman et al., 1993). D'autres travaux ont mis en évidence l'intervention de *MafB/kreisler* dans la mise en place de l'oreille interne et la perturbation de la cascade moléculaire contrôlant ce phénomène chez les animaux homozygotes *kreisler* (McKay et al., 1996).

L'étude de la segmentation du rhombencéphale chez ces animaux a montré des altérations importantes concernant la partie caudale du rhombencéphale : il semblait que r5 et r6 manquaient, remplacés par un territoire d'identité nouvelle appelé rX mettant en contact des cellules de r4 et de r7 (McKay et al., 1994). Il a ensuite été montré que le gène affecté par la mutation kreisler était un gène de la famille MafB codant pour un facteur de transcription exprimé en r5 et r6 (Cordes & Barsh, 1994). La mutation consiste en une inversion d'un fragment chromosomique qui laisse intact le cadre de lecture ouverte du gène mais qui inactive un site de régulation en *cis* spécifique de l'expression précoce de *MafB/kreisler* dans les rhombomères 5 et 6 (Cordes & Barsh, 1994). Ainsi, la mutation kreisler ne constitue pas une mutation nulle (Eichmann et al., 1997), les autres sites d'expression, en particulier le système hématopoïétique, ne sont pas touchés, ni les expressions plus tardives. Des études plus récentes ont démontré que seul r5 était absent chez les mutants kr/kr, et que r6 était présent avec une frontière commune floue avec r4 (l'identité paire autorisant le mélange des cellules) bien qu'avec une identité plus tardive légèrement perturbée (expression de *phox2b*). Contrairement aux mutants Krox20^{-/-} chez qui les cellules de r3 et r5 apparaissent transitoirement puis sont éliminées (Voiculescu et al., 2001), aucun marqueur de r5 n'a été détecté au cours de la segmentation chez les animaux kr/kr (Manzanares et al., 1999b).

Cette mutation *kreisler* conduit à une perturbation originale de l'expression des gènes d'identité segmentaire au sein du rhombencéphale (Figure 10) : en effet, il a été démontré que le gène *Hoxa3*, une des cibles de *MafB/kreisler*, s'exprime dans certaines cellules du rhombomère 3 chez les animaux kr/kr et aussi chez les mutants hétérozygotes (+/kr) quoique plus faiblement (Manzanares et al., 1999b). De plus, d'autres expériences ont montré que le gène *MafB/kreisler* lui-même était partiellement exprimé en r3 chez les animaux kr/kr et +/kr (Giudicelli et al., 2003), ce qui constitue une modification de l'identité rhombomérique d'une partie des cellules de r3, créant aussi de nouvelles interactions. Les animaux +/kr ne présentent pas au stade embryonnaire de la segmentation de défauts anatomiques. Ces animaux représentent donc un modèle de choix pour l'étude des conséquences de l'altération du patron d'identité antéro-postérieur sur le développement et la mise en place de réseaux



Fig. 11. Les effets des modifications du gradient d'acide rétinoïque sur la régionalisation du rhombencéphale.

Schématisation des effets observés sur la segmentation du rhombencéphale produits par un excès (lignes du haut) ou une carence partielle ou totale (lignes du bas) d'acide rétinoïque.

Dans le cas d'un fort excès, les rhombomères les plus antérieurs et le cerveau moyen disparaissent au profit de r4 et r5 étendus et antériorisés. Pour un excès léger, r2 et r3 sont modifiés et prennent respectivement des identités proches de celles de r4 et r5. Dans le cas de carence ou de blocage des récepteurs, la sévérité des défauts obtenus dépend de l'intensité du blocage et de l'âge auquel il est réalisé. Plus les rhombomères sont postérieurs, plus leur besoin en acide rétinoïque est grand. Donc plus la quantité d'acide rétinoïque est faible, plus le nombre de rhombomères qui disparaissent est grand et plus ils sont antérieurs. Dans les cas d'une déplétion totale, un r4 étendu et postériorisé fait la jointure avec la moelle épinière.

r1-r8 : rhombomères 1 à 8, mo : moelle épinière. Rostral est à gauche. (d'après Gavalas, 2002 ; Maden, 2002). neuronaux puisque ces modifications ne sont pas accompagnées de pertes massives de territoires.

3.2.2 L'acide rétinoïque.

L'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A (ou rétinol), est impliqué dans le développement général, en particulier au niveau des membres et du système nerveux central (revu par Maden, 2002). Le métabolisme de l'acide rétinoïque fait intervenir plusieurs étapes : le rétinol en provenance de la circulation sanguine est absorbé par les cellules puisqu'il franchit librement les membranes. Ce rétinol est d'abord transformé en rétinal par des deshydrogénases, puis en acide rétinoïque par les rétinaldéhyde deshydrogénases (RALDH1, 2, 3). L'acide rétinoïque peut se fixer sur des protéines cytoplasmiques CRABP (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein) qui peuvent jouer un rôle de régulation de la quantité disponible d'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque entre dans le noyau et lie des récepteurs nucléaires RAR (Retinoic Acid Receptor) ou RXR (Retinoid X Receptor). Sous l'effet de la liaison à l'acide rétinoïque, ces récepteurs s'hétérodimérisent et se lient à l'ADN en des sites précis appelés éléments de réponse à l'acide rétinoïque ou RAREs (Retinoic Acid Response Elements), jouant ainsi le rôle de facteurs de transcription. De nombreuses études menées chez différentes classes de vertébrés, poisson (Holder & Hill, 1991), amphibien (Durston et al., 1989; Blumberg et al., 1997), oiseau (Maden et al., 1996) ou mammifère (Conlon & Rossant, 1992 ; Marshall et al., 1992) montrent que l'excès ou la carence d'acide rétinoïque perturbent dramatiquement le développement embryonnaire. Au sein du système nerveux central, il a été mis en évidence que l'acide rétinoïque était synthétisé au niveau du mésoderme paraxial environnant, et que l'expression ou l'induction de nombreux gènes étaient dépendants d'une source d'acide rétinoïque. En particulier, de nombreux gènes participant à la segmentation du rhombencéphale possèdent des éléments de régulation contenant des RAREs, tels les gènes Hox (Langston & Gudas, 1992; Marshall et al., 1994; Dupé et al., 1997 ; Oosterveen et al., 2003) ou présentent une sensibilité à l'acide rétinoïque, comme MafB/kreisler (Grapin-Botton et al., 1998; Dupé et al., 1999; Wendling et al., 2001). Un excès d'acide rétinoïque induit une perturbation du code d'identité segmentaire imposé et maintenu par les gènes Hox, entraînant une modification des segments r2/r3 en r4/r5 (Marshall et al., 1992, Figure 11): l'acide rétinoïque est un facteur « postériorisant », en relation avec son gradient caudo-rostral et avec la sensibilité croissante des gènes Hox à l'acide rétinoïque orienté de façon opposée (Figure 11) : les gènes qui s'expriment le plus rostralement sont les plus sensibles, donc nécessitent le moins d'acide rétinoïque pour leur

induction (Conlon & Rossant, 1992; Swindell et al., 1999). Au cours des dernières années, des souris mutantes pour les enzymes de synthèse (raldh2), d'hydrolyse (cyp26) ou pour les différents récepteurs (RAR α , β , γ ; RXR α , β , γ) ont été créées et utilisées pour démontrer l'influence de l'acide rétinoïque sur le développement du rhombencéphale. L'interruption de la signalisation mise en place par l'acide rétinoïque, que ce soit par l'arrêt de la synthèse en mutant le gène de la RALDH2 (Niederreither et al., 1999; Niederreither et al., 2000), en utilisant un antagoniste général des RARs (Wendling et al., 2000 ; Dupé & Lumsden, 2001 ; Gavalas, 2002) ou par la mutation sélective ou combinée d'un ou plusieurs récepteurs (Dupé et al., 1999; Wendling et al., 2001), conduit à des perturbations à la fois dans l'endoderme, les crêtes neurales et le rhombencéphale qui démontrent l'importance de l'acide rétinoïque dans le développement de la partie postérieure du rhombencéphale. En effet, en absence de signalisation rétinoïque, l'endoderme montre des défauts d'expression des gènes Hox, les territoires antérieurs tels que r3/r4 sont étendus caudalement aux dépens des territoires plus postérieurs. Les effets sont différents selon le stade auquel la privation d'acide rétinoïque est effectuée (Dupé & Lumsden, 2001; Gavalas, 2002, Figure 11): une privation complète entraîne un arrêt de la segmentation au rhombomère 4 qui s'étend jusqu'à la moelle épinière, puis plus la privation est tardive ou sévère, plus les rhombomères manquants sont postérieurs. Ceci traduit une nécessité de la signalisation rétinoïque pour la formation des frontières rhombomériques postérieures selon un gradient postéro-antérieur : plus la frontière est postérieure, plus la quantité d'acide rétinoïque requise pour la former est grande (Dupé & Lumsden, 2001; Gavalas, 2002, Figure 11). Ce gradient serait formé par l'expression différentielle de l'enzyme de synthèse à une extrémité et de l'enzyme d'hydrolyse à l'autre extrémité du rhombencéphale, selon un système source / puits (Swindell et al., 1999). Il apparaît que les différents récepteurs n'ont pas le même rôle dans le contrôle de la segmentation exercé par l'acide rétinoïque : une double-mutation des récepteurs α et γ a le même effet que l'application d'un antagoniste complet des trois RARs, c'est-à-dire une expansion caudale de r3/r4 (Wendling et al., 2001) alors que la double mutation des RAR α et β a des effets plus tardifs, concernant l'expression de *Krox20* et *kreisler* et la formation de la frontière r5/r6 (Dupé et al., 1999). L'acide rétinoïque est donc un facteur très précoce qui contrôle à la fois l'expression des gènes de segmentation, la formation des frontières et l'expression des gènes d'identité tels que les gènes Hox.



Fig. 12. La formation des frontières rhombomériques (d'après Giudicelli et al., 2001).

Dès E8, *Krox20* s'exprime dans une étroite bande localisée au niveau du futur r3, *Hoxa1* s'exprime jusqu'à la future frontière r3/r4. Ensuite les mécanismes de régulation de *Krox20* lui permettent d'étendre son expression dans les territoires environnants, tandis que *Hoxa1* induit *Hoxb1* en r4-r6 et *MafB/kreisler* en r5.

À E8,5, *Hoxa1* s'éteint, entraînant la perte de *Hoxb1* en r5 : *Krox20* peut alors s'y exprimer, sous l'action de *MafB/kreisler* et des FGFs. Les inhibitions réciproques entre *Krox20* et *Hoxb1* permettent de limiter les territoires d'expression, l'induction par ces deux facteurs de transcription de couples récepteurs / ligand de la famille Eph / ephrine dans des rhombomères adjacents conduit à la ségrégation cellulaire et à la formation des frontières rhombomériques.

 \rightarrow induction, \rightarrow inhibition, \rightarrow induction incertaine.

3.2.3 Autres systèmes de contrôle.

De récentes expériences chez le poulet (Marin & Charnay, 2000a) et chez le poissonzèbre (Maves et al., 2002 ; Walshe et al., 2002) ont montré que les FGFs jouaient un rôle important dans la mise en place de la région centrale du rhombencéphale et dans le contrôle et le maintien du processus de segmentation à ce niveau. Il semblerait en effet que les facteurs FGF3 et FGF8 en provenance du rhombomère 4 présomptif soient déterminants pour induire et maintenir l'expression des gènes de segmentation dans les rhombomères adjacents à r4, en particulier *Krox20* et *MafB/kreisler* respectivement en r5 et r5/r6.

3.3 Modèle de mise en place de la segmentation : la formation des frontières r3/r4 et r4/r5.

La formation des frontières et l'établissement des rhombomères est la première étape de la segmentation. Cette étape semble être contrôlée par l'expression de gènes s'inhibant réciproquement dans des territoires adjacents. Les acteurs impliqués seraient Hoxal (Barrow et al., 2000) et Krox20 (Giudicelli et al., 2001 ; Voiculescu et al., 2001). Selon ces modèles, ces deux gènes s'exprimeraient dans le tronc cérébral non encore segmenté vers E8 chez la souris, sous l'influence de facteurs encore inconnus (l'acide rétinoïque pourrait jouer un rôle). Krox20 initialiserait son expression dans une bande très étroite correspondant au r3 présomptif, tandis que Hoxal serait exprimé jusqu'à la future limite r3/r4 et induirait l'expression de *Hoxb1* dans r4/r6 présomptif. *Krox20* étant capable d'auto-régulation positive à la fois de façon cellule autonome (maintien sa propre expression dans une cellule où il s'exprime) et cellule non-autonome (induit son expression dans les cellules voisines), le territoire antérieur exprimant Krox20 s'agrandit. À E8,5, Hoxal ne serait plus exprimé, mais aurait induit l'expression de MafB/kreisler au niveau du futur r5. Hoxb1 ne se maintiendrait pas en r5 en absence de Hoxal, permettant l'apparition d'une zone exprimant Krox20 au niveau de r5 présomptif, menant à l'établissement du r5 définitif sous l'action des phénomènes d'auto-régulation de Krox20 cités ci-dessus, en collaboration avec le gène MafB/kreisler (Marin & Charnay, 2000b). L'inhibition réciproque de Krox20 et d'Hoxb1, ajoutée à l'induction par Krox20 de l'expression d'EphA4, conduirait à la stabilisation des domaines correspondants aux trois rhombomères centraux (r3, r4, r5) et à l'établissement des frontières entre ceux-ci (r3/r4 et r4/r5, Figure 12).

3.4 Interactions de la segmentation et de la régionalisation dorso-ventrale.

Des études récentes effectuées chez la souris et chez le poulet ont montré que la signalisation antéro-postérieure mise en place par la segmentation, et la régionalisation dorsoventrale, qui s'établit peu après, interagissaient pour que chaque territoire rhombomérique soit pourvu des sous-types neuronaux adéquats. En particulier, l'expression de *Hoxb1* et *Hoxa2* au niveau de r4 semble absolument nécessaire à l'induction et au maintien de l'expression de phox2b et lim3 parmi le domaine positif pour Nkx2.2 afin d'assurer la différenciation des motoneurones branchiaux faciaux. Chez les souris mutées pour Hoxbl ou Hoxa2, un basculement du devenir des progéniteurs est observé et des neurones sérotonergiques sont spécifiés en lieu et place des motoneurones branchiaux, et dans un domaine qui en est habituellement dépourvu (Pattyn et al., 2003). De plus, la génération de motoneurones somatiques uniquement dans la partie postérieure du rhombencéphale semble être sous le contrôle d'Hoxa3. En effet, l'électroporation du gène Hoxa3 dans la partie antérieure du rhombencéphale à un stade précis du développement suffit à générer des motoneurones somatiques dans les rhombomères antérieurs. Autrement dit, il existe des progéniteurs capables de produire des motoneurones somatiques dans les rhombomères antérieurs, mais l'expression de Hoxa3, limitée aux rhombomères postérieurs, n'autorise la différenciation de motoneurones somatiques que dans les rhombomères postérieurs, territoires plus proches des somites (Guidato et al., 2003). Ainsi, il existe une coordination des systèmes de régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale pour créer dans des localisations précises des sous-types neuronaux en nombre compatible avec le fonctionnement ultérieur du système nerveux central. Selon certaines hypothèses, il apparaît que l'acide rétinoïque pourrait aussi jouer un rôle dans cette coordination, puisqu'il est impliqué à la fois dans le contrôle de l'expression des gènes de régulation de la segmentation et dans celui des gènes de régionalisation dorso-ventrale (Pierani et al., 1999 ; Maden, 2002).

4. La neurogenèse et les événements plus tardifs.

Après les étapes de segmentation et de régionalisation dorso-ventrale, les identités des progéniteurs neuronaux en cours de division le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont fixées. En fonction des informations reçues précocement et dès la fin des

régionalisations, certaines cellules vont sortir du cycle cellulaire et entamer un programme de différenciation conforme à leur position. Lors de cette étape de neurogenèse, des facteurs de transcription spécifiques de chaque sous-type neuronal sont exprimés au sein de populations bien précises, renforcant ainsi l'engagement des cellules vers un devenir précis, prédéfini par la segmentation et la régionalisation dorso-ventrale. Ainsi, le gène phox2b a été impliqué à la fois dans les mécanismes du passage de la prolifération à la différenciation neuronale en induisant des gènes dits « pro-neuraux » qui engagent la cellule vers un devenir neuronal comme ngn2 et en réprimant des inhibiteurs de neurogenèse, et dans le choix de devenirs précis en favorisant, en interaction avec d'autres facteurs, l'expression de gènes spécifiques de sous-types neuronaux particuliers (Dubreuil et al., 2000,2002). Ce gène phox2b apparaît comme très important pour l'induction de deux sous-types neuronaux : les motoneurones branchiaux et viscéraux, exprimant Isl1 (Pattyn et al., 2000a), et les neurones catécholaminergiques répartis dans différents groupes au sein du tronc cérébral et dans les ganglions sensoriels (Pattyn et al., 2000b), particulièrement importants pour le système respiratoire. Ainsi, un des gènes participant aux dernières étapes de régulation de la mise en place des identités dorso-ventrales intervient aussi dans l'engagement des progéniteurs vers un devenir neuronal et dans la régulation du nombre de neurones.

Après la segmentation, une fois les frontières disparues, de nombreux phénomènes de migration neuronale sont observés, venant perturber l'organisation issue de la compartimentation. En particulier, les neurones branchiomoteurs faciaux vont migrer de r4 vers r6 chez la souris (Auclair et al., 1996). Cette migration n'est possible que sous l'influence de divers facteurs en provenance de r5 et r6 (Studer, 2001). En particulier, le gène *MafB/kreisler* ne doit plus être exprimé en r5/r6 pour autoriser la migration, soit parce que ce gène participe au maintien des frontières rhombomériques, soit parce qu'il empêche la différenciation, soit parce que son expression prolongée perturbe les programmes de différenciation vers lesquels les cellules s'engagent (Theil et al., 2002). D'autres facteurs, tels que les molécules membranaires TAG-1, Ret et cadherin-8, sont induits à différents moments de la migration en fonction de l'environnement et semblent contrôler les étapes de la migration de r4 à r6 (Garel et al., 2000).

Une fois que la plupart des sous-types neuronaux sont spécifiés et parallèlement aux phénomènes de migration, les connexions synaptiques entre les neurones vont s'établir. Ce processus nécessite la présence de facteurs attractifs et répulsifs de façon à obtenir des réseaux neuronaux cohérents et fonctionnels. Certains de ces guidages chimiques sont mis en place par les événements précoces et appartiennent à la détermination du phénotype neuronal : un sous-type neuronal donné, qui a été soumis à des facteurs de transcription spécifiques, secrète un signal de guidage défini autorisant la connexion avec une autre population compatible. Parmi les substances impliquées dans l'établissement des connexions au cours du développement, les neurotrophines jouent un rôle particulièrement important au niveau du tronc cérébral. En effet, il a été démontré que BDNF et NT-4, deux membres de la famille des neurotrophines qui partagent un récepteur membranaire commun, TrkB, participent à l'établissement des connexions synaptiques entre les neurones sensoriels des nerfs IX et X et leurs cibles périphériques, les corps carotidiens. Ces substances peuvent aussi être impliquées dans la survie des neurones, comme c'est la cas pour BDNF et NT-4 qui sont nécessaires à la survie des neurones dopaminergiques des ganglions pétreux et noueux (Erickson et al., 1996,2001). Il devient par ailleurs de plus en plus évident que les systèmes de neurotransmission eux-mêmes participent à l'élaboration de leurs propres circuits au cours du développement, soit en jouant un rôle de « neurotrophine », soit parce que l'activité générée au niveau de la synapse en formation est nécessaire à sa maturation (revu par Cohen-Cory, 2002). Ce rôle des neurotransmetteurs a été démontré au niveau du système nerveux central pour le GABA (revu par Owens & Kriegstein, 2002) et au niveau de la jonction neuromusculaire entre les motoneurones et les cellules musculaires. En effet, l'interruption de la transmission cholinergique par mutation du gène de la choline acétyltransférase, l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, entraîne des défauts tout au long du développement et de la maturation de la synapse, que ce soit au niveau de la fasciculation, du branchement axonal et du nombre de collatérales, ou de la différenciation post-synaptique (Misgeld et al., 2002; Brandon et al., 2003). D'autres expériences ont montré que l'excès d'acétylcholine au cours du développement, induit par la mutation de l'enzyme principale de dégradation de l'acétylcholine dans la fente synaptique, l'acétylcholine estérase, engendrait des défauts musculaires et la mort de motoneurones et de neurones sensoriels primaires chez le poissonzèbre (Behra et al., 2002). Ces altérations peuvent être en parties récupérées en introduisant une autre mutation consistant en une perte de fonction de la sous-unité α des récepteurs nicotiniques. Cette observation rejoint d'autres travaux montrant que la surexposition à la nicotine d'embryons de poisson-zèbre conduit à des modifications de la différenciation et du branchement axonal des motoneurones (Svoboda et al., 2002).

Au cours du développement, les neurones sont produits en excès, tous les neurones ne vont donc pas établir de connexion fonctionnelle avec leur cible. Dans ce cas, des vagues de mort cellulaire programmée, ou apoptose, éliminent les neurones surnuméraires (cf. revue par Oppenheim, 1991). Un des gènes intervenant dans la mort cellulaire programmée, *bax*, qui a

une action pro-apoptotique, c'est-à-dire favorisant l'apoptose, semble intervenir dans les processus naturels d'élimination des cellules nerveuses surnuméraires. En effet, chez des mutants $bax^{-/-}$, le système nerveux central contient plus de cellules (Lindsten et al., 2000) dans divers systèmes tels que les neurones moteurs faciaux (Deckwerth et al., 1996) et la substantia nigra (Groc et al., 2001). Le système de mort cellulaire programmée semble être coordonné aux systèmes de survie et de croissance axonale soutenus par les neurotrophines, puisqu'il a été mis en évidence que la privation de neurotrophines induisait des phénomènes d'apoptose qui peuvent être inhibés par une inactivation du gène *bax* (Deckwerth et al., 1996 ; Lentz et al., 1999 ; Middleton et al., 2000).

Ainsi, le développement du rhombencéphale embryonnaire fait intervenir des phénomènes complexes et interactifs de régionalisation selon les axes dorso-ventral et antéropostérieur et de neurogenèse. Plus tard, les migrations neuronales et l'établissement des connexions synaptiques entre les différentes populations de neurones conduisent à des remaniements importants au sein du tronc cérébral, qui rendent invisibles les événements précoces de régionalisation. Une perturbation de ces différentes étapes de développement est susceptible d'entraîner des conséquences physiologiques à la naissance, en particulier sur des comportements contrôlés en grande partie par les réseaux neuronaux du tronc cérébral, tels que la mastication ou la respiration.

Chapitre 3

Initiation et maturation de l'activité respiratoire : du réseau embryonnaire à l'activité mature postnatale.

L'activité rythmogène du tronc cérébral apparaît très tôt au cours du développement, dès la fin de la période de segmentation. L'activité enregistrée à ce stade met en jeu tout le tronc cérébral et pas uniquement un groupe cellulaire restreint au bulbe caudal comme c'est le cas après la naissance. Des phénomènes complexes de maturation de cette activité accompagnent l'établissement des réseaux neuronaux, en accord avec les différentes reconfigurations, migrations cellulaires et inter-relations entres les populations neuronales qui ont lieu à la suite de la segmentation. C'est seulement au stade fœtal que l'activité enregistrée au niveau du tronc cérébral peut être caractérisée comme respiratoire. Elle est alors partie intégrante de mouvements stéréotypés incluant en outre des sursauts, des hoquets, des mouvements des membres et la rétroflexion de la tête. Au cours de la vie fœtale, divers contrôles respiratoires se mettent en place. Malgré tout, le contrôle central de la respiration des mammifères n'est pas mature au moment de la naissance et de nombreux phénomènes postnataux ont lieu pour transformer le contrôle fœtal de la respiration en un système rythmique mature tel qu'il est décrit chez l'individu adulte.

1. L'activité rythmogène embryonnaire du réseau neuronal du rhombencéphale.

1.1 Description des activités embryonnaires rythmiques enregistrées chez l'embryon de poulet et de souris.

L'enregistrement électrophysiologique de préparations de tronc cérébral isolé *in vitro* réalisées à partir d'embryon de poulet à la fin de la segmentation (stade 24, E4,5) révèle que le cerveau postérieur génère une activité rythmique permanente, présente sur toutes les racines des nerfs crâniens de façon synchronisée, et composée de décharges organisées en bouffées (Fortin et al., 1994, Figure 13). À ce stade, le réseau neuronal est déjà organisé, avec une


Stade embryonnaire tardif (E7.5) les rhombomères ne sont plus présents



Fig. 13. La maturation des activités rythmiques du tronc cérébral de l'embryon de poulet *in vitro*.

Enregistrements *in vitro* de l'activité intégrée d'un nerf moteur (nerf facial, 7n).

Dès la fin de la segmentation, à E4 (haut), des activités à basse fréquence peuvent être enregistrées *in vitro*. Les bouffées émises sont uniques et les frontières inter-rhombomériques sont encore visibles.

Cette activité primordiale subit une maturation à partir du stade HH31 (E7) : les périodes d'activité deviennent des épisodes constitués de plusieurs bouffées successives émises à haute fréquence (bas). La fréquence de ces épisodes devient de plus en plus basse tandis que le nombre de bouffées dans un épisode augmente avec l'âge de l'embryon. La mise en marche des générateurs d'activité dans le cerveau postérieur est donc très précoce.

distinction entre des neurones réticulaires et des motoneurones. Avant ce stade, aucune activité n'est détectée sur les préparations *in vitro*. Cette activité est l'activité neuronale la plus précoce enregistrée dans le système nerveux central. Elle est caractérisée par l'émission de bouffées simples à basse fréquence avec une période entre les décharges supérieure à une minute. Cette activité est transmise aux populations de motoneurones trigéminaux, faciaux et glossopharyngiens via un système multi-synaptique appelé co-activateur intersegmentaire (Fortin et al., 1995 ; cf. revue par Champagnat & Fortin, 1997).

Cette activité composée de bouffées uniques au stade 24 subit une maturation rapide entre les stades 24 et 36. En effet, au cours de cette maturation, la période entre les bouffées devient de plus en plus longue, puis, à partir de E7 (stade 31), les bouffées deviennent des épisodes contenant plusieurs pics de décharge émis à haute fréquence (activité épisodique). Au cours du développement, le nombre de pics par épisode augmente (Figure 13) : de un pic au stade 31, l'épisode contient jusqu'à 32 bouffées au stade 36 (E10), limite maximum de l'âge auquel les enregistrements ont été effectués (Fortin et al., 1994). Ce processus paraît particulièrement robuste et contrôlé de façon interne au cerveau postérieur puisqu'il est observable *in vitro* en absence des afférences sensorielles, centrales supérieures et spinales (Fortin et al., 1994).

Plusieurs types d'activité ont été décrits sur des préparations de tronc cérébral d'embryon de souris (Abadie et al., 2000). À E10,5 et E11,5, les activités enregistrées in vitro sur les différentes racines nerveuses issues du tronc cérébral sont des pics simples, émis avec une totale absence de régularité et de rythmicité. La période entre les bouffées est généralement assez longue, variant beaucoup à la fois au sein de la même préparation et entre les différentes préparations. Cette activité ne présente aucune coordination entre les racines motrices issues des différents étages rostro-caudaux, ni de co-activation entre les nerfs ipsi- et contra-latéraux (Figure 14). Cette activité n'a jamais été observée sur les préparations d'embryon de poulet. À E12,5, cette activité devient fortement synchronisée entre les différentes paires de nerfs et à l'intérieur de la paire d'un même étage moteur. Cette transformation est liée à un allongement significatif de la période entre les bouffées, transformant l'activité désorganisée en une activité synchronisée à basse fréquence, proche de celle observée chez l'embryon de poulet à E4,5 (Figure 14). Toutefois, l'activité générée par le tronc cérébral de souris présente une irrégularité contrastant avec la régularité extrêmement robuste du rythme généré par le tronc cérébral de l'embryon de poulet. Vers E14,5, une augmentation de la fréquence de décharge par vingt entraîne l'apparition d'une activité à haute fréquence (Figure 14), proche de celle enregistrée chez le fœtus de rat (Greer et al.,



Fig. 14. Les activités embryonnaires primordiales, épisodiques et permanentes chez poulet et la souris : évolution et maturation au cours du temps (de haut en bas).

À gauche, les activités enregistrées *in vitro* sur des troncs cérébraux embryonnaires de poulet sont représentées. À E4,5, l'activité est synchrone sur les différentes racines, puis devient épisodique vers HH31 (Fortin et al., 1994).

À droite, les différentes activités enregistrées sur le tronc cérébral isolé d'embryon de souris. L'activité à E10,5 n'est ni synchrone ni rythmique, elle devient synchrone vers E12, tout en restant peu rythmique, une brève période d'activité épisodique se produit à E13,5 et à E14,5, l'activité enregistrée est de type foetale, continue et à haute fréquence (Abadie et al., 2000).

L'existence chez les embryons de poulet et de souris d'une activité épisodique semblable à celle de la grenouille adulte (McLean et al., 1995) suggère l'existence d'un « stade phylotypique » auquel tous les vertébrés montrent le même type d'activité. 1992 ; Di Pasquale et al., 1992). Cette activité de type fœtale n'a jamais été observée sur les troncs cérébraux d'embryons de poulet isolés *in vitro*. Des étapes transitionnelles ont lieu entre les différents stades de maturation : ainsi vers E12, l'activité primordiale, irrégulière et désynchronisée, est observé en alternance avec une activité à basse fréquence toujours irrégulière, mais synchronisée. La deuxième étape, observée vers E13,5, concerne le passage de l'activité à basse fréquence à l'activité fœtale. De façon très transitoire, une activité épisodique apparaît, similaire à celle observée chez le poulet vers E7,5 avec des épisodes constitués de plusieurs pics de décharges émis à haute fréquence, séparés par des périodes inter-épisodes longues. Cette activité est la première activité régulière observée chez l'embryon de poulet. Elle est similaire à l'activité respiratoire enregistrée dans les mêmes conditions sur le tronc cérébral isolé de grenouille adulte (McLean et al., 1995). Ainsi, le patron d'activité respiratoire épisodique représenterait un stade phylotypique (Figure 14), auquel est mise en place une configuration du réseau neuronal autorisant une respiration intermittente, et qui peut être ou non conservée pour générer l'activité respiratoire adulte.

1.2 La genèse des activités respiratoires de l'embryon est soumise à un contrôle segmentaire.

Les premières expériences montrant que la segmentation interagissait avec le rythme enregistré sur le tronc cérébral d'embryon de poulet à E7 consistaient à effectuer des sections transversales pour isoler les différents étages branchiomoteurs (Fortin et al., 1995). Lors de ces expériences, chaque tranche transversale conserve la capacité à générer un rythme régulier, composé, d'épisodes comportant plusieurs bouffées, comme dans le cas du tronc cérébral entier (Figure 15). Or, chaque étage branchiomoteur est issu d'un paire de rhombomère (voir précédemment chapitre 1). Chaque paire de rhombomères est donc capable de mener un programme de développement aboutissant à l'élaboration d'un générateur central de rythme, une organisation qui contraste avec la localisation dans le bulbe caudal du générateur central de la respiration chez le fœtus ou chez l'adulte. Cependant, la co-activation intersegmentaire, responsable de la synchronisation des activités entres les différents niveaux rostro-caudaux, résulte des connexions neuronales établies entre les différents segments. Cette co-activation repose sur des neurones réticulaires qui, comme les motoneurones, sont soumis à une organisation concordante avec la compartimentation rhombomérique. Elle est présente dès le stade 24, lorsque l'activité primordiale simple est enregistrée. Elle persiste à travers les



Fig. 15. Chaque étage rhombomérique est capable de générer des activités au stade embryonnaire.

Sur un tronc cérébral d'embryon de poulet à E7,5, l'activité enregistrée *in vitro* est épisodique et synchronisée sur toutes les racines motrices (haut). Si des sections sont effectuées à différents niveaux du tronc cérébral, les étages branchiomoteurs issus de paires de rhombomères sont alors isolés les uns des autres. Chaque segment est capable de générer une activité indépendamment des autres. En particulier, la fréquence des bouffées est plus grande dans les segments les plus rostraux (d'après Fortin et al., 1995 ; Champagnat & Fortin, 1997). Les activités sont synchronisées quand le cerveau postérieur est intact.

L'activité primordiale est d'emblée synchrone chez le poulet à E4,5 et devient synchrone chez la souris à E12 (cf. Figure 12).

stades de maturation de l'activité, et semble résistante aux remaniements morphologiques ultérieurs à la segmentation (Champagnat & Fortin, 1997).

Chaque étage branchiomoteur isolé par les sections présente un rythme qui lui est propre (Figure 15) : plus l'étage est antérieur, plus sa fréquence de décharge est élevée (Fortin et al., 1995). Ainsi, les neurones issus de différents rhombomères, qui possèdent probablement des propriétés membranaires et électriques différentes d'un segment à l'autre, sont capables de s'organiser en réseaux fonctionnels à l'intérieur même d'une paire de segments. Ces observations cadrent bien avec l'hypothèse de Lumsden (Lumsden & Keynes, 1989 ; Lumsden, 1990) qui propose que l'un des rôle de la segmentation du rhombencéphale est de transformer le neuro-épithélium indifférencié en une structure contenant à la fois des éléments redondants (tels que des générateurs de rythmes répétés le long de l'axe rostrocaudal) et des groupements neuronaux ayant localement des propriétés variables, dépendant spécifiquement de leur origine rhombomérique.

D'autres observations, plus récentes, sont venues confirmer ces résultats. Il s'agissait de trouver une base moléculaire au phénomène de maturation de l'activité chez l'embryon de poulet, qui implique une transition entre une activité primordiale simple à basse fréquence et une activité plus tardive, épisodique issue d'un générateur capable d'émettre des bouffées à haute fréquence à l'intérieur d'un épisode (Fortin et al., 1999). La mise en place d'une activité épisodique requiert l'apparition de « neurones réticulaires inhibés ». Ces neurones, inhibés par des connexions GABAergiques en provenance de neurones rythmiques, présentent un rebond post-inhibiteur lié à la présence d'une conductance Ih qui est nécessaire à la génération de bouffées à haute fréquence à l'intérieur d'un épisode.

De plus, des expériences d'isolements de rhombomères ont montré que seules certaines combinaisons rhombomériques étaient permissives pour la transition vers une activité épisodique. À E2, des segments ou des paires de segments sont isolés de leurs voisins par une technique micro-chirurgicale, puis les embryons opérés se développent jusqu'à E7/7,5, stade auquel le cerveau postérieur entier génère une activité épisodique (cf. ci-dessus). Il a été démontré que seuls les rhombomères isolés r3 et r5 sont capables de conduire à l'élaboration de générateurs rythmiques épisodiques ; l'activité enregistrée sur les nerfs provenant de segments r2, r4 ou r6 isolés est une activité à basse fréquence ou irrégulière. De même, seules les paires r3r4 ou r5r6 (rhombomère le plus antérieur en premier) produisent à E7 une activité épisodique, tandis que les paires r1r2, r2r3 et r4r5 conservent l'activité primordiale à basse fréquence et ne semblent pas accomplir la maturation (Figure 16 ; Fortin et al., 1999).



Fig. 16. Le codage rhombomérique des activités embryonnaires.

Les expériences de segments isolés ont conduit à l'établissement d'un « code rhombomérique » contrôlant la mise en place d'un générateur d'activité mature (épisodique). En effet, seule les paires isolées r3r4 (A1) ou r5r6 produisent des activités épisodiques à E7, les autres paires conservent une activité primordiale à basse fréquence (A2). Ce code contient une polarité puisque le retournement de r4 (A3) aboutit à l'absence de maturation (d'après Fortin et al., 1999). Des expériences complémentaires montrent que le segment antérieur doit avoir exprimé *Krox20*, caractéristique commune de r3 et r5. En effet, en électroporant *Krox20* en r1 et en l'accolant à r4, une activité mature est obtenue (B2), alors que la paire r1r4 est normalement incapable d'assurer la maturation (B1).

Ces expériences suggèrent que les activités rythmiques embryonnaires dépendent de l'organisation rhombomérique du cerveau postérieur.

Ainsi, il semble qu'un « code rhombomérique » soit nécessaire à l'initiation de la maturation de l'activité, c'est-à-dire à la transition impliquant les neurones réticulaires inhibés par un système GABAergique. Ce code consiste en un rhombomère impair (3 ou 5) à l'avant et un rhombomère pair en position postérieure. Ce code a pu être affiné grâce à des expériences d'électroporation (Fortin, observations non publiées). En effet, r3 et r5 présentent une similarité, l'expression du facteur de transcription Krox20, impliqué dans l'initiation, le maintien et la spécification des identités rhombomériques (voir ci-dessus, chapitre 2). En électroporant un plasmide portant le gène Krox20 en r1 et en accolant ce segment à un r4 normal, l'activité enregistrée à E7 est un activité mature épisodique (Figure 16). De plus, l'orientation du segment postérieur, c'est-à-dire le segment pair paraît importante pour la permissivité de la combinaison : des expériences de retournement des segments montrent que si la polarité antéro-postérieure du segment pair est inversée, la maturation de l'activité ne peut avoir lieu (Figure 16). Le code rhombomérique devient alors : un segment exprimant Krox20 antérieur et un segment pair orienté correctement postérieur. Ainsi, la segmentation du rhombencéphale en compartiments rhombomériques influe directement sur la mise en place de circuits neuronaux rythmogènes et sur leur capacité à évoluer au cours du temps de façon à obtenir diverses activités en relation avec les stades de développement.

L'apparition très précoce d'activités dans le tronc cérébral des vertébrés semble liée étroitement aux phénomènes de développement, en particulier la segmentation. La compartimentation des neurones et leur inégale répartition le long du tronc cérébral entraînent des disparités locales, pouvant conduire à l'établissement dans des zones spécifiques de générateurs centraux d'activités. L'activité primordiale subit des processus de maturation qui suivent eux aussi des schémas de développement précis et établis. Cette activité embryonnaire dont les fonctions sont encore inconnues persiste au cours de la vie fœtale, tout en poursuivant ses modifications vers une activité de type néonatale.

2. La maturation fœtale de la respiration.

2.1 Description de la respiration fœtale.

L'étude de la respiration chez le fœtus de mammifères concerne principalement des expériences réalisées *in utero* chez la brebis (Jansen & Chernick, 1991; Blanco, 1994).

D'autres études menées chez le rat ont mis en évidence l'apparition d'un rythme fœtal sur des préparations de tronc cérébral isolé (Greer et al., 1992; Di Pasquale et al., 1992). Les mouvements respiratoires coordonnés de la cage thoracique, d'ouverture de la bouche et de flexion du corps et de la tête ont été mis en évidence dès E15 chez la souris grâce à une observation *ex utero* des activités motrices de fœtus de rat et de souris perfusés de façon transplacentaire (Suzue, 1994). Ces activités paraissent surtout importantes pour le développement correct des poumons.

Chez le fœtus ovin, les mouvements respiratoires d'abord réguliers deviennent épisodiques autour de 115 jours de gestation (E115, Dawes et al., 1983). La transformation de l'activité respiratoire de régulière en épisodique est due à l'apparition d'apnées (Jansen & Chernick, 1983). Cette évolution chez le fœtus ovin précède une maturation dans l'activité électro-encéphalographique. À ce stade de développement, les mouvements respiratoires sont associés à d'autres activités motrices, telles que les mouvements rapides des yeux, une intense activité musculaire au niveau de la nuque et une augmentation de réflexes polysynaptiques spinaux. Pendant la dernière partie de la gestation de la brebis (à partir de E115), la maturation de l'activité respiratoire devient nettement associée à l'évolution de l'activité électro-encéphalographique (Clewlow et al., 1983). Cette évolution aboutit à la distinction de deux phases d'activité électro-encéphalographique : une phase à basse fréquence et haut voltage (« high voltage and low frequency », HVECoG), et une à haute fréquence et bas voltage (« low voltage and high frequency », LVECoG). L'activité respiratoire est observée pendant les phases LVECoG, associée à des mouvements rapides des yeux, une absence d'activité des muscles de la nuque et l'inhibition des réflexes polysynaptiques spinaux (Blanco, 1994); elle est inhibée pendant les périodes d'activité HVECoG. Cette inhibition de l'activité respiratoire pendant les phases HVECoG, dépourvues de mouvements rapides des yeux, demeure largement inexpliquée. La section transversale du système nerveux central au niveau du colliculus inférieur provoque une dissociation des activités électroencéphalographiques et des mouvements respiratoires fœtaux qui redeviennent continus. Ces résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme localisé dans le mésencéphale ou le pont antérieur capable d'inhiber la respiration pendant les périodes HVECoG, créant ainsi des phases d'apnée (Dawes et al., 1983). D'autres auteurs ont montré, grâce à des lésions localisées du pont, que l'absence de mouvements respiratoires pendant les phases HVECoG était sous le contrôle d'un système inhibiteur descendant situé dans le pont latéral rostral (Johnston & Gluckman, 1989).

Très récemment chez le rat, des enregistrements par ultrasons des mouvements respiratoires montrent que les premiers mouvements respiratoires apparaissent autour de E16 (Kobayashi et al., 2001). Il s'agit alors de mouvements isolés, produits à basse fréquence. Au cours des jours suivants et jusqu'à E20, la fréquence des mouvements uniques va s'amplifier. Vers E18 apparaissent des mouvements regroupés en épisodes dont la fréquence s'accroît jusqu'à E20.

2.2 Maturation du contrôle respiratoire chémosensible.

Le CO₂, facteur régulateur de la respiration après la naissance possède déjà une importance dans le contrôle de l'activité des centres respiratoires fœtaux. Il est en particulier impliqué dans la présence de l'activité respiratoire coordonnée aux phases LVECoG *in utero*. Lors d'une hypocapnie, l'activité respiratoire est inhibée (Blanco, 1994), tandis que sous hypercapnie, une augmentation des mouvements respiratoires est observée à partir de E75 chez le fœtus ovin (Ioffe et al., 1987) et après la 24^e semaine chez l'humain. Cependant, la réponse respiratoire au CO₂ est identique entre des fœtus intacts, chémo-dénervés ou présentant des lésions médullaires au niveau de la zone chémosensible centrale (Jansen et al., 1993).

L'hypoxie quant à elle, entraîne chez le fœtus ovin une inhibition des mouvements respiratoires, ainsi que des mouvements oculaires et des activités motrices qui lui sont associés (cf. revue par Walker et al., 2000), un effet qui peut être obtenu par chémodénervation des corps carotidiens (Jansen et al., 1993). Ces inhibitions commencent vers E115, au moment où l'activité respiratoire devient épisodique, avec l'apparition des épisodes d'apnée. Cette réponse ne provient pas d'une dépression directe des centres bulbaires respiratoires. Des expériences de section au niveau du colliculus inférieur montrent que cette inhibition implique des neurones situés dans le pont rostral et latéral, en particulier au niveau des noyaux parabrachial lateral, locus coeruleus et subcoeruleus, identifiés par des détections de l'expression de Fos sous hypoxie (Breen et al., 1997, revu par Walker et al., 2000). Après section, l'hypoxie déclenche une réponse excitatrice du rythme respiratoire qui est abolie après chémo-dénervation des corps carotidiens. Ces résultats suggèrent que les chémorécepteurs périphériques sont actifs dès le stade fœtal, mais que leur rôle est masqué par la prédominance de mécanismes inhibiteurs en provenance du pont rostral (Johnston & Gluckman, 1993). Les expériences de Kobayashi et al. (2001) démontrent que l'hypoxie entraîne chez le rat fœtal une dépression respiratoire, et que la stimulation des

chémorécepteurs périphériques n'a pas d'incidence sur la fréquence de mouvements respiratoires avant E20 (Greer et al., 1992).

L'ensemble de ces expériences démontre que bien qu'il existe des mécanismes de contrôle chémosensible de la respiration au stade fœtal chez le mammifère, ceux-ci sont distincts des systèmes actifs après la naissance, produisant parfois des réponses radicalement différentes de celles observées chez l'animal nouveau-né ou adulte.

2.3 La mise en place de l'inhibition noradrénergique.

Les activités enregistrées chez la souris à E14, correspondant à la respiration fœtale ont aussi pu être enregistrées chez l'embryon de rat (Greer et al., 1992), mais l'attribution de ces rythmes à la fonction respiratoire ou à la fonction locomotrice spinale n'était pas clairement déterminée avant E20. Des enregistrements par ultrasons ont permis de détecter les premiers mouvements respiratoires dès E16 chez le rat (Kobayashi et al., 2001). Cependant, à E20, l'activité enregistrée chez l'embryon de rat correspond à celle produite par le tronc cérébral isolé de nouveau-né in vitro. À ce stade, une section ponto-bulbaire ou un blocage des récepteurs α 2-adrénergiques entraînent une augmentation du rythme respiratoire identique à celle observée chez le nouveau-né (Hilaire et al., 1989 ; Errchidi et al., 1991), due à l'action inhibitrice des neurones du groupe A5 sur la rythmogenèse respiratoire. Chez l'embryon, les sections ponto-bulbaires ont des effets différents : diminution de la fréquence du rythme chez le poulet (Fortin et al., 1995). Cet effet inhibiteur du groupe A5 apparaît donc au cours de la vie fœtale, vers E20 chez le rat. De même, des expériences de lésions localisées réalisées chez le fœtus ovin ont montré que l'absence de mouvements respiratoires pendant la phase HVECoG est la conséquence d'un mécanisme inhibiteur impliquant le pont latéral rostral (Johnston & Gluckman, 1989). L'administration d'un antagoniste $\alpha 1$ et $\alpha 2$ -adrénergique provoque une augmentation de la fréquence du rythme respiratoire in utero, tandis qu'un antagoniste α 1-adrénergique seul induit une diminution de cette fréquence, ce qui suggère que les récepteurs a2 jouent un rôle important et préférentiel dans l'inhibition des centres respiratoires par les structures pontiques noradrénergiques (Giussani et al., 1995).

2.4 Le système fœtal cholinergique.

L'application d'un agoniste cholinergique entraîne une stimulation de la respiration et l'apparition de périodes LVECoG chez le fœtus ovin. Ces effets sont bloqués par des antagonistes cholinergiques, ne dépendent pas de l'état d'ECoG pendant lequel la drogue est appliquée, et sont obtenus à la fois en normoxie et sous hypoxie (Hanson et al., 1988). Par ailleurs, il est établi que l'exposition prénatale à la nicotine entraîne des modifications de la ventilation à la naissance, ce qui suggère que les récepteurs nicotiniques participent dès la vie fœtale à une maturation de l'activité respiratoire. En effet, plusieurs études ont montré que l'exposition prénatale à la nicotine modifiait la ventilation en eupnée à la fois chez les rongeurs (St-John & Leiter, 1999), induisant parfois des apnées en normoxie (Robinson et al., 2002) et chez l'agneau (Hafstrom et al., 2002a). Les réponses chémosensorielles sont aussi altérées par la présence de fortes concentrations de nicotine pendant la vie fœtale. Ainsi, la réponse à l'hypoxie à la naissance est moindre chez les animaux exposés à la nicotine au cours de leur vie fœtale (Fewell et al., 2001 ; Hafstrom et al., 2002b). Ces modifications de la réponse à l'hypoxie peuvent être liées à des changements du système de transduction catécholaminergique survenus au niveau des chémorécepteurs carotidiens suite à une exposition prénatale à la nicotine (Gauda et al., 2001).

Au cours de la vie fœtale, de nouveaux contrôles respiratoires sont mis en place, tels que la régulation chémosensible de la respiration, en particulier les réponses à l'hypoxie et à l'hypercapnie, les mécanismes liés aux états de vigilance, et certains contrôles neuromodulateurs comme l'inhibition par les neurones noradrénergiques de A5 et la modulation cholinergique. Cette maturation de la rythmogenèse respiratoire se poursuit après la naissance, surtout chez les espèces qui naissent très immatures, comme les rongeurs.

3. La maturation post-natale de la respiration.

À la naissance, le système respiratoire doit être assez mature pour assurer sa fonction d'échangeur de gaz. Les mouvements respiratoires fœtaux irréguliers doivent donc se transformer en une ventilation performante, régulière et synchronisée.

3.1 Caractéristiques de la respiration à la naissance.

3.1.1 In vivo.

Chez l'humain, la fréquence respiratoire des nouveau-nés augmente, passant de 70 à 90 respirations par minute en l'espace de 90 minutes (revu par Mortola, 1987). Cependant, cette respiration reste très irrégulière, comprenant notamment des périodes d'alternance entre des épisodes d'apnée et des bouffées de respiration à haute fréquence. Ces caractéristiques

sont observées dans les jours qui suivent la naissance chez plusieurs espèces de mammifères étudiées par Mortola : souris, rats, cobaye, lapin, chat, porc et chien (Mortola, 1984). L'allométrie permet de comparer les paramètres respiratoires entre les différentes espèces utilisées, elle consiste à étudier la variation des paramètres physiques en fonction de la taille des individus. Les équations allométriques décrivent donc les relations entre un paramètre anatomique ou physiologique et la masse corporelle. Ces équations servent à comparer les paramètres physiologiques au sein d'une même espèce mais pour des individus d'âge différent. Par exemple, notre étude concerne la comparaison des paramètres respiratoires : la fréquence (fR), le volume inspiratoire (V_T) et le volume minute (Vm), liés par la relation : Vm = $fR \times V_T$.

Ainsi, les paramètres respiratoires et la consommation d'oxygène (VO2, ml/min) ont pu être comparés entre les nouveau-nés et les adultes de plusieurs espèces de mammifères (Mortola & Noworaj, 1984). Ces comparaisons amènent à plusieurs conclusions. Tout d'abord, lors de la respiration aérobie du mammifère, le volume minute change proportionnellement à la consommation d'oxygène, qui est elle-même directement reliée à l'intensité du métabolisme. La comparaison des Vm et VO₂ chez différentes espèces de mammifères, allant de la souris à l'homme, à divers âges montre que la relation entre ces deux paramètres varie peu selon l'âge ou l'espèce : le rapport Vm / VO2 est similaire, valant environ 2,2% (Mortola & Noworaj, 1984). Ces deux variables sont liées à la masse corporelle (M) par une équation faisant intervenir la puissance $\frac{3}{4}$ de M : Vm = a × Vm^{3/4}. Pour les grosses espèces de mammifères, Vm est plus fort chez les nouveau-nés que chez les adultes, alors que cette différence diminue pour les représentants des petites espèces. Le volume inspiratoire est quant à lui directement proportionnel à la masse corporelle : $V_T = b \times M^1$. Le volume inspiratoire est donc constant tout au long de la vie postnatale et vaut environ 8 ml / kg. Pour la fréquence respiratoire, une décroissance inversement proportionnelle à la masse corporelle est observée. En effet, les relations ci-dessus donnent fR = Vm / V_T = $a/b \times M^{-\frac{1}{4}}$. Les variations de fréquence avec l'âge de l'individu dépendent de la taille de l'espèce : chez les espèces les plus grosses, les nouveau-nés respirent avec une fréquence 2 à 3 fois supérieure à celle des adultes, alors que pour les mammifères de plus petite taille, les nouveau-nés et les adultes respirent quasiment à la même vitesse. Par exemple, le chaton présente une respiration rapide (environ 100 cycles par minute) dont la fréquence diminue ensuite pour parvenir aux valeurs adultes (environ 75 cycles par minute). En revanche, chez les nouveau-nés de la souris, un Vm et une fréquence respiratoire inférieurs au valeurs adultes sont en général

observés. Ces nouveau-nés des espèces de petite taille font donc moins facilement face aux demandes externes par rapport aux nouveau-nés des grosses espèces.

Chez la souris des études antérieures (Borday, 1997), nécessaires à l'étude des animaux transgéniques ont décrit l'évolution des paramètres respiratoires au cours des premières semaines postnatales, qui ont pu être confirmé au cours du présent travail. Tout d'abord, le premier jour postnatal est caractérisé par une respiration très irrégulière tant en fréquence qu'en volume inspiratoire. De nombreux épisodes d'apnée alternent avec des phases polypnéiques ou des périodes pendant lesquelles la fréquence respiratoire est faible. Les épisodes apnéiques peuvent représenter jusqu'à 10% du temps total d'enregistrement et disparaissent progressivement au cours des premières 36 heures. La respiration devient alors plus stable et plus régulière.

Au cours des premières semaines, le volume inspiratoire suit l'évolution de la masse corporelle, entraînant une constance des valeurs de V_T/M . Les volumes inspiratoires moyens mesurés pendant la première semaine postnatale sont de 10 à 13 ml/kg, ce qui correspond aux valeurs adultes. La fréquence respiratoire à la naissance est d'environ 100 cycles par minute. L'évolution de la fréquence respiratoire chez la souris suit un schéma assez particulier : une augmentation se produit d'abord jusqu'à P7, puis les valeurs stagnent autour de valeurs proches des valeurs adultes (250 cycles par minutes) avant de devenir très supérieures vers P20 puis de rechuter à nouveau.

3.1.2 In vitro.

La maturation de la respiration peut être observée *in vitro* sur des préparations de tranche sagittale de tronc cérébral provenant de souris entre P0 et P15 (Paton et al., 1994) et sur des préparations transversales de tronc cérébral (Ramirez et al., 1996). Deux types de décharges respiratoires sont enregistrées sur ces préparations. Les premières, brèves et décroissantes, sont observées de P0 à P10, les autres, plus longues, présentent une composante en plateau et sont visibles au-delà de P15. Les décharges brèves et décroissantes correspondent à l'activité du complexe pré-Bötzinger (pBC). Les décharges plus longues sont enregistrées le plus souvent au niveau de la racine motrice du nerf hypoglosse. Chez les souris nouveau-nées de P0 à P18, le nerf hypoglosse présente une décharge seulement toutes les 3 à 4 bouffées du pBC. Un découplage progressif des activités de l'hypoglosse et du pBC est donc observé au cours du développement postnatal.

La rampe inspiratoire ainsi que l'activité déclinante post-inspiratoire ne sont pas observées sur les préparations de tronc cérébral de nouveau-né isolé *in vitro*, alors qu'elles sont présentes *in vivo* et sur des préparations de tronc cérébral perfusé *in situ* (Bianchi et al., 1995; Richter & Spyer, 2001). De plus, l'activité respiratoire néonatale est souvent constituée d'oscillations rapides. Ce type d'activité semble lié à une synchronisation impliquant un couplage électrique intense via des jonctions gap (Rekling et al., 2000), qui persiste durant les deux premières semaines postnatales. Chez l'adulte, la sommation graduelle des activités post-synaptiques produit des décharges rapides et de telles oscillations ne sont observées qu'en cas de faiblesse de la transmission inhibitrice (Richter & Spyer, 2001).

Le noyau du tractus solitaire, site d'arrivée des afférences chémosensorielles, subit lui aussi des modifications importantes autour du troisième jour postnatal. En effet, les neurones présentent en général un état d'excitabilité supérieur pendant les trois premiers jours qui suivent la naissance (Schweitzer et al., 1992 ; Vincent et al., 1996). La maturation concerne ensuite aussi bien les propriétés électriques et anatomiques des neurones que le fonctionnement des synapses. Les activités neuronales en bouffées sont fréquentes chez les animaux nouveau-nés ; tandis que des courants potassiques identiques à ceux des individus adultes sont enregistrés dès la fin de la première semaine (Kalia et al., 1993). La morphologie des neurones est aussi modifiée, établissant une corrélation entre la forme de l'arborisation dendritique et la présence ou l'absence du courant potassique transitoire I_A.

L'ensemble des données obtenues *in vivo* et *in vitro* établissent qu'il existe une maturation postnatale de l'activité respiratoire et que celle-ci met en jeu des mécanismes moléculaires au sein du tronc cérébral. Chez la souris, cette maturation est achevée vers la troisième semaine et la respiration présente alors ses caractéristiques finales.

3.2 Le développement postnatal des réflexes respiratoires.

Les expériences concernant le contrôle de la respiration *in vivo* montrent que le système respiratoire subit une évolution majeure lors de la première semaine postnatale. Juste après la naissance, les expirations sont longues et irrégulières (Haddad & Mellins, 1984; Marlot & Duron, 1979), la régulation cardio-respiratoire chez l'humain est très variable (Harper et al., 1976; Hoppenbrouwers et al., 1977). La réponse aux signaux extérieurs, en particulier à l'hypoxie, est inadaptée (cf. revue par Haddad & Mellins, 1984). La réponse suivant une stimulation des corps carotidiens augmente après la naissance (Hertzberg et al., 1990). Le réflexe de Hering-Breuer, initié par les récepteurs pulmonaires à l'étirement, joue

un rôle prédominant (Trippenbach, 1986), et les afférences vagales participent activement à la rythmogenèse respiratoire (Fedorko et al., 1988). Comme chez l'adulte, ces afférences interviennent dans l'arrêt de la phase inspiratoire et la transition de phase, elles contribuent activement chez le nouveau-né à la stabilisation et à la régularité du rythme (Smith et al., 1990; Greer et al., 1992). De plus, le réflexe de déflation, responsable du ré-enclenchement de l'inspiration alors que les poumons sont vides, est absent chez les individus nouveau-nés (Marlot & Duron, 1979).

Chez les chatons nouveau-nés, les effets de l'hypoxie sur la ventilation ont été étudiés entre deux jours et huit mois postnataux (Bonora et al., 1984). Au cours du premier mois (de P14 à P28), le volume minute sous hypoxie diminue, tandis qu'il augmente chez les chatons plus âgés et chez le chat adulte. La réponse ventilatoire à l'hypoxie est mature à la fin du deuxième mois chez le chaton. La respiration observée entre 7 et 14 jours après la naissance ressemble fortement à celle du chat adulte chémo-dénervé exposé à la même hypoxie : les chémorécepteurs périphériques subissent donc eux aussi une étape de maturation post-natale. Les rats nouveau-nés présentent une réponse biphasique à l'hypoxie : la ventilation augmente tout d'abord pendant les 1 à 2 premières minutes d'exposition, puis elle diminue pour retrouver son niveau contrôle ou vers des valeurs inférieures pendant les minutes suivantes (Eden & Hanson, 1987). La deuxième phase devient moins marquée au-delà de 14 jours postnataux.

Les chémorécepteurs périphériques prennent une grande importance au cours de la période périnatale. En effet, bien qu'ils n'interviennent pas directement dans la rythmogenèse, ni dans l'initiation des mouvements fœtaux ou de la ventilation à la naissance, leur déafférentation prénatale conduit à plusieurs déficits (Haddad et al., 1995). Après une chémodénervation, la ventilation de l'agneau ne subit pas sa maturation normale et les animaux opérés présentent un taux de mortalité de 30% dans les semaines ou les mois suivant la chirurgie. Chez d'autres espèces, la déafférentation des chémorécepteurs périphériques induit aussi des perturbations létales (Donnelly & Haddad, 1990). La chémo-dénervation entraîne par exemple une désaturation sévère de l'hémoglobine pendant le sommeil à mouvements rapides des yeux (Haddad et al., 1995) et une respiration périodique comportant de profondes apnées pendant le sommeil calme chez les porcelets (Donnelly & Haddad, 1990). Le caractère mortel de la déafférentation de chémorécepteurs est présent uniquement pendant une fenêtre de développement étroite, en-dehors de laquelle les altérations de l'activité respiratoire issues de l'opération sont relativement mineures (Donnelly & Haddad, 1990). Le mauvais fonctionnement périnatal des chémorécepteurs périphériques pourrait ainsi être impliqué dans certaines formes de mort subite du nourrisson (Naeye et al., 1976 ; Perrin et al., 1984).

Ces réactions très intenses à la chémo-dénervation observées aux alentours de la naissance suggèrent que le système de contrôle de la respiration est différent chez le nouveauné et chez l'adulte. Ces distinctions portent sur deux points : la réponse respiratoire aiguë aux modifications du taux d'oxygène inspiré est moindre chez le nouveau-né par rapport à celle de l'adulte ; le nouveau-né semble incapable de maintenir la stimulation de la respiration produite par une hypoxie aiguë (Haddad et al., 1995). L'hyperoxie aiguë inhibe rapidement les chémorécepteurs périphériques ; en mesurant les modifications suite à une exposition hyperoxique, la contribution des chémorécepteurs carotidiens dans la respiration normale peut donc être évaluée. Cette activité de base de chémorécepteurs pendant l'eupnée augmente chez le rat de 5 à 30% au cours des deux premières semaines postnatales (Hertzberg et al., 1990). Chez l'agneau, cette augmentation se produit pendant le premier mois et fait passer la contribution des chémorécepteurs de 10 à 30 % (Haddad et al., 1995).

3.3 L'évolution des propriétés neuronales, des transmissions et de la modulation synaptique.

Après la naissance, en particulier chez les rongeurs, les propriétés membranaires et électriques des neurones, les systèmes de neurotransmission et de neuromodulation évoluent. Le potentiel de repos des neurones respiratoires des nouveau-nés est relativement plus élevé (vers –50 mV) que celui des neurones respiratoires matures, qui se situe vers –60 mV (Richter & Spyer, 2001). De plus, si les neurones expriment à la naissance une grande diversité de canaux, il est impossible de savoir si ceux-ci sont fonctionnels et s'ils participent réellement à la rythmogenèse respiratoire. En effet, de nombreuses conductances impliquées dans la génération du rythme respiratoire chez l'adulte *in vivo* ne sont pas nécessaires à l'obtention d'un activité pacemaker dans les préparations de tronc cérébral néonatal isolé *in vitro* (Richter & Spyer, 2001).

Le rôle des neurotransmetteurs inhibiteurs est particulièrement susceptible aux modifications périnatales. La résistance des préparations de tronc cérébral néonatal au blocage des systèmes de neurotransmetteurs inhibiteurs (Ramirez et al., 1996 ; Ritter & Zhang, 2000) peut s'expliquer par cette maturation. En effet, le gradient de concentration de l'ion chlorure est inversé chez la souris nouveau-née jusqu'à P3, ce qui élève le potentiel d'inversion du récepteur GABAA, rendant ainsi son activation dépolarisante, alors qu'elle est



Fig. 17. Défauts du programme embryonnaire de segmentation liés à des modifications de la cascade de contrôle génétique.

À gauche sont indiqués les différents contextes génétiques, et dans la colonne de droite, le rhombencéphale segmenté est schématisé avec les différentes perturbations résultant du contexte génétique correspondant.

Chaque rhombomère est symbolisé par un rectangle de couleur différente.

Les croix noires indiquent les territoires éliminés au cours du développement prénatal.

Les hachures identifient les territoires re-spécifiés, la nouvelle identité acquise étant indiquée par la couleur de la hachure. Si les hachures sont placées sur un rhombomère blanc (cas de l'acide rétinoïque), tout le territoire est re-spécifié ; si elles sont superposées à la couleur d'origine du rhombomère, il s'agit d'une re-spécification partielle ($Hoxa1^{-/-}$, $Hoxa2^{-/-}$, $Krox20^{-/-}$, +/kr et kr/kr).

Le territoire r6 blanchi chez kr/kr indique des modifications d'expressions plus tardives de gènes de neurogenèse et de différenciation.

hyperpolarisante chez l'adulte (Ritter & Zhang, 2000). De P0 à P3, le rôle des récepteurs GABAA sur la respiration ne semble pas très important, mais à P3, le gradient des ions Cl⁻ s'inverse, et l'action d'agoniste du GABA devient alors inhibitrice du rythme respiratoire. L'autre grand neuromédiateur inhibiteur, la glycine, subit lui aussi des modifications au cours du développement postnatal. Chez le nouveau-né, son rôle est très faible, puis cette neurotransmission inhibitrice médiée par la glycine prend progressivement de l'importance tout en impliquant divers sous-types de récepteurs (Richter & Spyer, 2001). De plus, il est possible que des transitions entre systèmes GABAergique et glycinergique aient lieu au cours du développement postnatal, renforçant le rôle de la glycine. Par ailleurs, les deux systèmes qu'ils sont toujours séparés chez l'adulte (Richter & Spyer, 2001). Ces résultats suggèrent que la neurotransmission inhibitrice est considérablement modifiée au cours de la vie postnatale, faisant évoluer le réseau neuronal respiratoire d'un système résistant au blocage des neurotransmetteurs inhibiteurs à une configuration adulte qui y est particulièrement sensible (Paton & Richter, 1995).

Les sites d'action des neuromodulateurs sont aussi susceptibles de changer après la naissance. Par exemple, les opioïdes endogènes, qui inhibent fortement la fréquence respiratoire des rats nouveau-nés, agissent sur les récepteurs μ localisés dans les régions du bulbe ventral contenant les centres générateurs du rythme, dont le complexe pré-Bötzinger (Greer et al., 1995). Des expériences d'enregistrement de la respiration par pléthysmographie *in vivo* et d'observation de l'activité respiratoire générée *in vitro* montrent que l'activation des récepteurs opioïdes δ n'affecte pas la respiration des rats nouveau-nés avant la deuxième semaine postnatale. Cependant, le blocage des afférences opioïdes par la naloxone est un puissant stimulateur de l'activité respiratoire, actif dès P0 (Jacquin et al., 1996).

L'évolution de l'activité respiratoire se produit tout au long du développement depuis les premières activités générées chez l'embryon jusqu'après la naissance. Cette maturation progressive, qui transforme un rythme primordial aux fonctions inconnues en une ventilation régulière, organisée et capable d'assurer sa fonction en adaptation avec les circonstances environnementales, est donc intimement liée aux processus développementaux. Elle est donc susceptible d'être modifiée par des mutations qui perturbent le développement (Figure 17) et la mise en place des circuits neuronaux commandant la respiration et des systèmes de neurotransmission qui y sont associés. MATÉRIEL ET MÉTHODES



Fig. 18. Mesure des différents paramètres respiratoires par enregistrement pléthysmographique *in vivo*.

La déflexion vers le haut correspond à l'inspiration, la déflexion vers le bas correspond à l'expiration. Chaque pic correspond à un cycle respiratoire complet. La distance entre deux points équivalents de deux pics adjacents, ou période (T) est l'inverse de la fréquence (fR = 1 / T). L'amplitude d'un pic correspond au volume inspiratoire (V_T). Le temps mis pour atteindre le maximum du pic en partant de la ligne de base est le temps d'inspiration (Ti), le temps mis pour revenir à la ligne de base est le temps d'expiration.

Matériel et méthodes

1. Génotypage des animaux.

Pour connaître le génotype des animaux, la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) est utilisée. Des morceaux de queues sont prélevés sur les animaux lors du sacrifice ou au sevrage puis sont congelés jusqu'à utilisation. Ces morceaux de queue sont ensuite décongelés, lysés par la protéinase K à 55°C pendant la nuit et l'ADN génomique en est extrait à l'aide de colonne de purification (Qiagen). Cet ADN génomique est ensuite utilisé dans des réactions de PCR permettent de savoir s'il possède l'allèle mutant ou sauvage. Les produits de la PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1,5% et donnent généralement des bandes de tailles différentes selon qu'il s'agit de l'allèle muté ou sauvage. Dans le cas des mutants pour le gène *kreisler*, la réaction de PCR est suivie d'une digestion enzymatique des produits à l'aide de l'enzyme de restriction HindIII, les produits digérés étant ensuite déposés sur gel d'agarose.

2. Enregistrements pléthysmographiques.

2.1 Pléthysmographie directe.

La méthode d'enregistrement de la respiration *in vivo* par pléthysmographie a été mise au point par Drorbaugh et Fenn en 1955. Elle consiste à mesurer les variations de pression induites par la respiration de l'animal et à en déduire les paramètres respiratoires (Figure 18) tels que la fréquence (f_R), le volume inspiratoire (V_T), les temps d'inspiration (Ti) et d'expiration (Te) et le volume minute (Vm). Cette méthode, dite de pléthysmographie directe, permet la mesure des variations de pression liées au mouvements de l'abdomen de l'animal. Pour cela, la tête de l'animal est placée dans une membrane étanche, de façon à ce que seul l'abdomen de l'animal soit dans la chambre d'enregistrement. Cette chambre est reliée à un chambre de référence de volume identique via une sonde différentielle de pression (validyne DP103-14) très sensible, capable de détecter des variations de 2 mBar (200 Pa). Les variations de pression détectées par la sonde sont transformées en signal électrique par un démodulateur (validyne CP15) puis ces signaux sont envoyés vers une interface analogique / numérique

animal, sonde thermométrique



Fig. 19. Méthode d'enregistrement de la respiration par pléthysmographie in vivo.

A. Photographies montrant l'ensemble de l'appareillage en cours d'enregistrement. L'animal est placé dans une chambre étanche reliée à une chambre de référence de volume identique. Entre ces deux chambres, une sonde différentielle de pression convertit les variations de pression en signaux électriques qui sont ensuite filtrés, amplifiés et enregistrés sur ordinateur.

B. Schématisation du montage pléthysmographique. L'enregistrement sur ordinateur permet l'analyse des tracés, la détection de chaque minimum et maximum permet de calculer la période (T) et donc la fréquence des cycles respiratoires, l'amplitude (V) donne le volume inspiratoire.

(Labmaster ou CED1401) et enregistrés sur un ordinateur de type PC avec une fréquence d'échantillonnage de 1 kHz (Figure 19). La conversion des signaux électriques en variations de pression est assurée en réalisant au cours de l'enregistrement une calibration de volume connu, qui induit une déflection du tracé dont l'amplitude en mV sera mesurée par la suite.

L'un des avantages de cette méthode est que la tête de l'animal est isolée du reste du corps : il est donc possible de faire respirer à l'animal de l'air de composition prédéfinie et ainsi de le soumettre à des tests d'hyperoxie ou d'hypoxie. Dans ce cas, la partie du pléthysmographe qui contient la tête de l'animal est alimentée avec 100% O_2 (hyperoxie) ou avec un mélange de 12% d' O_2 dans N_2 (hypoxie) avec un débit de 0,3 l/min. Ces gaz sont préalablement humidifiés et chauffés à 31°C par passage dans des flacons d'eau placés dans un bain-marie.

2.2 Pléthysmographie globale.

La méthode de pléthysmographie directe ne peut pas être employée avec des souris nouveau-nées car les mouvements de l'abdomen sont de trop faible amplitude pour être détectés et le passage de la tête à travers la membrane serait traumatisant. C'est pourquoi nous utilisons la méthode de pléthysmographie globale sur les nouveau-nés. Il s'agit d'une adaptation de la pléthysmographie directe, mise au point par Bartlett et Tenney en 1970 (Bartlett & Tenney, 1970). Dans ce cas, l'animal tout entier est placé dans la chambre d'enregistrement fermée hermétiquement et les variations de pression enregistrées sont dues à des changements de température et de quantité de vapeur d'eau. En effet, au cours du cycle respiratoire, l'air va se réchauffer et se charger en vapeur d'eau, l'air expiré est donc plus chaud et contient plus de vapeur d'eau que l'air inspiré. À volume constant, ces variations vont donc induire des modifications de pression dans la chambre d'enregistrement, qui seront détectées par la sonde différentielle (Figure 19). Comme pour la pléthysmographie directe, les variations de pression sont ensuite converties en signaux électriques qui sont enregistrés sur un ordinateur via une interface. De même, une calibration de volume connu (quelques µl) est injectée dans la chambre au cours de l'enregistrement afin de pouvoir reconvertir les variations des signaux électriques en variations de volumes. Dans cette méthode, la chambre d'enregistrement est équipée d'une sonde thermométrique (LN 35 Z) et la température de l'animal est mesurée avant chaque enregistrement. En effet, ces deux valeurs de température interviennent dans la calcul du volume inspiratoire. De plus, il est important de vérifier que les enregistrements sont réalisés à une température proche de la neutralité thermique pour les souris nouveau-nées (31 °C) car ces animaux sont incapables de réguler correctement leur température corporelle. Or il est admis que les variations de température corporelle entraînent des variations des paramètres respiratoires. C'est pourquoi nous avons réduit les risques d'incertitude en travaillant à une température de la chambre d'enregistrement proche de la thermoneutralité.

Cette méthode présente l'avantage d'être non invasive et assez peu traumatisante pour les nouveau-nés. De plus, la chambre d'enregistrement étant transparente, les animaux peuvent être observés au cours de l'enregistrement et les comportements anormaux (hoquets) ou les périodes de mouvement peuvent ainsi être notés. Nous avons utilisé des chambres de 20 ml et 40 ml en fonction de la taille des animaux.

Les expériences de pléthysmographie chez la souris adulte, incluses dans l'étude sur les animaux invalidés pour le gène de l'acétylcholine estérase (cf. résultats, chapitre 5) ont été réalisées au sein du laboratoire par Arthur Foutz et Éliane Boudinot.

2.3 Calculs des paramètres respiratoires.

Une méthode d'analyse assistée par ordinateur est utilisée pour calculer les différents paramètres respiratoires : la fréquence respiratoire (fR), c'est-à-dire le nombre de cycles respiratoires en une minute (donnée en min⁻¹), le volume inspiratoire ou volume courant (V_T , en µl) les temps d'inspiration et d'expiration (Ti et Te, en s) et le volume minute (Vm). Les logiciels *Acquis1* (BioLogic, Claix, France) ou *Elphy*, créés par G. Sadoc, permettent à la fois l'enregistrement et l'analyse de la respiration avec les méthodes de pléthysmographie. Dans un premier temps, les périodes d'enregistrement pendant lesquelles l'animal a bougé, était en apnée ou en polypnée, sont exclues de l'analyse. Ainsi, l'analyse ne porte que sur la respiration régulière pendant les périodes où l'animal est calme.

Cette analyse consiste en une détection des minima et des maxima du tracé, ce qui correspond au début et à la fin de chaque inspiration. Chaque cycle peut être corrigé manuellement. Ces données sont ensuite utilisées pour en déduire la fréquence respiratoire, le Ti et le Te. Le volume inspiratoire est ensuite calculé à partir des valeurs de température corporelle de l'animal (Tr), de la température de la chambre (Tc, 304 K), du volume de calibration (Vk, en μ l) et de l'amplitude de cette calibration en mV (Pk, en mV), de la pression atmosphérique (Pb, en mmHg), de la pression de vapeur saturante de l'eau à la température corporelle (Pr, en mmHg) et de la pression de vapeur saturante de l'eau à la température de la chambre (Pc, en mmHg) à partir de la formule suivante :

$$V_{T} = Pt \times \frac{Vk}{Pk} \times \frac{Tr \times (Pb - Pc)}{Tr \times (Pb - Pc) - Tc \times (Pb - Pr)}$$

Les données concernant chaque enregistrement sont ensuite sauvegardées dans un fichier qui contient tous les paramètres d'analyse, les minima et maxima détectés et les valeurs calculées des paramètres respiratoires.

Il est maintenant relativement bien admis que le volume courant en normoxie est lié à la masse corporelle des animaux et c'est une caractéristique que nous avons pu observer au cours de nos études pléthysmographiques. Pour pouvoir comparer les animaux entre eux, nous n'utilisons donc pas la valeur brute du volume courant (V_T) mais sa valeur divisée par le poids de l'animal correspondant au moment de la mesure (V_T/M). De même, le volume minute, qui représente le volume d'air inspiré par un animal en une minute est calculé en fonction de la masse : Vm = V_T/M × fR, exprimé en ml.g⁻¹.min⁻¹.

3. Tests comportementaux.

Les enregistrements de la respiration chez les nouveau-nés *in vivo* sont réalisés tout au long de la première semaine postnatale (P0 à P7). Ces enregistrements sont assortis d'une batterie de tests comportementaux destinés à vérifier certaines fonctions contrôlées par le tronc cérébral.

3.1 Température corporelle.

Cette mesure est nécessaire au calcul du volume inspiratoire après les enregistrements pléthysmographiques. Chez les nouveau-nés, la prise de la température rectale n'est pas réalisable, c'est donc la température buccale qui est mesurée à l'aide d'une sonde thermométrique.

3.2 Test de mastication.

La mastication ou la succion sont des comportements moteurs rythmiques contrôlés par le noyau moteur du trijumeau qui contient un générateur central masticatoire. Pour tester la fonction masticatoire, le nombre de mastications induites par une stimulation péribuccale est compté pendant 30 s. Pour des raisons pratiques, ce test est effectué grâce à la sonde thermométrique qui permet de mesurer la température corporelle de l'animal.

3.3 Test de retournement.

Dès la naissance, les rongeurs nouveau-nés sont capables de se retourner sur leurs pattes quand ils ont été placés sur le dos, c'est le réflexe de retournement. Celui-ci fait intervenir l'oreille interne et les neurones des noyaux vestibulaires, qui peuvent être touchés par certaines mutations. Le temps mis par les animaux à se retourner est donc mesuré (en secondes) avec un temps maximum de 30 s.

3.4 Test de rejet buccal.

L'animal est placé sur le dos et un morceau de cathéter est introduit dans sa bouche. Le temps mis par l'animal pour éjecter le cathéter, par quelque méthode que ce soit, est mesuré en secondes. Ce réflexe fait intervenir les relais de la coordination motrice, tels que le cervelet. Il permet aussi d'observer la protrusion de la langue et sa bonne formation.

3.5 Test de vocalisation.

La capacité des animaux à émettre un son en réponse à une stimulation est testée en leur pinçant délicatement la queue. Ce test est réalisé pour contrôler la perception de la douleur des animaux, ainsi que pour savoir s'ils sont muets ou non.

4. Enregistrements électrophysiologiques de la respiration in vitro.

Cette méthode, dérivée de la préparation mise au point par Suzue en 1984, utilise l'une des caractéristiques les plus intéressantes du rythme respiratoire : il est produit par un générateur central donc l'activité résiste à l'isolement *in vitro*.

4.1 Dissection.

Après avoir été anesthésié, l'animal est fixé sur le ventre, sa boîte crânienne est rapidement dégagée puis ouverte. L'animal est ensuite décérébré puis le crâne postérieur et les premières vertèbres sont ôtés. Les nerfs crâniens et spinaux sont ensuite coupés à une distance suffisante de leur point de sortie. La moelle épinière est alors sectionnée au niveau



Fig. 20. L'enregistrement des activités respiratoires *in vitro* avec la préparation de tronc cérébral isolé.

A. Schéma représentant le système d'enregistrement des activités respiratoires *in vitro*. Une fois que le tronc cérébral est disséqué, il est placé dans la chambre d'enregistrement (a). La chambre, placée dans un bain-marie à 30°C (b), est perfusée par du liquide cérébrospinal artificiel (LCSA). Un système de succion maintient le volume de la chambre à 1,5 ml et assure le renouvellement du LCSA et donc l'oxygénation de la préparation. Une électrode de succion est placée au niveau de la racine des nerfs crâniens. Le neurogramme recueilli, correspondant à l'activité des nerfs, est amplifié puis intégré et enfin, les tracés (c) sont directement enregistrés sur un ordinateur. Chaque pic correspond à une bouffée inspiratoire, la période (T) est mesurée entre deux pics. Ceci permet l'analyse, en particulier de la fréquence (1/T) des bouffées (voir aussi Figure 3).

B. Vue sagittale du tronc cérébral indiquant le nom et la position des noyaux et les sections réalisée dans les expériences *in vitro*. PM: ponto-mésencéphalique, PB: ponto-bulbaire, TF: trigémino-faciale. La nomenclature des noyaux est indiquée dans les Figures 3 et 4.

cervical postérieur (C6), puis l'ensemble moelle épinière / tronc cérébral / cervelet est isolé. Une section est ensuite réalisée au niveau de l'isthme pour séparer le tronc cérébral du mésencéphale (section ponto-mésencéphalique, PM). Le tronc cérébral ainsi isolé est ensuite transféré dans la chambre d'enregistrement. Pendant toute la durée de l'opération (10 à 15 min) réalisée sur la glace, l'animal est arrosé d'une solution de Ringer à 4°C et oxygénée, afin d'éviter la mort des tissus.

Plusieurs types de préparation ont été utilisés, pour déterminer le rôle de différentes régions du tronc cérébral dans la genèse et la régulation du rythme respiratoire, et pour identifier d'éventuelles modifications de ces contrôles chez les animaux mutants. Ainsi, plusieurs sections, étagées à différents niveaux du tronc cérébral ont été réalisées (Figure 20) : au niveau de la sortie du nerf facial (section trigemino-faciale, TF), en arrière du noyau moteur facial (section ponto-bulbaire, PB). Afin de connaître le niveau anatomique exact des sections réalisées, les portions de tronc cérébral utilisées pour les enregistrements ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% et colorées au violet de crésyl.

4.2 Enregistrements in vitro.

L'enregistrement est effectué dans une chambre de 2 ml, perfusée avec un débit de 1 ml/min environ par du Ringer de composition suivante : NaCl : 128 mM, KCl : 8 mM, CaCl₂ : 1.5 mM, MgSO₄ : 1 mM, NaHCO₃ : 24 mM, NaH2PO₄ : 0.5 mM, glucose : 30 mM, pH7,4, bullé avec un mélange de 5% CO₂ / 95% O₂. La préparation de tronc cérébral isolé est déposée au fond de la chambre, face ventrale vers le haut. Les nerfs XII, C2 ou C4-C6 sont utilisés pour l'enregistrement de l'activité respiratoire. Ceux-ci sont réalisés à l'aide d'une électrode de succion reliée à un amplificateur (Grass). Les signaux bruts sont visualisés sur un oscilloscope et intégrés avec une constante de temps de 40 ms. Les signaux intégrés sont ensuite enregistrés sur un ordinateur.

Nous devons garder à l'esprit que les résultats obtenus sur des préparations néonatales de tronc cérébral isolé *in vitro* ne sont pas entièrement applicables à la génération du rythme *in vivo* chez l'animal adulte et *a fortiori* chez l'humain. En effet, il a été démontré que l'espèce utilisée, l'âge et le type de préparation (*in vivo* : mode d'anesthésie, *in vitro* : tranches, tronc entier) influaient considérablement sur les comportements neuronaux observés sur les neurones respiratoires (Richter & Spyer, 2001 ; Hilaire & Pasaro, 2003). Ainsi, le pBC est une structure qui a surtout été identifiée dans des préparations *in vitro* de rongeurs, mais son existence dans d'autres espèces de mammifères reste inconnue. De même les neurones

pacemaker enregistrés *in vitro* sur des préparations de tranche isolant le pBC n'ont pas été identifiés *in vivo*. Les résultats obtenus doivent donc être considérés avec la plus grande prudence avant de les étendre à d'autres contextes.

4.3 Applications de produits pharmacologiques.

Au cours de certaines expériences, des produits pharmacologiques sont diffusés dans le bain où se trouve la préparation de tronc cérébral isolé pour observer la réponse des neurones respiratoires à ces substances.

Les agents pharmacologiques sont préparés à l'avance en solutions-stocks concentrées, conservées au congélateur. Au moment de l'application, ces solutions-stocks sont décongelées et diluées à la concentration finale dans du Ringer oxygéné, à la même température que celle du bain. Après application de ces produits, une période de lavage est observée pour que la préparation puisse récupérer des effets des agents pharmacologiques.

5. Étude anatomique.

5.1 Perfusion.

En vue de l'étude anatomique du tronc cérébral, certains animaux sont perfusés c'està-dire qu'ils sont vidés de leur sang et fixés par un fixateur chimique. Les animaux sont profondément anesthésiés puis placés sur le dos et fixés par trois pattes. La peau et les muscles des parties abdominales sont enlevés, puis le diaphragme est découpé et la cage thoracique est ouverte en découpant les côtes latéralement. Le thymus est ôté afin de mieux voir l'aorte et les carotides. Le cœur est ensuite incisé au niveau du ventricule gauche, et une aiguille de seringue épointée est insérée dans cette incision. Le pointe de l'aiguille est insérée dans l'aorte puis disposée à la jonction avec la carotide. L'aiguille est ensuite maintenue en place à l'aide d'une pince-clamp. Cette aiguille est reliée à un système de tuyaux installé sur une pompe péristaltique. La vitesse de rotation de la pompe est ajustée de façon à ce que le débit au bout de l'aiguille soit continu. Le cœur doit encore battre faiblement, pour pouvoir amorcer la perfusion.

Pour éviter toute interférence des hématies avec les anticorps ou les réactifs utilisés par la suite, les animaux sont d'abord lavés de leur sang par un passage de sérum physiologique (NaCl 9‰, 15 ml à P0, 30 ml à P10), le liquide s'écoulant par la veine jugulaire sectionnée.

Ensuite, les animaux sont fixés par un passage de solution à 4% de paraformaldéhyde (Sigma) dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, Qbiogene) à pH 7,4. Une fois que les animaux sont suffisamment fixés, une dissection en vue dorsale est réalisée afin de dégager l'encéphale et la moelle épinière. Ceux-ci sont ensuite prélevés et post-fixés pendant une nuit dans du paraformaldéhyde 4%. Les cerveaux sont transférés dans une solution de sucrose à 30% dans du PBS jusqu'à utilisation.

5.2 Sections et marquages immunohistochimiques.

Les cerveaux sont rincés dans du PBS pour éliminer toute trace de sucrose puis ils sont montés sur des socles de coupe et inclus dans un milieu de coupe (Tissue Tek, Sakura). Des sections de 20 ou 40 µm sont réalisées avec un cryostat (Leica). Trois ou quatre séries de coupes adjacentes sont obtenues en alternant les lames (SuperFrost) sur lesquelles les coupes sont déposées. Ceci nous permet d'utiliser trois ou quatre marquages différents sur les mêmes animaux. Les lames sont conservées au congélateur (-20°C) jusqu'à utilisation. Une série de coupes est colorée par un marquage au violet de crésyl (Sigma), les autres séries sont soumises à des marquages immunohistochimiques dirigés contre la tyrosine hydroxylase (TH) et la choline acétyltransférase (ChAT) ou à une détection de l'acétylcholine estérase (AChE), afin de localiser et d'identifier les noyaux du tronc cérébral.

Pour réaliser les marquages immunohistochimiques, les lames sont d'abord décongelées et mises à sécher à l'abri de la poussière pendant 45 minutes. Les coupes sont ensuite réhydratées dans du PBS, puis les peroxydases endogènes sont bloquées (TH, ChAT) par un bain de 10 minutes dans du PBS contenant 0,3% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les interactions non spécifiques sont diminuées par un bain de 1 heure dans du PBS contenant 4% d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma) et 0,2% de Triton X-100 (TX-100, Sigma), pH 7,4. Les anticorps primaires anti-TH (fait chez le lapin, Institut Jacques Boy, Reims) et anti-ChAT (fait chez la chèvre, Chemicon) sont déposés directement sur les lames à raison de 400 µl par lame, en employant une dilution de 1:1000. Les lames, placées dans une chambre humide sont laissées avec l'anticorps primaire toute la nuit à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec du PBS 4% BSA, 0,2% TX-100 puis les anticorps sur les lames en étant dilués à 1:200 et laissés à incuber pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec trois fois 10 minutes avec du PBS 4% BSA, 0,2% TX-100 puis les anticorps sur les lames en étant dilués à 1:200 et laissés à incuber pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec du PBS 4% BSA, 0,2% TX-100 puis les anticorps sur les lames en étant dilués à 1:200 et laissés à incuber pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec du PBS 4% BSA, 0,2%

streptavidine couplée à la peroxydase de racine de raifort (kit ABC peroxydase, Vector). Les lames sont ensuite rincées deux fois 10 minutes avec du PBS et une fois avec du Tris 0,05 M, pH 7.6 (Sigma). Les marquages sont ensuite révélés par le passage des lames dans une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma, 20 mg dans 200 ml de Tris 0,05 M pH 7,6 en présence de 0,003% H_2O_2) qui est un substrat de la peroxydase dont le produit donne un précipité brun qui permet de localiser les cellules exprimant l'enzyme détectée.

La détection de l'AChE se fait selon la méthode de Paxinos. Les coupes sont mises à incuber pendant 15 h à température ambiante dans une solution contenant 100 ml d'un solution-mère d'acétate de sodium 50 mM, 116 g de S-acétylthiocholine iodide et 3mg d'éthoprozine, puis elles sont rincées à l'eau courante. La solution-mère d'acétate de sodium contient pour un litre : 6,8 g d'acétate de sodium, 1 g de sulfate de cuivre et 1,2 g de glycine, le pH est ajusté à 5 et le volume complété à un litre. La révélation de ce marquage est obtenue en incubant les coupes dans une solution à 1% de sulfure d'ammonium à pH 7,5 pendant 10 minutes, les coupes étant ensuite rincées à l'eau courante.

Les lames colorées au violet de crésyl, immunomarquées ou ayant servi à la détection de l'AChE sont ensuite déshydratées par des bains successifs d'éthanol en concentration croissante, de éthanol 50° à éthanol absolu, puis par deux bains de xylène. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle en utilisant un milieu de montage hydrophobe à base de xylène.

5.3 Reconstructions anatomiques.

Une fois les lames montées et le milieu de montage sec, les coupes sont observées sur un microscope équipé d'une camera lucida. Chaque série de marquage est observée à part. Les coupes sont reproduites sur des feuilles de papier calque grâce à la camera lucida, plusieurs coupes étant empilées les unes sur les autres au cours des séances de dessin, grâce à des repères anatomiques (moelle épinière, noyau pontique). Les résultats provenant des différents marquages sont ensuite assemblés pour créer, pour chaque animal, un schéma de son tronc cérébral récapitulant toutes les informations anatomiques. Cette technique permet de reconstruire les tronc cérébraux des différents animaux et ainsi d'identifier, en comparant avec les données d'un atlas anatomique, des perturbations anatomiques éventuelles : présence ou absence de certains noyaux, formes et étendues des noyaux, mesure de distances entre les noyaux, taille totale du tronc cérébral.

RÉSULTATS

Résultats

Modifications du réseau respiratoire et de l'anatomie du tronc cérébral chez des souris invalidées ou mutantes pour un gène.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont présentés dans 6 chapitres. Le premier chapitre identifie l'origine rhombomérique d'un système neuronal pontique « antiapnéique » vital à la naissance. Le second chapitre présente le phénotype respiratoire obtenu sur les animaux mutants hétérozygotes *kreisler*. Le troisième chapitre compare les résultats et les phénotypes anatomo-fonctionnels de divers mutants de gènes de segmentation. Le quatrième chapitre présente les effets sur le contrôle neuronal respiratoire d'une mutation indépendante de la segmentation, celle du gène de l'acétylcholine estérase. Le cinquième chapitre contient les résultats concernant une approche pharmacologique de modification du programme génétique de segmentation en utilisant l'acide rétinoïque. Enfin, le dernier chapitre regroupe des données concernant l'importance de la région para-faciale et des neuromodulateurs opioïdes pour le contrôle respiratoire et la survie à la naissance.

Chapitre 1

Identification de l'origine rhombomérique d'un centre pontique anti-apnéique.

1. Introduction.

De précédentes études réalisées au laboratoire par Véronique Borday sur des souris mutantes pour le gène *Krox20* (Jacquin et al., 1996) et par Eduardo Domínguez del Toro sur des souris mutantes pour le gène *Hoxa1* (Domínguez del Toro et al., 2001) ont montré que l'expression des gènes contrôlant la segmentation est nécessaire pour la survie postnatale. De plus, l'analyse de la rythmogenèse centrale *in vitro* a permis d'identifier un système neuronal stimulateur du rythme respiratoire et situé dans le pont (Borday et al., 1997). Ce système paraît particulièrement important pour le passage d'un stade décisif qui se situe à la fin du premier jour de vie des souris nouveau-nées.

Les souris $Krox20^{-/-}$ présentent une re-spécification embryonnaire suivie d'une élimination des rhombomères 3 et 5, ce qui se traduit chez le nouveau-né par une hypoplasie de la formation réticulée pontique ainsi que du noyau moteur trijumeau. D'autre part, ces animaux présentent à la naissance une fréquence respiratoire très faible, associée à un grand nombre d'apnées de longue durée comparativement à leur frères et sœurs sauvages. Ces animaux meurent au cours du premier jour postnatal, mais survivent après un traitement avec la naloxone, antagoniste des enképhalines endogènes inhibitrices de la respiration (cf. introduction). Les expériences de transection effectuées *in vitro* sur ces animaux $Krox20^{-/-}$ montrent que la fréquence respiratoire basse est due à des modifications dans le pont : la mutation Krox20 affecte sélectivement une population de cellules excitatrices du rythme respiratoire en laissant intacts le générateur central rythmique bulbaire et son contrôle inhibiteur en provenance de A5. L'hypothèse qu'une réorganisation des circuits neuronaux, dues aux événements embryonnaires, contribuait à la mortalité néonatale, a donc été proposée.

Chez les souris *Hoxa1^{-/-}*, une faible fréquence respiratoire associée à une forte mortalité dans le premier jour suivant la naissance est aussi observée. Or, chez ces souris, la totalité du rhombomère 5 et une grande partie du rhombomère 4 sont éliminées, tandis que des cellules des rhombomères 3 et 4 subissent des modifications de leur identité

rhombomérique, en exprimant de façon anormale des gènes habituellement exprimés dans le rhombomère 2. Il en résulte l'élimination du noyau moteur facial et de la formation réticulée adjacente. De même que dans le cas des souris $Krox20^{-/-}$, des expériences d'enregistrement de l'activité respiratoire *in vitro* ont mis en évidence que des neurones pontiques étaient affectés par la mutation $Hoxa1^{-/-}$. Ces expériences renforcent l'hypothèse d'une réorganisation des réseaux neuronaux respiratoires conduisant à la mortalité néonatale. Elles suggèrent que l'importance de Krox20 résulte de son action sur la régulation des gènes Hox, comme par exemple lors de la mise en place de la frontière entre les rhombomères r3 et r4 par inhibition de l'expression de Hoxa1.

2. Souris transgéniques Hoxa2.

Collaboration : M. Pasqualetti, F. Rijli, IGBMC - CU de Strasbourg, Illkirch.

Au sein de r3, l'expression du gène *Krox20* induit celle de *Hoxa2*, introduisant ainsi un territoire commun d'expression. De plus, l'inactivation du gène *Hoxa2* est létale pendant le premier jour postnatal. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le comportement respiratoire, masticatoire et locomoteur des souris invalidées pour le gène *Hoxa2*, à la naissance. Contrairement aux autres mutations présentées ici, l'invalidation du gène *Hoxa2* n'entraîne pas chez l'embryon de disparition ou d'élimination de rhombomère. Par contre, c'est l'unique gène *Hox* qui s'exprime dans le rhombomère 2, sa mutation induit donc un changement d'identité de ce rhombomère qui n'exprime plus aucun marqueur de segmentation, et devient donc proche de l'identité du rhombomère 1 du point de vue des marqueurs moléculaires.

L'étude anatomique de ces animaux révèle des perturbations liés à l'absence d'expression de gènes *Hox* dans le rhombomère 2, corrélées avec les observations réalisées auparavant chez l'embryon (Gavalas et al., 1997). En effet, nous avons noté chez les souris homozygotes mutantes une extension du locus coeruleus, habituellement restreint aux territoires dérivés du rhombomère 1, ainsi qu'une extension antéro-postérieure du noyau pontique. Nous avons aussi observé chez ces animaux que le comportement rythmique orobuccal était altéré, le nombre de mastications étant diminué chez les animaux *Hoxa2*^{-/-}.
L'étude comportementale confirme que l'organisation neuronale est anormale. Nous concluons qu'*Hoxa2*, comme *Krox20* est nécessaire au fonctionnement du générateur rythmique qui organise la séquence d'ouverture de la gueule suite à une stimulation buccale. Il s'agit d'un phénotype trigéminal qui n'est pas affecté par l'inactivation de *Hoxa1*, qui altère des territoires plus postérieurs. Cette réorganisation neuronale affecte-t-elle le comportement respiratoire néonatal ?

L'étude détaillée du comportement respiratoire révèle deux phénotypes distincts, l'un observable pendant les premières heures suivant la naissance, l'autre à partir de 12h après la naissance. À la naissance, le volume minute des animaux *Hoxa2^{-/-}* est augmenté par rapport à celui de leurs congénères sauvages et hétérozygotes, par augmentation du volume inspiratoire (amplitude des inspirations), la fréquence étant normale. Ce phénotype n'est pas retrouvé chez les mutants *Krox20^{-/-}*. Les souris mutantes *Hoxa2^{-/-}* ne montrent pas d'évolution du volume inspiratoire entre la naissance et P0.5 (12 heures après la naissance), contrairement à leurs congénères hétérozygotes et sauvages chez lesquels le volume tidal double dans cette période, suggérant ainsi qu'un mécanisme de maturation néonatal du volume inspiratoire est perturbé par cette mutation.

À partir de P0.5, la durée des apnées des animaux augmente significativement et les animaux *Hoxa2^{-/-}* présentent une sensibilité anormale à la naloxone qui augmente la fréquence respiratoire et élimine les périodes d'apnées (cf. publication 1). Ces traits phénotypiques sont aussi observés chez le mutant *Krox20^{-/-}*, mais beaucoup plus marqués. De plus, la naloxone n'a aucun effet sur la survie des animaux *Hoxa2^{-/-}*, alors qu'elle allonge la durée de vie des animaux *Krox20^{-/-}*. Nous concluons donc que les effets respiratoires de l'inactivation de *Krox20* ne s'expliquent pas entièrement par un blocage de la signalisation *Hoxa2*, mais impliquent aussi d'autres régulations, comme celle d'*Hoxa1*.

Ainsi, l'analyse des animaux invalidés pour le gène Hoxa2 démontre que le rhombomère 2 semble peu impliqué dans le contrôle du rythme respiratoire, mais est important dans la mise en place des systèmes gérant le comportement de mastication. Le léger phénotype respiratoire observé chez ces animaux peut s'expliquer par le fait que Hoxa2 s'exprime dans les rhombomères plus postérieurs et qu'il est en partie nécessaire pour l'établissement du réseau neuronal respiratoire. Cependant, il semble possible que chez les animaux invalidés pour Hoxa2, le gène paralogue Hoxb2, qui a le même territoire d'expression que Hoxa2 hormis le rhombomère 2, soit capable d'assumer une partie de la fonction d'Hoxa2 dans les rhombomères plus postérieurs.

Par ailleurs, la comparaison du phénotype respiratoire des mutants Hoxa2^{-/-} avec celui des mutants Krox20^{-/-} et Hoxa1^{-/-} permet de délimiter une région vitale à la naissance. Cette région, sensible aux neuromodulateurs opioïdes, excitatrice du rythme respiratoire et limitant l'occurrence des périodes d'apnées, sera appelée par la suite anti-apnéique. L'analyse des mutants Hoxa2^{-/-} montre que la frontière de ce système anti-apnéique se situe à la limite entre les rhombomères 2 et3.

Publication 1

Chatonnet F., Mézières-Robert V., Pasqualetti M., Rijli F.M. and Champagnat J. (2003). Respiratory abnormalities induced by the *Hoxa2^{-/-}* mutation.

Lack of first hours regulation of the inspiratory volume in *Hoxa2^{-/-}* mutant mice

CHATONNET, F.^{1,CA}, MEZIERES-ROBERT, V.¹, PASQUALETTI, M.², RIJLI, F.², and CHAMPAGNAT J.¹

¹ NGI, UPR 2216, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2218, Centre National de la Recherche Scientifique, F-91198 Gif sur Yvette Cedex, FRANCE.

² IGBMC, CNRS/INSERM/ULP/Collège de France, CU de Strasbourg, F-67404 Illkirch Cedex, FRANCE.

^{CA}: Corresponding author, at ¹ as above, e-mail: Fabrice.Chatonnet@iaf.cnrs-gif.fr.

Running title: Inspiratory control deficiency in *Hoxa2^{-/-}* mice.

Key words: neonate mice, Hoxa2, rhombomeres.

Summary

Normal *Krox20* and *Hoxa1* gene expression and interaction in rhombomeres r3 or r4 are required for the development of the para-facial respiratory group (pFRG), a vital rhythm promoting system controlling the neonatal breathing frequency in mice. We now demonstrate that expression of *Hoxa2*, a target of Krox20 in r3, is not required, indicating that the r2/r3 boundary is the rostral limit of territories required for the development of the pFRG. Instead, we describe in *Hoxa2^{-/-}* KO mice, a novel phenotypic trait affecting the control of inspiratory airflow during the first hours following birth. We suspect it results from an anomaly of the pontine respiratory group following mis-specification of progenitor cells at the r1-r2 level of the embryonic neural tube.

Introduction

The vertebrate hindbrain is a suitable system for studying the genetic and molecular mechanisms controlling patterns of cell specification and differentiation leading to functional neuronal networks. At this level of the central nervous system, central pattern generators produce a low frequency (< 1/min) rhythmic neuronal activity at embryonic days E5 in the chick (Fortin et al., 1995) and E10.5 in mice (Abadie et al., 2000). At these early stages of embryonic development, the hindbrain is transiently partitioned into compartments, the rhombomeres (r), which behave as lineage restriction units (Fraser et al., 1990) and each rhombomere generate a similar repertoire of motor and reticular neurons (Clarke and Lumsden, 1993). The number, distribution and connectivity of neurons are rhombomere-specific, illustrating that positional information along the antero-posterior (A-P) axis may determine neuronal phenotypes and function (Marshall et al., 1992; Carpenter et al., 1993; Simon and Lumsden, 1993). For example, the rhombomeric pattern of hindbrain segmentation in r3-r4 controls the functional development of neural networks that eventually regulate rhythmic behaviors such as breathing. In chick embryos, transition from the low frequency of primordial pattern generators to higher frequency (1/s) of more mature episodic generators takes place in para-facial r3-r4 segment but not after the isolation of trigeminal r2-r3 or facial r4-r5 rhombomeric doublets (Fortin et al., 1999) so that expression of Krox20 in r3 is considered a major inductive signal for episodic generators (Coutinho et al., unpublished).

In mice, inactivation by gene targeting allowed the investigation of the role of hindbrain segmentation in neural net function at birth. Clues to the genetic control of hindbrain segmentation and patterning came from the finding that several classes of genes display rhombomere-restricted expression patterns, including transcription factors such as Krox20, MafB/kreisler and Hox genes at the 3' ends of the of the HoxA and HoxB clusters (reviewed in Lumsden and Krumlauf, 1996). Life threatening anomalies of breathing has been described in $Hoxal^{-/-}$ and $Krox20^{-/-}$ mutants. The $Hoxal^{-/-}$ mutation causes mis-specification of r3 and r4 cells that exhibit phenotypes of r2, Krox20 negative cells. Mis-specified reticular neurons form novel respiratory controlling circuits that do not exist normally in wild-type animals (Domínguez del Toro et al., 2001). Impaired respiratory function in $Krox20^{-/-}$ and $Hoxa1^{-/-}$ transgenic mice results from the elimination of a vital rhythm-promoting neuronal system exerting an anti-apneic respiratory function during the first days after birth. Pathology results from the unbalanced inhibition of the rhythm generation by opioids, leading to a reduced respiratory frequency, apneic breathing and death during the first postnatal days, survival being greatly improved by the administration of an opioid antagonist, naloxone (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001). Development of this anti-apneic system seems to require r3 and r4 but not r5 because it is eliminated in Krox20^{-/-} (Jacquin et al., 1996) and Hoxa1^{-/-} (Domínguez del Toro et al., 2001) mutants in which r3 and r5, and r4 and r5 are reduced respectively, but preserved in homozygous kreisler (kr/kr) mutants (Chatonnet et al., 2002), which lack only r5. The present study was undertaken to investigate a possible role of Hoxa2 and r2 in the patterning of this neonatal respiratory control.

Hoxa2 is the most anteriorly expressed *Hox* gene, with an expression boundary coinciding with the r1/r2 border (Krumlauf, 1994; Prince and Lumsden, 1994). In addition, *Hoxa2* is the only *Hox* gene expressed in r2; in r3 and more caudally in the neural tube, it is co-expressed with its paralog, *Hoxb2* (Krumlauf, 1994 and refs

therein), both expressions being up-regulated by *Krox20* in r3 and r5 (Sham et al., 1993; Nonchev et al., 1996). The targeted inactivation of *Hoxa2* resulted in lethality at birth and in a homeotic transformation of the second arch neural crest-derived skeletal elements into first arch derivatives (Gendron-Maguire et al., 1993; Rijli et al., 1993), demonstrating that *Hoxa2* acting as a selector gene, modifies in the second branchial arch a skeletogenic ground patterning program common to the neural crest of the first and second arches (Rijli et al., 1993; Grammatopoulos et al., 2000; Pasqualetti et al., 2000). In fact, r2-derived neural crest cells that normally do not express any *Hox* genes are not altered, but r4-derived neural crests, normally *Hoxa2*-positive are devoid of any *Hox* gene expression, leading to a homeotic transformation of the second branchial arch into another supernumerary first branchial arch (Rijli et al., 1993).

The *Hoxa2* knockout leaves the *Krox20* expression normal but induces several segmentation-related anatomical defects in the central nervous systems deriving from r1, r2 or r3 (Davenne et al., 1999). Lack of *Hoxa2* results in the loss of the r1/r2 boundary, reduction of alar r2 and r3 territories and r2-derived pontine together with corresponding expansion of the r1 territory and enlargement of the cerebellum. These results suggest that fate changes has occurred in the alar plate (Gavalas et al., 1997). Furthermore, the *Hoxa2* invalidation abolishes in r3 and alters in r2 and r4 expression of the Eph receptor tyrosine kinase EphA7 (Taneja et al., 1996). Axonal pathfinding of r2 and r3 trigeminal motor neurons is modified leading to the innervation of the transformed second branchial arch instead of the first (Gavalas et al., 1997; Davenne et al., 1999). Recently, altered patterning of trigeminothalamic projections and abnormal migratory behavior of ponto-cerebellar neurons originating in the alar plate have been described. Our aim is to investigate functional anomalies that may affect the brainstem

and particularly the control of breathing. To differentiate phenotypic traits that may result from anomalies in r3, the $Hoxa2^{-/-}$ mutation is compared to $Krox20^{-/-}$ and *kreisler*, mutations previously shown to respectively eliminate (Jacquin et al. 1996) and exaggerate (Chatonnet et al., 2002) the neonatal anti-apneic function. Altogether, results reveal abnormal regulation of the inspiratory flow that is not seen in $Krox20^{-/-}$ and *kreisler* mutants. Results also indicate that the anti-apneic activity mostly results from signaling in the para-facial r3r4 rhombomeric doublet, with little contribution of the *Hoxa2* expression or r2.

Methods

Genotype analysis

The *Hoxa2* knockout was obtained by introducing a neo + GFP cassette in the *Hoxa2* locus. DNA was extracted from the tail of the neonate mouse and the genotype was subsequently determined by a PCR assay using a set of oligonucleotide primers.

Plethysmographic recordings

Respiratory activity was measured using a modified barometric method, previously employed in neonates, called whole-body plethysmography (Chatonnet et al., 2002). The plethysmograph chamber (20 ml) equipped with a temperature sensor (LN 35 Z) was connected to a reference chamber of the same volume. The pressure difference between the two chambers was measured with a differential pressure transducer (Validyne DP 103-14) connected to a sine wave carrier demodulator (Validyne, CD15). The spirogram was stored on a computer using a Labmaster interface at a sampling frequency of 1 kHz. Calibrations were recorded at the end of each recording session by injecting 2.5 - 5 μ l of air in the chamber with a Hamilton syringe.

Measurement started 0.5-2 hours after birth and were repeated every 4-6 hours. Neonates were removed individually from the litter and placed in the plethysmograph chamber kept hermetically closed and maintained at 31°C during the recording session (165 s). In each sample, we identified the periods of quiet breathing recorded in the absence of limb or body movements. Duration of these limb, body and head movements were used to determine activity of the neonate mouse during recording. During quiet breathing, a computer-assisted method was used to measure the durations of inspiration and expiration from which respiratory frequency (f) is derived and the tidal volume (V_T , $\mu l/g$) from which minute volume ($V_E = f * V_T / 1000$, ml/g/min) is derived. Apneas (expiration lasting more than 2 s) are not included in frequency calculation. Total duration of apneas per recording session (given in percentage) provided an estimation of the apneic breathing. Comparisons between two sets of data were performed by paired Student's t-tests. Naloxone (1 mg/kg in saline) was administered subcutaneously using an Hamilton syringe, and the next recording carried out one hour after injection.

Before plethysmographic recordings, we counted the number of jaw openings in 30 s by introducing a catheter into the mouth of the newborns, therefore testing the orobuccal reflexes. The righting reflex was quantified by measuring the time spent by the mouse for moving from supine to prone position.

Anatomical observation and immunochemistry

P0 newborn mice (+/+, n = 4; +/-, n = 2; -/-, n = 6) were anaesthetized and intracardially perfused for 15 min with 0.01M phosphate buffer (pH 7.4), followed by a

7

	Wild-type	pe Heterozygous Homo					
Respiratory and behavioral parameters							
Birth weight (g)	1.45 ± 0.006	1.46 ± 0.022	1.40 ± 0.024				
Weight gain at P0.75 (g)	0.24 ± 0.01 16.5 ± 1.0	0.22 ± 0.01 15 1 ± 0 9	-0.09 ± 0.008 *** -6.6 ± 0.6 ***				
fR at P0 (cycles / min)	107 ± 1.3	107 ± 4.0	110 ± 5.7				
Tidal volume at P0 (µl/g)	4.6 ± 0.06	5.3 ± 0.41	10.6 ± 0.87 ***				
V _E at P0 (ml/g/min)	0.52 ± 0.01	0.58 ± 0.06	1.21 ± 0.14 ***				
Apneas at P0 (% of recording duration)	11 ± 0.8	9.6 ± 3.0	8.1 ± 3.7				
Jaw openings at P0 (in 30 s)	24.0 ± 0.41	23.9 ± 1.22	13.6 ± 1.63 ***				
Anatomical measures							
AP length of locus coeruleus (µm)	455 ± 18	420 ± 60	717 ± 23 ***				
DV height of locus coeruleus (µm)	625 ± 60	700 ± 20	1017 ± 73 **				
Distance between LC ventral limit (µm)	1050 ± 25	Not measured	607 ± 79 ***				

Table 1. Respiratory parameters and anatomical measures of wild-type,heterozygous and homozygous Hoxa2 mutant mice at birth.

Values are given as mean \pm SEM. fR: respiratory frequency, V_E: minute volume. Note the loss of weight between birth and P0.75 in *Hoxa2^{-/-}* mice, while their wild-type and heterozygous littermates gain weight. The respiratory frequency and birth weight are not significantly different. Tidal volume at birth was two-fold increased in *Hoxa2^{-/-}* mice (see also Fig. 2), but this feature disappeared rapidly: V_E at P0.75 was not significantly different between the three genotypes. **: P<0.01; ***: P<0.001. mixture of 4% paraformaldehyde in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4). The brain was removed and placed overnight in the same fixative. The brains were then rinsed in phosphate buffer containing 20% sucrose and stored at 4°C until used. Serial parasagittal 40 μ m sections were cut on a cryostat. Sets of three adjacent sections were processed using cresyl violet and polyclonal antibodies to tyrosine hydroxylase (TH) and choline acetyltransferase (ChAT). Sections processed for immunochemistry were incubated overnight at room temperature with the antibody (1:1000 in PBS, pH 7.4; TH: Jacques Boy, France; ChAT: Chemicon), rinsed and then incubated for 2 hours with biotinylated anti-goat (ChAT) or anti-rabbit (TH) serum (Vector 1:200, pH 7.4). Signal amplification was obtained by using the Vectastain ABC kit (Vector). Peroxidase was subsequently revealed in a staining mixture containing 0.05% 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma) and 0.03% H₂O₂ in Tris pH 7.6.

Results

A total of 38 wild-type, 58 $Hoxa2^{+/-}$ and 29 $Hoxa2^{-/-}$ littermates resulting from crossings between heterozygous animals were used in the present study, numbers in accordance with Mendelian repartition of genotypes (χ^2 test, p=0.469). We furthermore reinvestigated the breathing behavior of 17 $Krox20^{-/-}$ and 16 +/kr mutants during the first hours following birth. Wild-type and $Hoxa2^{+/-}$ animals survived normally and were investigated during the first week after birth. All homozygous $Hoxa2^{-/-}$ animals did not feed, loose 6.6% of their birth weight in their first 18 hours of life and died within 12-20 hours after birth, whereas their heterozygous or wild-type littermates fed, gained about 15% of the birth weight during the same period (Table 1) and survived.



Figure 1. Evolution of respiratory parameters during the first postnatal days in wild-type animals.

A, Plethysmographic recordings at different time after birth (P0) during the first postnatal day. Inspiration is upward, and expiration is downward. Note the evolution of tidal volume (respiratory amplitude) and respiratory frequency during the first day. Calibration bars: abscissa: 1 s, ordinates: 10 μ l. B, Evolution of tidal volume per body weight (top) and respiratory frequency (bottom) during the first two days after birth. At birth, the "first breath" is characterized by and high tidal volume and fast frequency. Both parameters rapidly decrease in the first hour and then increase, reaching a plateau for tidal volume (dashed line). Values significantly different from plateau: *** P<0.001.

Normal evolution of breathing during the first post-natal hours in mice

In human infants, the amount of air inhaled with the first inspiratory effort is one of the deepest breaths of the whole neonatal period (Karlberg and Koch, 1962; Saunders and Milner, 1978; Fisher et al., 1982). The respiratory amplitude (tidal volume, V_T) is reduced one minute later and increases afterwards progressively during several hours (see Mortola, 2001; Fig. 1). The comparative analysis of normal and mutant revealed the same increase of the tidal volume in mice, during the first 12 hours after birth. Values of V_T (divided by the body weight for comparative purpose) increased from about 5 µl/g to about 10 µl/g, which is the normal value maintained during the postnatal week (dashed line in Fig. 1B). Because the duration of inspiration (Ti) did not change consistently (Ti = 0.118 ± 0.012 s in wild-type and 0.0112 ± 0.013 in *Hoxa2^{-/-}* mutants), the inspiratory flow (V_T /Ti) doubled during this period. The respiratory frequency (fR) also changed, although less dramatically, increasing by about 50% during the first day, from a value of 110 cycles/min reaching 170 cycles/min at P1 (Fig. 1). Therefore, the first hours increase of the depth of breaths was mostly responsible for the large increased of the average respired volume (minute volume, V_E =fR * V_T).

The Hoxa2^{-/-} mutation suppresses evolution of the inspiratory flow during the first postnatal hours without affecting respiratory frequency

At P0, tidal volume per body weight of homozygous mutants $(10.5 \pm 0.87 \ \mu l/g)$ was two times larger than normal (wild-type: $4.6 \pm 0.06 \ \mu l/g$, $Hoxa2^{+/-}$: $5.3 \pm 0.41 \ \mu l/g$). Samples of plethysmographic recordings (Fig. 2) shows that this increase in tidal volume was not compensated by any decrease in respiratory frequency, which was



Figure 2. Tidal volume of $Hoxa2^{-2}$ mutants did not mature during the first postnatal hours.

A, Plethsymographic recordings of wild-type (top), heterozygous (middle) and homozygous (bottom) *Hoxa2* mutant mice at P0. Inspiration is upward. Note that the tidal volume in *Hoxa2*^{-/-} mice is two-fold increased comparing with wild-type or heterozygous littermates, whereas frequency is the same (about 110 cycles/min). Calibration bars: abscissa: 1 s, ordinates: 20 μ l. B, This graph present the evolution of tidal volume during the first two days after birth in *Hoxa2*^{-/-} (black triangles, continuous line), *Hoxa2*^{+/-} (open circles, dashed line), and wild-type mice (open squares, dotted line). ** P<0.01, *** P<0.001.

similar in the three genotypes at P0 (see Table 1). Consequently, $Hoxa2^{-/-}$ animals exhibited a greater than normal inspiratory flow and V_E at P0 (see Table 1).

At P0.5, the tidal volume of $Hoxa2^{-/-}$ mutant mice was the same as at birth, so that normal increase of V_T was abolished by the mutation (Fig. 2). Thus, at P0.5, the tidal volume values of all genotypes were very similar, ranging from 8 to 11 µl/g. Thus, the *Hoxa2* invalidation perturbs a developmentally regulated mechanism involved in the regulation of the tidal volume during the first postnatal hours. In contrast, *Krox20^{-/-}* mutants and *kreisler* mutants were normal in this respect and could not be differentiated from their respective wild-type littermates by first hours evolution of the tidal volume (Fig. 3).

The values of respiratory frequency at birth were about the same in $Hoxa2^{-/-}$ mutants (fR = 110 ± 5.7 cycles/min at P0, see Table 1 and Fig. 3) as in wild-type animals (fR = 107 ± 1.3 cycles/min). A normal increase of frequency was noted during survival of the $Hoxa2^{-/-}$ animals. At P0.5, the respiratory frequency was 139 ± 9 cycles/min in $Hoxa2^{-/-}$ mice, 127 ± 5 cycles/min in heterozygous mutants and 136 ± 7 cycles/min in wild-type. This result contrasts with observations in $Krox20^{-/-}$ and kreisler heterozygous (+/kr) mutants, in which the respiratory frequency was respectively 60% less (42 ± 24 cycles/min (n=17) at P0.5) and 40% more (163 ± 5 cycles/min (n=16) at P0.5) than normal.

Apneas were not responsible for the lethality of the Hoxa2^{-/-} mutation

The time spent in apneas (expirations lasting more than 2 s) was about 10% of the total time of observation during P0 in $Hoxa2^{-/-}$ mutants, as in wild-type and heterozygous mutant mice (Table 1). The time spent in apneas normally decreased to



Figure 3. Comparison between *Hoxa2*^{-/-} mutants and *Krox20*^{-/-} mutants during the first postnatal days.

These graphs present the evolution of tidal volume (A1, A2) and respiratory frequency (B1, B2) during the first two days after birth. A1, B1, evolution of respiratory parameters in $Hoxa2^{-1}$ (black triangles, continuous line) and wild-type mice (open squares, dotted line). Note that in heterozygous and wild-type animals, the tidal volume rapidly increased during the first 12 hours of life, whereas it did not in $Hoxa2^{-1}$ mice, which were born with a twofold increased tidal volume. A2, B2, evolution of respiratory parameters in $Krox20^{-1}$ (black triangles, continuous line) and their wild-type littermates (open squares, dotted line). Affer P0.5, homozygous mutants died, or survived if treated with naloxone Note that is the mutant mice, the evolution of tidal volume is normal, whereas the deficiency in the respiratory frequency is lethal (Jacquin et al., 1996). ** P<0.01, *** P<0.001.

 $3.2 \pm 2.0\%$ of the recording duration at P0.5 and apneas were suppressed around P2. In Hoxa2^{-/-} mutants, no decrease was observed (time spent in apneas: $17.5 \pm 5.5\%$). Therefore, at P0.5, these animals spent significantly more time in apneas than controls. However, apneas did not greatly influence the average volume inhaled by Hoxa1^{-/-} mutants. The minute volume in homozygous mutants before death (1.36 ± 0.42) ml/g/min) was not significantly different from that at birth $(1.21 \pm 0.14 \text{ ml/g/min})$ or from that in wild-type $(1.71 \pm 0.11 \text{ ml/g/min})$ or heterozygous $(1.43 \pm 0.09 \text{ ml/g/min})$ littermates at the same time (P0.75). In contrast, in $Krox20^{-/-}$ mice, the normal increase of the inspiratory flow was unable to compensate apneas and decrease in frequency so that the minute volume at P0.5 (0.48 ± 0.38 ml/g/min, n=17) was less than half wildtype values $(1.10 \pm 0.79 \text{ ml/g/min}, n=25)$. Furthermore, we failed to improve survival of *Hoxa2* mutants using naloxone administration at P0.5 in an attempt to reduce apneas, as previously shown in $Krox20^{-/-}$ and $Hoxa1^{-/-}$ mutants (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001). In both wild-type and heterozygous Hoxa2 mutant animals, naloxone treatment had no significant effects on the breathing pattern. In the homozygous Hoxa2 mutant mice (n=7), naloxone injection at P0.5 slightly increased respiratory frequency from 135 cycles/min to 177 cycles/min and eliminated apneas (Fig. 4). Despite these stimulating effects upon ventilation, however, none of the treated $Hoxa2^{-/-}$ mutants lived more than 18 hours. Altogether, these results demonstrate that apneas do not greatly influence the respiratory minute volume and are not responsible for lethality of the Hoxa2 mutation.



Figure 4. Naloxone treatment was effective upon ventilation in $Hoxa2^{2^{-1}}$ mice but did not increase survival.

+/-

-/-

0

+/+

A, plethysmographic recordings before (control) and after (NLX) naloxone treatment in wild-type (left) and $Hoxa2^{-1}$ (right) animals. No effect was observed in wild-type animals. Note the frequency increase and the reduction of apneas in $Hoxa2^{-1}$ animals. Calibration bars: abscissa: 1 s, ordinates: 10 µl. B, effects of the subcutanueous injection of naloxone (1 mg/kg) at P0.5, previously shown to increase respiratory frequency and survival of anti-apneic deficient mutants (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001), upon respiratory frequency in wild-type, $Hoxa2^{+1}$ and $Hoxa2^{-1}$ animals. White bars indicate values of control respiration of at P0.5, black bars indicate values of the same animals one hour after injection of naloxone (NLX).

The Hoxa2^{-/-} *mutation impaired the oro-buccal behavior*

Behavioral tests, in which we counted the number of jaw openings elicited by a oral stimulation have been useful to identify the $Krox20^{-/-}$ phenotype (Jacquin et al. 1996). A reduction by about 50% of the number of jaw openings in these mice indicated a alteration of the trigeminal pre-motor control, originating partly in r3. Using the same test, we found that that the number of jaw openings were decreased by 45% in $Hoxa2^{-/-}$ mutant mice, ranging from 13.6 at P0 to 16.6 at P0.5, significantly less than values of 24 at P0 and 32 at P0.75 measured in wild-type (see Table 1). The number of jaw opening increased from P0 to P0.75 in all animals, this increase being smaller (15%) in homozygous mutants than in heterozygous and wild-type animals (30%).

The small number of evoked jaw openings, coupled with the above described large values of the tidal volume allowed us to define the functional phenotype of $Hoxa2^{-}$ ^{-/-} mutant mice at P0, opposing them to their heterozygous and wild-type littermates with a high penetrance of 72% (in 16 out of the 22 homozygous mutants, see Fig. 5).

Anatomical defects are observed in pontine areas derived from r1-r2

In anatomical observations of $Hoxa2^{-/-}$ mutants, we found expansion of a r1derived structure, the locus coeruleus, which was unaffected in $Krox20^{-/-}$ and *kreisler* mutants (Jacquin et al., 1996; Chatonnet et al., 2002). The antero-posterior length of this nucleus was $617 \pm 23 \ \mu m$ (n = 7) in $Hoxa2^{-/-}$ but $455 \pm 18 \ \mu m$ (n = 8) in wild-type (see Table 1). In this respect, heterozygous mutants were similar to wild-type animals ($420 \pm$ $60 \ \mu m$, n = 2). The dorso-ventral height of locus coeruleus was increased from $625 \pm 60 \ \mu m$ in wild-type (n = 8) to $1017 \pm 73 \ \mu m$ in $Hoxa2^{-/-}$ mutants (n = 7). Extension of the locus coeruleus was associated with a reduced size of the reticular formation: the



Figure 5. Phenotypic traits of *Hoxa2^{-/-}* mutants at P0: impaired oro-buccal behavior and increased tidal volume.

Individual data relating tidal volume (V_T , in abscissa) and number of jaw openings (in ordinates) at P0. Each symbol corresponds to one animal. Black triangles are for $Hoxa2^{+/-}$ mutants, open circles represent $Hoxa2^{+/-}$ mutants and open squares correspond to wildtype animals. Note that $Hoxa2^{+/-}$ mutants can be separated from other genotypes at P0, due to their two-fold increased tidal volume and their reduced number of jaw openings. distance between the most ventral point of the locus coeruleus and the ventral surface of the brainstem was reduced in $Hoxa2^{-/-}$ mutants (606 ± 79 µm, n=6) compared to wild-type (1050 ± 24 µm, n=8), whereas the total dorso-ventral size of the brainstem from the ventral surface to the top of the locus coeruleus, was unchanged (wild-type: 1675 ± 73 µm, n=8; $Hoxa2^{-/-}$: 1613 ± 53, n=6).

Discussion

Comparing $Hoxa2^{-/-}$ to *kreisler* and $Krox20^{-/-}$ mutants revealed overlapping but distinct behavioral phenotypes, suggesting that different respiratory controls, affecting respectively the depth of inspiration and the rhythm frequency, develop from the r1r2 and r3r4 domains of the embryonic neural tube. Thus, in contrast to r3, re-specification in r1-r2 did not severely perturb the respiratory rhythm but impaired the inspiratory flow which was larger than normal during the first hours of neonatal life in $Hoxa2^{-/-}$ mice. Finally, consistent with Krox20 being a positive regulator of Hoxa2 expression in r3, inactivation of either of these two genes similarly impaired the rhythmic control of the jaw by r2-r3-derived trigeminal motor neurons.

The Hoxa2 mutation affects a pontine control of the inspiratory flow at birth

The two major defects are characteristics of the $Hoxa2^{-/-}$ mutation. One affects the 2nd branchial arch, and the other brain territories derived from r1 and r2. The former does not seem to greatly affect breathing at P0.5, because respiratory frequency and depth of breaths were normal at this stage. Therefore, although branchial anomalies change the skeletal components of the inner ear and jaw (Rijli et al. 1993), it does not seem that the upper airway patency is dramatically affected and cause obstructive apneic disorders decreasing the respiratory flow.

Neural crests contribute to many neurectodermal derivatives, such as sensory ganglia, Schwann cells of sensory nerves and their patterning influences the innervation of branchial arches by specific motor and sensory axons. Specific sensory afferents exert major control on the breathing behavior. For example, pulmonary stretch receptors (PSR) exert a major inhibitory control on the inspiratory activity and tidal volume (the Breuer-Hering reflex). Neuronal activities generated by PSR are transmitted by vagal sensory neurons. Sensory axons terminate in the nucleus tractus solitarius, an r6r7derived structure sending a strong projection to the Pontine Respiratory Group (PRG, Foutz et al., 1988; Pierrefiche et al., 1994), a part of the respiratory controller that is potentially included in rostral pontine structures modified by the Hoxa2^{-/-} mutation. We consider unlikely that the altered fate of neural crest-derived elements in Hoxa2^{-/-} mutants greatly influences development of sensory afferent neurons responsible for reflex respiratory regulations. *Hoxa2^{-/-}* mutant mice had no clear respiratory abnormality at P0.5 while slow and irregular breathing associated with a decreased tidal volume could be expected from an abnormal development of sensory afferents (Erickson et al., 1996). In fact, because defective $Hoxa2^{-/-}$ neural crest cells derive from r4, the mutation is unlikely to affect vagal and glossopharyngeal sensory afferents from major respiratory sensory organs, including PSR.

The biological significance of first hours regulation of inspiratory flow has been related in humans with the transition from liquid to air breathing and expansion of the lung (see Mortola, 2001). PSR are activated by transpulmonary pressure which is much greater postnatally than it is pre-natally. Therefore, it has been hypothesized (Mortola,

2001) that at birth, the respiratory controller does not yet fully recognize the inspiratoryinhibitory inputs from PSR since it had never previously been exposed to such a stimulus. Along this line, increase of tidal volume probably reflects the progressive establishment of the PSR control on breathing. Present results further indicate that the PRG is involved together with PSR in these first hours regulation of breathing. Phenotypic traits of the *Hoxa2^{-/-}* mice that are not shared by *Krox20* or *kreisler* mutants, are likely related to the reorganization of central neural structures deriving from the r1r2 level of the neural tube, particularly in the alar plate (Gavalas et al., 1997). Interestingly, the PRG is located dorsally in the vicinity of the brachium conjunctivum and it is involved together with the PSR in the regulation of the adult mammalian inspiration through glutamatergic synapses (Foutz et al., 1988). Ablation of the PRG or blockade of NMDA receptors in adults cause appreusic breathing, a dramatic increase of the inspiratory duration, that is at least partly compensated by the activity of PSR afferents acting through glutamatergic AMPA receptors (Pierrefiche et al., 1994). Apneusis cannot be induced in newborns mice, indicating immaturity of the PRG at birth (Borday et al., 1997). Nevertheless, present results suggest that a rostral pontine structure deriving from the alar plate of the neuroepithelium, most probably the PRG, exerts an inspiratory-inhibitory role at birth. Impairment of this structure in the $Hoxa2^{-/-}$ mice would eliminate inspiratory flow regulation until PSR are fully effective to compensate this defect. Anatomical observations confirm that anomalies takes place in the rostral Pons. The extension of the r1-derived locus cœruleus, located medial to the PRG, is consistent with the caudal extension of the catecholaminergic markers *Phox2b* and DBH in r2 indicating a reorganization of the rostral Pons (Davenne et al., 1999).

Hoxa2 is not a target of Krox20 during formation of the para-facial respiratory group Several defects observed in *Krox20^{-/-}* mice were not found in *Hoxa2^{-/-}* animals. Elimination of the *Krox20* expression in r3 reduces quiet breathing frequency by 50%, multiply by 10 the time spent in apnea eventually leading to an opioid-sensible lethality. In *Hoxa2^{-/-}* animals respiratory frequency was normal and apneas were not lifethreatening. Treatment of *Hoxa2^{-/-}* animals with naloxone had no effects upon survival of *Hoxa2^{-/-}* mutants, whereas it effectively reduced apneas and increased frequency. It seems therefore that development of the vital control of respiratory frequency requires *Krox20* expression in r3, but not (i) the integrity of r2, (ii) *Hoxa2* expression in more posterior segments and (iii) upregulation of *Hoxa2* expression by *Krox20*. It remains possible that *Hoxb2* which is expressed in r3, could assume some *Hoxa2* functions, as it is the case with the paralogs of group 3 when one of them is invalidated (Greer et al., 2000).

Observations in *Hoxa1^{-/-}* mutants demonstrate that integrity of the para-facial level of the reticular formation originating from r4 is required for a proper control of breathing frequency and that re-organization of neuronal circuits at this level leads to lethal deficits related to the unbalanced activity of opioid systems (Domínguez del Toro et al., 2001; Chatonnet et al., 2003). Existence of a para-facial respiratory oscillator has been recently confirmed in neonatal mice (Onimaru and Homma, 2003) as well as the deleterious influence of opioids on the control of respiratory frequency by para-facial / bulbar interactions (Mellen et al., 2003). Observations on *kreisler* mutants exclude a significant role of r5-derived structure in early-postnatal control of the respiratory rhythm (Chatonnet et al., 2002). The r3-derived reticular formation, rostral to the exit point of the facial motor root appears to be devoid of rhythmogenic respiratory neurons,

at least in neonatal hindbrain preparations isolated *in vitro* (Onimaru and Homma, 2003). Thus, in keeping with rhythm-generating properties observed in the chick embryonic segment derived from r3-r4, but not from the isolated r4 (Fortin et al., 1999), a signaling pathway initiated in r3 seems to be required for the development of parafacial r4 neuronal system. Present results in mice, together with the fact that r2-r3 chick rhombomeric doublets are unable to maturate a normal rhythm (Fortin et al., 1999), identify the rhombomeric boundary between r2 and r3 as the anterior limit of neural tube territory from which the para-facial system develops and support *Krox20*, but not *Hoxa2*, as a major inducer in this process.

Acknowledgements

This work was funded by the E.U. contract "Brainstem Genetics" QLG2-CT-2002-01467. Work in JC's laboratory was funded by C.N.R.S., Ministère de la Recherche et de la Technologie.

References

Abadie, V., Champagnat, J., and Fortin, G. (2000). Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport* **11** [1], 141-145.

Borday, V., Kato, F., and Champagnat, J. (1997). A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. *Neuroreport* **8** [17], 3679-3683.

Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Chisaka, O., Manley, N. R., and Capecchi, M. R. (1993). Loss of *Hox-A1* (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* **118** [4], 1063-1075.

Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Thoby-Brisson, M., Champagnat, J., Fortin, G., Rijli, F., and Thaeron-Antono, C. (2003). From hindbrain segmentation to breathing after birth: developmental patterning in rhombomeres 3 and 4. *Mol.Neurobiol.* **In press**.

Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Voiculescu, O., Charnay, P., and Champagnat, J. (2002). Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutants. *Eur.J.Neurosci.* **15**, 684-692.

Clarke, J. D. and Lumsden, A. (1993). Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development* **118** [1], 151-162.

Davenne, M., Maconochie, M. K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F. (1999). *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* **22**, 677-691.

Domínguez del Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F., and Champagnat, J. (2001). Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J.Neurosci.* **21** [15], 5637-5642.

Erickson, J. T., Conover, J. C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G., and Katz, D. M. (1996). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J.Neurosci.* **16** [17], 5361-5371.

Fisher, J. T., Mortola, J. P., Smith, J. B., Fox, G. S., and Weeks, S. (1982). Respiration in newborns: development of the control of breathing. *Am.Rev.Respir.Dis.* **125** [6], 650-657.

Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A., and Champagnat, J. (1999). Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat.Neurosci.* **2** [10], 873-877.

Fortin, G., Kato, F., Lumsden, A., and Champagnat, J. (1995). Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J.Physiol.(Lond.)* **486** [Pt 3], 735-744.

Foutz, A. S., Champagnat, J., and Denavit-Saubie, M. (1988). N-methyl-Daspartate (NMDA) receptors control respiratory off-switch in cat. *Neurosci.Lett.* **87** [3], 221-226.

Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* **344** [6265], 431-435.

Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124** [19], 3693-3702.

Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M., and Gridley, T. (1993). Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* **75** [7], 1317-1331.

Grammatopoulos, G. A., Bell, E., Toole, L., Lumsden, A., and Tucker, A. S. (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* **127** [24], 5355-5365.

Greer, J. M., Puetz, J., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* **403** [6770], 661-665.

Jacquin, T. D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P., and Champagnat, J. (1996). Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox20* knockout mice. *Neuron* **17** [4], 747-758.

Karlberg, P. and Koch, G. (1962). Respiratory studies in newborn infants. III. Development of mechanics of breathing during the first week of life. A longitudinal study. *Acta Paediatr.* **135**, 121-129.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. Cell 78 [2], 191-201.

Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274** [5290], 1109-1115.

Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M. H., Muchamore, I., Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* **360** [6406], 737-741.

Mellen, N. M., Janczewski, W. A., Bocchiaro, C. M., and Feldman, J. L. (2003). Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* **37** [5], 821-826.

Mortola, J. P. (2001). Respiratory physiology of newborn mammals. John Hopkins University Press. Baltimore, MD.

Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M. H., Krumlauf, R., and Charnay, P. (1996). Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox20. *Development* **122** [2], 543-554.

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

Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., and Rijli, F. M. (2000). Ectopic *Hoxa2* induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in Xenopus. *Development* **127** [24], 5367-5378.

Pierrefiche, O., Foutz, A. S., Champagnat, J., and Denavit-Saubie, M. (1994). NMDA and non-NMDA receptors may play distinct roles in timing mechanisms and transmission in the feline respiratory network. *J.Physiol.* **474** [3], 509-523.

Prince, V. and Lumsden, A. (1994). Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* **120** [4], 911-923.

Rijli, F., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P., and Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa2*, which act as a selector gene. *Cell* **75**, 1333-1349.

Saunders, R. A. and Milner, A. D. (1978). Pulmonary pressure/volume relationships during the last phase of delivery and the first postnatal breaths in human subjects. *J.Pediatr.* **93** [4], 667-673.

Sham, M. H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R. D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P., and Krumlauf, R. (1993). The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* **72** [2], 183-196.

Simon, H. and Lumsden, A. (1993). Rhombomere-specific origin of the contralateral vestibulo-acoustic efferent neurons and their migration across the embryonic midline. *Neuron* **11** [2], 209-220.

Taneja, R., Thisse, B., Rijli, F. M., Thisse, C., Bouillet, P., Dolle, P., and Chambon, P. (1996). The expression pattern of the mouse receptor tyrosine kinase gene MDK1 is conserved through evolution and requires Hoxa-2 for rhombomere-specific expression in mouse embryos. *Dev.Biol.* **177** [2], 397-412.

3. Les souris mutantes naturelles kreisler homozygotes.

Collaboration : O. Voiculescu, P. Charnay, INSERM U368 – Biologie Moléculaire du Développement, ENS Paris.

Le gène *MafB/kreisler* est co-exprimé avec *Krox20* au sein du rhombomère 5. Afin de déterminer précisément la participation de la signalisation en r5 dans l'établissement du réseau neuronal respiratoire et dans la mortalité postnatale, nous avons choisi d'analyser le comportement respiratoire *in vivo* et *in vitro* de souris mutantes homozygotes *kreisler* (*kr/kr*). Chez ces animaux, il a en effet été mis en évidence que le rhombomère 5 n'était jamais présent au cours de la vie embryonnaire (Manzanares et al., 1999b).

L'analyse anatomique des mutants *kr/kr* indique que les populations neuronales situées dans le pont caudal entre les branches ascendante et descendante du nerf facial, sont éliminées par cette mutation. Ces animaux présentent de plus des atteintes dans des comportements contrôlés par le niveau vestibulo-facial du tronc cérébral. En particulier, ces animaux sont incapables d'effectuer le test de retournement ou l'effectuent avec de nombreux essais et en un temps beaucoup plus long que leurs frères et sœurs sauvages. Ce résultat est du à l'absence chez ces animaux d'oreille interne (Deol, 1964; Frohman et al., 1993). Les données anatomiques et comportementales sont donc compatibles avec une atteinte des structures neuronales issues de r5 (cf. publication 2).

Notre étude montre que ces animaux ne présentent pas de phénotype respiratoire particulier à la naissance *in vivo* et qu'ils survivent sans problème jusqu'à l'âge adulte, étant même capables de se reproduire. En particulier, ces animaux ne passent pas plus de temps en apnée que leurs congénères sauvages ou hétérozygotes. L'élimination des populations dérivées de r5 ne semble donc pas perturber la génération et les contrôles du rythme respiratoire, le centre anti-apnéique n'est donc pas *a priori* dérivé du rhombomère 5, mais uniquement des rhombomères 3 et 4 (cf. publication 2).

Cependant, la fréquence respiratoire du bulbe isolé *in vitro* est légèrement plus faible chez ces animaux, pour lesquels nous avons aussi mis en évidence des modifications des réponses aux stimuli hypoxique et hyperoxique (cf. publication 2). Ces deux derniers résultats, concernant la génération du rythme et les contrôles respiratoires par les afférences sensorielles peuvent être liés à l'existence de perturbations de l'expression de certains marqueurs génétiques dans le rhombomère 6 chez l'embryon kr/kr (Manzanares et al., 1999b), comme par exemple le gène *phox2b*.

Ces résultats concernant les mutants homozygotes kreisler permettent d'établir la limite postérieure du système anti-apnéique au niveau de la frontière entre r4 et r5. En effet, l'élimination de r5 n'entraîne aucun effet typique de défauts du centre anti-apnéique et n'est pas associée à des altérations du niveau trigéminal mais plutôt à des anomalies du niveau vestibulo-facial, plus postérieur. Ainsi l'ensemble des résultats concernant les mutations ou inactivations de Hoxa1, Hoxa2, Krox20 et MafB/kreisler démontrent l'importance d'une région limitée à r3/r4, au sein de laquelle se différencie chez la souris un système antiapnéique vital à la naissance.

Ces études montrent que les mutations homozygotes sont souvent soit létales, soit à l'origine de la disparition de grands territoires au sein du cerveau postérieur embryonnaire. Afin de pouvoir étudier des modifications du développement compatibles avec la physiologie respiratoire, nous avons développé d'autres stratégies expérimentales.

Publication 2

Chatonnet F., Domínguez del Toro E., Voiculescu O., Charnay P. and Champagnat J. (2002). Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **15**(4), 684-692.

Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous kreisler mutant mice

Fabrice Chatonnet,^{1,*} Eduardo Domínguez del Toro,^{1,†,*} Octavian Voiculescu,² Patrick Charnay² and Jean Champagnat¹

¹Neurobiologie Génétique et Intégrative, UPR2216, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard UFR 2218, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

²Biologie Moléculaire du Développement, Unité 368 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Ecole Normale Supérieure, 75230 Paris Cedex 05, France

Keywords: apneic breathing, kreisler, Krox20, neonate mice, rhombomeres

Abstract

During embryonic development, restricted expression of the regulatory genes *Krox20* and *kreisler* are involved in segmentation and antero-posterior patterning of the hindbrain neural tube. The analysis of transgenic mice in which specific rhombomeres (r) are eliminated points to an important role of segmentation in the generation of neuronal networks controlling vital rhythmic behaviours such as respiration. Thus, elimination of r3 and r5 in *Krox20^{-/-}* mice suppresses a pontine antiapneic system (Jacquin *et al.*, 1996). We now compare *Krox20^{-/-}* to *kreisler* heterozygous (+/kr) and homozygous (kr/kr) mutant neonates. In +/kr mutant mice, we describe hyperactivity of the antiapneic system: analysis of rhythm generation *in vitro* revealed a pontine modification in keeping with abnormal cell specifications previously reported in r3 (Manzanares *et al.*, 1999b). In *kr/kr* mice, elimination of r5 abolished all +/kr respiratory traits, suggesting that +/kr hyperactivity of the antiapneic system is mediated through r5-derived territories. Furthermore, collateral chemosensory pathways that normally mediate delayed responses to hypoxia and hyperoxia were not functional in *kr/kr* mice. We conclude that the pontine antiapneic system originates from r3r4, but not r5. A different rhythm-promoting system originates in r5 and *kreisler* controls the development of antiapneic and chemosensory signal transmission at this level.

Introduction

Hindbrain segmentation into rhombomeres (r) is a transient feature of early development (Lumsden & Keynes, 1989; reviewed by Lumsden & Krumlauf, 1996) followed by a dramatic reconfiguration of neuronal networks during foetal and neonatal brainstem maturation. Primordial rhythmic activities start in the hindbrain near the end of the segmentation process in chick (Fortin *et al.*, 1994a, 1995; Champagnat & Fortin, 1997) and mouse (Abadie *et al.*, 2000), and the activity of specific rhythm-promoting connections has been found recently to require a two-segment repeated rhombomeric code (Fortin *et al.*, 1999). Whether and how segmentation influences neuronal network properties remains an open issue. Our physiological approach to this problem is the analysis of the respiratory rhythmic neuronal network located in the pons and the medulla (reviewed by Bianchi *et al.*, 1995).

Among the genes expressed in rhombomere-restricted patterns (reviewed by Schneider-Maunoury *et al.*, 1998), *Krox20*, *Hoxa1* and *kreisler* are implicated in the control of segmentation at distinct antero-posterior levels, because their inactivation leads to the elimination of rhombomeres r3 and r5, r4 and r5, and r5, respectively

[†]*Present address*: Division de Neurociencias, Laboratorio Andaluz de Biologia, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla 41013, Spain

*These authors contributed equally to this work.

Received 29 June 2001, revised 21 December 2001, accepted 3 January 2002

(Mark *et al.*, 1993; Schneider-Maunoury *et al.*, 1993, 1997; Cordes & Barsh, 1994; Manzanares *et al.*, 1999b). Previous studies in $Krox20^{-/-}$ (Jacquin *et al.*, 1996) and $Hoxa1^{-/-}$ (Domínguez del Toro *et al.*, 2001) mice demonstrated that a normal embryonic expression of these genes in r3 and r5 or r4 and r5, respectively, is necessary for normal postnatal neuronal network function. $Krox20^{-/-}$ mutants exhibit a respiratory phenotype including low frequency and increased time spent in apnoeas, correlated with the absence of antiapneic structures normally originating from r3 or r5. The present study seeks for a similar role for *kreisler*, in an attempt to elucidate the respective implication of r3 and r5 in respiratory controls.

The kreisler gene encodes a mafB-related transcription factor. It is expressed in r5, in r6 and in the roof plate along the hindbrain. It upregulates the expression of Hoxa3 in both r5 and r6, and of Hoxb3 in r5 (Manzanares et al., 1997, 1999a). The kreisler mutants were generated by X-ray mutagenesis, the homozygous mutant animals (kr/kr) being hyperactive, a behavioural pattern characterized by head tossing, running in circles and deafness due to absence of a functional inner ear (Hertwig, 1942, 1944; Deol, 1964). These defects result from the early role of kreisler in r5 formation, as r5 is the only rhombomere that fails to form in kr/kr embryos. Later patterning in r6, including the caudal expression of *Phox2b* in a lateral cell column, is altered in kr/kr mice, even though the formation of r6 is not affected. Moreover, in both heterozygous (+/kr) and homozygous kreisler mutant embryos, patterning defects have also been observed in r3. Hoxa3, normally expressed posterior to r4, is upregulated and ephrinB2 downregulated in r3 (Manzanares et al., 1999b). We now

Correspondence: Dr Fabrice Chatonnet, as above. E-mail: Fabrice.Chatonnet@iaf.cnrs-gif.fr

show that this abnormal specification in r3 correlates at birth with alterations in the antiapneic system and we identify specific defects resulting from the elimination of r5.

Materials and methods

Genotype analysis

The *kreisler* mutation was maintained in a 129 background in association with the *agouti* mutation. DNA was extracted from the tail of the mouse as described previously (Lufkin *et al.*, 1991). The genotype at the *kreisler* locus was subsequently determined by a polymerase chain reaction (PCR) assay using a set of oligonucleotide primers allowing amplification of the restriction site polymorphism associated with the *kreisler* mutation (Cordes & Barsh, 1994).

Plethysmograph recordings

Respiratory activity was measured using a modified barometric method previously employed in neonates (Fortin *et al.*, 1994b). The plethysmograph chamber (20 mL) equipped with a temperature sensor (LN 35 Z) was connected to a reference chamber of the same volume. The pressure difference between the two chambers was measured with a differential pressure transducer (Validyne DP 103–14) connected to a sine wave carrier demodulator (Validyne, CD15). The spirogram was stored on a computer using a Labmaster interface at a sampling frequency of 1 kHz. Calibrations were recorded at the end of each recording session by injecting 2.5–5 μ L of air in the chamber with a Hamilton syringe.

Neonates were removed individually from the litter and placed in the plethysmograph chamber kept hermetically closed and maintained at 31 °C during the recording session (165 s). In each sample, we identified the periods of quiet breathing recorded in the absence of limb or body movements. Duration of these limb, body and head movements was used to determine activity of the neonate mouse during recording. During quiet breathing, a computer-assisted method was used to measure the duration of inspiration and expiration from which respiratory frequency (f, breaths/min) is derived, and the tidal volume (V_T , $\mu L/g$) from which minute volume ($Vm = f^*V_T/1000$, ml/ g per min) is derived. Periods of apneic breathing are not included in frequency calculation. Comparisons between two sets of data were performed by paired Student's t-tests. Naloxone (NLX; 3.33 mg/kg in 50 µL saline) was administered subcutaneously using a Hamilton syringe). During hyperoxic exposure (40 s) the chamber was flushed with a humidified 100% O2 gas during recording, during hypoxic exposure (40 s) the chamber was flushed with a humidified gas mixture of 12% O₂ in N₂.

Anatomical observation and immunochemistry

Thirty-day-old mice (six homozygous mutants, six heterozygous mutants and four wild-type animals) were anaesthetized with pentobarbital (i.p.) and intracardially perfused for 15 min with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by a mixture of 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4). The brain was removed and placed overnight in the same fixative. The brains were then rinsed in phosphate buffer containing 20% sucrose and stored at 4 °C until used. Serial parasagittal sections (40 μ m) were cut on a freezing microtome. Sets of four adjacent sections were processed using cresyl violet and polyclonal antibodies to tyrosine hydroxylase and choline acetyltransferase (ChAT). Sections processed for tyrosine hydroxylase immunochemistry were incubated in the presence of Triton X-100 overnight at room temperature with the antibody (Boeringer, 1 : 1000 in PBS, pH 7.4) and for 2 h with

biotinylated anti-mouse serum (Amersham, 1 : 200, pH 7.4). Peroxidase was subsequently revealed in a staining mixture containing 0.05% 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma) and 0.03% H₂O₂ (1 h at room temperature). Sections processed for ChAT immunochemistry were incubated overnight at room temperature with the antibody (Chemicon International Incorporated; 1 : 2000 in PBS), which was subsequently revealed using the Vectastain ABC kit (Vector).

In vitro perfused brainstem

The brainstem-spinal cord preparations were isolated from etheranaesthetized 1-3 days old mice, as described previously (Suzue, 1984; Reckling et al., 1996). To isolate the hindbrain-spinal cord without the cerebellum, the more rostral section was taken at the rostral part of the pons (ponto-mesencephalic preparation, PM). The caudal section was taken between the cervical and thoracic rootlets to preserve the integrity of the C6 (phrenic) level of the spinal cord. The preparations were pinned down for electrophysiological recordings and transections with the ventral surface upwards in a 2 mL chamber and bathed in a ringer containing (in mM): KCl, 5.4; NaCl, 130; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 26; D-glucose, 30; CaCl₂, 0.8 equilibrated with a 10% CO₂ in O₂ gas mixture at 26 °C, pH 7.0 and perfused at a rate of 1 mL/min. Transections of the ventral (Borday et al., 1997) pontobulbar (PB) respiratory controls were performed using a razor blade driven in the recording chamber. A PB section was performed at the level of the inferior cerebellar arteries to isolate the medullar generator form its pontine afferences. After PB sectioning, rostral and caudal parts of the brainstem were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. Coronal sections stained with cresyl violet and analysed under the light microscope indicated the same level of PB sections, at the caudal end of the facial motor nucleus, in +/kr (n = 5) and kr/kr (n = 4) animals, as in control animals. In +/kr (n = 2) and +/+ (n = 2) animals, a trigemino-facial (TF) section was performed immediately rostral to the exit point of the facial nerve to eliminate rostral pons deriving from r3 and r4.

Various dissected cranial nerves, such as the V, VII, XII and C1 to C6 were used for recordings. In kr/kr animals, the VI rootlet is missing, and ventral hypoplasia can be appreciated. Simultaneous recordings by pairs of any of those rootlets ipsilaterally or bilaterally were performed before and after PB sections. Rootlets were recorded using suction electrodes connected to Grass amplifiers. Data were stored on a PC computer using a Labmaster interface at a sampling frequency of 1 kHz. Smooth integration was performed from a full wave rectified signal with a 40 ms time constant.

Results

A total of 72 animals resulting from intercrosses between *kreisler* mutants were analysed. 24 of these animals were *kreisler* homozygous mutants, 32 were heterozygous and 16 were wild-types, as determined by PCR genotyping. Analysis of the phenotype and genotype was performed independently in blind experiments and compared afterwards. Anatomical studies were performed on animals allowed to survive 30 days, whereas behaviour was analysed during the first week after birth. We have studied the link between the *kreisler* mutation and respiratory and motor deficits by measuring the respiratory frequency, $V_{\rm T}$ (Table 1) and motor responses including activity, reactions to stress and the righting reflex (a normal reflex reaction of neonate mice, which return to the prone position when placed in the supine position).

TABLE 1.	Comparison	of kreisler	homozygous	and heterozygou	s mutant and v	vild-type (+	(+) animal	s during th	he first d	av (P0	ກ
				inter the set of the s			. ,) (

	Data obtained during the first day, P0						
Measure	+/+	+/+ vs. +/ <i>kr</i>	+/kr	+/kr vs. kr/kr	kr/kr		
f (breaths/min)	118 ± 17	***	163 ± 4.5	***	102 ± 5.9		
$V_{\rm T}$ (µL/g)	13.9 ± 2.3	***	9.7 ± 0.5	***	7.1 ± 0.5		
Vm (ml/g/min)	1.77 ± 0.47	NS	1.61 ± 0.09	***	0.75 ± 0.07		
Apnoeas (time, %)	5.2 ± 2.0	*	0.6 ± 0.31	***	9 ± 2.1		
Buccal temperature (°C)	31.4 ± 0.5	NS	32.9 ± 0.3	NS	32.1 ± 0.2		
Righting reflex (s)	17.4 ± 5.2	NS	12.5 ± 1.6	***	26.9 ± 7.3		
Body mass (g)	1.44 ± 0.07	NS	1.50 ± 0.02	***	1.31 ± 0.03		
Movement (time, %)	4.87 ± 2.72	NS	5.41 ± 1.10	NS	5.23 ± 1.97		
n	16 (125†)	-	32	-	24		

Data are expressed as means \pm SEM. Respiration (*f*, frequency; *V*_T, tidal volume; Vm, minute volume; apneas) was measured during quiet breathing. Durations of apnoeas and movements during plethysmographic recordings are expressed as a percentage of the total time of recording (165 s). Righting reflex measures time spent by the mouse for moving from supine to prone position. Data at P0 include 24 (*kr/kr*) and 32 (+/*kr*) and 16 (+/+) animals from *kreisler* litters, $\dagger 109$ +/+ were added for the four respiratory parameters. ****P* < 0.001; ***P* < 0.01; **P* < 0.05; NS, not significant.

Inactivation of a single kreisler allele affects respiratory pattern at birth whereas the homozygous mutation eliminates respiratory traits of +/kr phenotype

The +/kr mice showed a modified pattern of quiet breathing (Fig. 1) with a higher than normal respiratory frequency (polypnea) resulting from shorter expirations and a lower tidal volume. This respiratory phenotype was highly penetrant in the mutant mice population when compared to wild-type animals (Fig. 1C) and particularly significant during the first 3 days after birth (Fig. 1B). During the first days after birth, wild-type mice exhibited irregular breathing including a significant number of apnoeas (i.e. expirations lasting more than 2 s). The total time spent in apnoeas was almost one order of magnitude less in +/kr mutants than in wild-type littermates (Table 1). Comparison of kr/kr and +/kr demonstrates a significant reversion of the +/kr phenotype by the homozygous mutation (Table 1). In kr/kr mice, the *in vivo* respiratory frequency was slightly less than normal (Fig. 1B) and the duration of apnoeas was normal (Table 1).

Increased respiratory frequency can be related to stress, hyperthermia, hyperactivity or exaggerated chemosensitive responses. However, in the +/kr mice, no stress reactions or hyperactivity were visible when observing the patterns of limb, neck or body movements in the plethysmographic chamber (Table 1). The buccal temperature (Table 1) and responses to hypoxic or hyperoxic stimuli (data not shown) were not significantly different from those of +/+animals.

Therefore, inactivation of one of the two *kreisler* alleles resulted in rather selective modifications of the quiet and apneic breathing patterns, without interfering with survival. The homozygous mutation suppressed this phenotype.

Pontine origin of the respiratory phenotype in heterozygous +/kr mutants

As previously carried out in $Krox20^{-/-}$ mice, central respiratory deficits were investigated using neonatal [postnatal days 1 and 2, (P1 and P2)] hindbrain preparations, isolated and superfused *in vitro*, and from which a spontaneous, synchronized respiratory-like activity is recorded from the hypoglossal (12n, Fig. 2A) or cervical spinal nerve roots. A ponto-mesencephalic section (PM, Fig. 2A) delimited preparations including the pons and the medulla (PM frequency in Fig. 2C). A section at the PB junction (PB, Fig. 2A and B), caudal to the facial motor nucleus (see Methods) isolated the medulla, which

retains the rhythmic respiratory-like activity originating in the ventral bulbar respiratory group (PB activity in Fig. 2C). To quantify the effect of the pons in +/kr and wild-type animals, we measured the changes in respiratory frequency before and after the PB transection for each type of animal ($\Delta f = f(PB) - f(PM)$), inset in Fig. 2C). We found a pontine inhibition that was significantly less in +/kr mutants as compared to wild-type animals ($\Delta f = 0.0788 \pm 0.0089$ Hz in +/+, n = 4; 0.0429 \pm 0.0089 Hz in +/kr, n = 7, P < 0.05), in contrast to $Krox20^{-/-}$ mice, in which pontine inhibition was greater than normal (Jacquin *et al.*, 1996). In +/kr mice, the PB frequency was normal (0.168 \pm 0.014 Hz, n = 4) and the PM frequency was higher (0.133 \pm 0.018 Hz, n = 7, P < 0.01) than in wild-type littermates (0.090 \pm 0.009 Hz, n = 4).

In *kr/kr* mice, the pontine control ($\Delta f = f(PB) - f(PM)$, inset in Fig. 2C) was normal, in keeping with the behavioural and *in vivo* analysis, suggesting a reversal, rather than an exaggeration, of respiratory phenotypic traits observed in +/*kr* mice *in vitro*. Caudal to PB sections, the rhythmogenic function of the ventral respiratory group was preserved (Fig. 2C), although the burst frequency was lower (0.106 ± 0.018 Hz, *n* = 4) than in wild-type or heterozygous mice (0.155 ± 0.008 Hz, *n* = 11, *P* < 0.02).

To further locate pontine defects in +/kr mutants, we sectioned between the exit point of the trigeminal and facial nerves (TF section, Fig. 2A), thereby eliminating r3-derived and more rostral structures. A sequential PB section then eliminated r4- and r5-derived structures. In wild-type animals, the TF section was responsible for the increase in burst frequency (Fig. 2D). Neither of the two sections were very effective in +/kr mice. We thereby exclude that in these animals, the inhibitory effect of the rostral pons (r3-derived) was compensated by an excitatory effect of more caudal (r5-derived) structures.

Respiratory phenotype in +/kr mutants does not result from the elimination of catecholaminergic or enkephalinergic neurons

To demonstrate that the lack of pontine inhibition does not result from the elimination of certain neuronal populations, we have specifically investigated the two major systems that could possibly depress respiration at birth, the enkephalinergic system and the catecholaminergic A5 group. The group of noradrenergic neurons named A5, is a major pontine rhythm-depressant system active *in vitro* in newborn rodents (Errchidi *et al.*, 1991) and interacts with the enkephalinergic system (Romagnano *et al.*, 1991; Arvidsson *et al.*,



FIG. 1. Respiratory frequency is elevated in +/kr mutant mice during the first days after birth. (A) Representative samples of whole-body plethysmographic recording of +/+, +/kr and kr/kr littermates during the first postnatal week (P0-P6). Scale bars (abscissa), 2 s; (ordinate), 50 µL. Inspiration is upwards. (B) Evolution of the respiratory frequency in +/kr(open diamonds), kr/kr (open triangles) and wild-type (closed circles) littermates during the first postnatal week. The most significant differences between +/+ and +/kr are found at P0/P1 (+/+, n = 16 from P0 to P4 and 7 at P5 and P6; +/kr, n = 32 from P0 to P2 and 26 from P3 to P6; kr/kr, n = 24 from P0 to P2 and 18 from P3 to P6). ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05. (C) Individual values of tidal volume (ordinate) and respiratory frequency (abscissa) in +/kr (open diamonds, n = 32), $Krox20^{-/2}$ (open circles, n = 12, data from Jacquin *et al.*, 1996) and wild-type mice (crosses +/kr and kr/kr littermates, n = 16; closed circles, animals added to provide an estimate of population variability, n = 109) during the first postnatal day. The tidal volume is smaller in +/kr mutants and their respiratory frequency is abnormally high.

1995). Enkephalinergic neuron function was investigated pharmacologically *in vivo* by subcutaneous administration of the selective antagonist NLX during quiet breathing. As noted previously (Jacquin *et al.*, 1996), NLX has little effect in wild-type animals. In contrast, NLX significantly stimulated respiratory frequency in +/kr mice, indicating that enkephalinergic inhibition might be hyperactive in these animals (Fig. 3). This hypersensitivity to subcutaneous NLX administration was reversed by the homozygous mutation (Fig. 3B).

Immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase, an enzyme of the catecholamine synthesizing pathway, was performed in six heterozygous mutants and three wild-type animals at P30 and showed that the neurons of the A5 group appeared normal (not shown). These observations demonstrate that major populations of respiratorydepressant pontine neurons are not eliminated in +/kr mutants.

Pontine neuronal populations generated in $Hoxa1^{-/-}$ mice are not seen in +/kr mutants

As in Hoxal^{-/-} mutants (Domínguez del Toro et al., 2001), an exaggerated pontine excitation might result from the formation of a novel population of r3-derived, Krox20-dependent, rhythm-promoting neurons. We have therefore investigated the anatomical correlates of this phenomenon previously identified in Hoxal^{-/-} mutants, namely: (i) a characteristic morphological abnormality of the anterior fourth ventricle; (ii) an increase in the antero-posterior length of the dorsal Pons; and (iii), a compound reticular and motor supernumerary structure comprising radial stripes of reticular formation and ectopic trigeminal motoneurons, formed at the level of the wild-type parvocellular reticular nucleus, a dorsal pontine structure originating in r3. None of these phenotypic traits were observed in +/kr and kr/kr mutants. The parvocellular reticular nucleus, extending between the trigeminal motor nucleus and the facial nerve (length 438 \pm 58.8 μm in +/+, n = 4; 474 ± 68.2 µm in kr/kr, n = 4; 466 ± 59 µm in +/kr n = 4) and the morphology of the fourth ventricle were normal in kreisler mutants (Fig. 4A and B).

Delayed responses to hypoxia and hyperoxia are eliminated in kr/kr mice

Lethal deficits previously described in $Krox20^{-/-}$ mice were not seen in kr/kr mutants, indicating normal function of the antiapneic system. The kr/kr mice were characterized by a lack of righting reflex and a respiratory depression resulting from a small $V_{\rm T}$ (Table 1). Respiratory depression was not life threatening because the mutation was lethal for only three kr/kr (out of 24); no wild-type or heterozygous animals died. The small $V_{\rm T}$ might be indicative of chemosensory abnormalities as suggested by previous observations on BDNF^{-/-} mice lacking subpopulations of sensory neurons (Erickson et al., 1996). Chemosensory signals controlling respiration are conveyed by glossopharyngeal sensory neurons (Neubauer et al., 1990) that might be affected by the kr/kr mutation (McKay et al., 1994). We have used hypoxic and hyperoxic tests at the age of P10 to investigate possible defects of the respiratory responses in kr/kr (Fig. 5A) or +/kr mice (data not shown). The responses were normal in +/kr animals. Significant changes in respiratory minute volume were induced in all animals 30 s after the onset of these stimuli (Fig. 5B). Hyperoxia which eliminates ongoing chemosensory control, led to reduction of Vm, whereas hypoxia increased Vm as a short-term effect. Thus, chemoreceptors that normally detect the oxygen level and transmit this information to central structures (Gonzalez et al., 1994; Vizek & Bonora, 1998) were operational. However, processing of this information within the central nervous system (90 s after the onset of stimuli, Fig. 5B) was modified in kr/kr. Hyperoxia-induced reduction of Vm was sustained in +/+ mice,



FIG. 2. Pontine respiratory depression *in vitro* is weaker than normal in +/kr mice. (A) Schematic drawing showing the levels at which transverse sections of the brainstem were performed (PM, ponto-mesencephalic; TF, trigemino-facial; PB, ponto-bulbar). The most caudal segment (PB) contains the rhythm generator and spontaneous rhythmic neural activity is recorded from the hypoglossal (12n) nerve root (arrow). TF and PB sections eliminates the rhythm-depressant effect of the caudal pontine reticular formation, rostral to the facial nerve (7n). Scale bar, 500 μ m. (B) Cresyl violet staining of a coronal section made immediately caudal to PB section in a +/kr mutant mouse. Facial motor nucleus (7Mo) and vestibular nuclei (Ve) are visible. Scale bar, 500 μ m. (C) Mean burst frequency before (PM) and after (PB) transection in wild-type (left, n = 4), +/kr (middle, n = 7) and kr/kr (right, n = 6) mice. Inset, mean effectiveness of pontine depression in +/+ (n = 4), +/kr (n = 7) and kr/kr (n = 6) mice. Inset, mean effectiveness of pontine depression in +/+ (n = 4), +/+ (n = 7) and kr/kr (n = 6) mice. Inset, mean subsequent transections at the TF and PB levels (arrowheads); the +/+ (top) and +/kr (bottom) preparations behave the same except in the control (PM) situation. Functional differences between the two genotypes are therefore located rostral to TF. Dashed lines indicate respiratory frequency recorded in PM preparation.



FIG. 3. Enkephalinergic control of respiration in +/kr and kr/kr mice *in vivo*. (A) Whole-body plethysmographic recordings and (B) mean respiratory frequency (cycles/min) before (control) and after (NLX) blockade of the depressant enkephalinergic control of respiration by subcutaneous administration of naloxone *in vivo* at P2. This treatment has no effect on respiratory frequency in wild-type animals (n = 20) or in kr/kr animals (n = 6) and further increases frequency in +/kr mice (n = 9, P < 0.001). ***P < 0.001; **P < 0.01. Scale bars (A abcissa), 2 s; (ordinate), 25 µL.

whereas it is no more effective after 90 s in kr/kr mutants. The secondary effect of hypoxia was a reduction of Vm, which was not observed in kr/kr mice, suggesting the elimination of a previously

described pontine control of hypoxic respiratory stimulation (Dillon *et al.*, 1991). These results provide further evidence that the kr/kr mutation affects neuronal populations mediating the control of respiratory parameters in response of both hypoxia and hyperoxia, leaving intact more direct chemosensory controls of the rhythm generator.

Anatomical defects of the kr/kr hindbrain, consistent with the elimination of r5, are not observed in +/kr animals

In *kr/kr* mice, anatomical defects were all located caudal to the r4derived descending facial nerve fasciculus (7n in Fig. 6). All structures located rostral to the 7n were normal, in particular r3derived structures affected by the *Krox20^{-/-}* mutation (Jacquin *et al.*, 1996). Caudal to the 7n, r5-derived structures (Marin & Puelles, 1995) were affected by both the *kr/kr* and *Krox20^{-/-}* mutations. In particular, the abducens motor nucleus (6 in Fig. 6) and the suprageniculate pontine nucleus (not shown) were eliminated, and the preganglionic facial nucleus (7pgg) and the superior olive (SO; largest diameter 1197.5 \pm 78.5 µm in +/+, *n* = 4; 537.5 \pm 114.4 µm in *kr/kr*, *n* = 4, *P* < 0.001) were reduced. In extreme cases, we observed a unilateral ventral hypoplasia at the level of the facial exit point.

More posterior defects, found in kr/kr but not in $Krox20^{-/-}$ mice, possibly involve r6-derived structures. These defects are located


FIG. 4. None of the $Hoxa1^{-/-}$ anatomical defects are found in +/kr mutant mice. (A) Sagittal section of brainstem at trigeminal level stained by ChAT immunohistochemistry. Rostral is left and dorsal is up. Left side is wild-type animal, right is +/kr animal. Double arrow indicates the width of parvocellular reticular formation, measured between trigeminal motor nucleus (5Mo) and facial nerve (7n). The parvocellular reticular formation does not contain ectopic trigeminal motorease in width, and does not contain ectopic trigeminal motorease in +/kr mice. (B) Medial sagittal section showing the anterior part (V4a) of the fourth ventricle (V4). +/kr mice show normal, noninvaginated V4a. (A1 and B1) wild-type; (A2 and B2) +/kr mice. Scale bars, 100 µm.

rostral to the dorsal vagal motor nucleus (9 and 10 in Fig. 6), the ambiguus (Amb) subnuclei and the intermediate reticular nucleus (IRt), all identifiable by their intact population of choline acetyltransferase positive neurons. A dramatic reduction was found in the gigantocellular (Gi) and paragigantocellular reticular nuclei, whereas the more ventral facial nucleus (7Mo) was not significantly modified. As a result, the rostral (pars compacta, ca) Amb and IRt were shifted rostrally and dorsally (distance between caudalmost descending facial nerve fibres and rostralmost ambiguus neurons $1215 \pm 31.3 \ \mu m$ in +/+, n = 4 and 680 \pm 93.4 µm in kr/kr, n = 4, P < 0.001). The facial nucleus itself was also shifted rostrally very close to the 7n (see Garel et al., 2000), indicating that hypoplasia affected the reticular domain extending between ascending and descending branches of the 7n (distance between anteriormost facial nerve fibers, and anterior-most limit of facial nucleus: $d = 432.5 \pm 35.9 \ \mu m$ in +/+, n = 4, and d = 215 \pm 47.3 µm in *kr/kr*, *n* = 4, *P* < 0.001).

None of the anatomical defects described in kr/kr mice were found in +/kr mice therefore confirming that r5 and r6 were normal in heterozygous mutants. We observed normal distances between the 7n and the 7Mo (432.5 ± 35.9 µm in +/+, n = 4, and 420 ± 59.4 µm in +/kr, n = 4, NS), a normal sized SO (largest diameter: 1197.5 ± 78.5 µm in +/+, n = 4, 1267.5 ± 99.8 µm in +/kr, n = 4, NS) and normal AP lengths of the Gi (1215 ± 31.1 µm in +/+, n = 4, 1262 ± 82.6 µm in +/kr, n = 4, NS).



FIG. 5. Respiratory responses to hyperoxia and hypoxia in *kr/kr* and wildtype mice at the end of the first postnatal week. (A) Direct plethysmographic recordings at P10 before (control) and 30 s after the onset of hypoxic or hyperoxic challenges. Scale bar, 2 s. (B) Trace plot of average minute volume (Vm, as a percentage of control values) measured before and 30 s and 90 s after the onset of hyperoxia (B1) or hypoxia (B2), in +/+ (n = 20, black dots) and in *kr/kr* (n = 11, open triangles). *P < 0.05. In *kr/kr* mutants, the initial response is preserved (30 s) demonstrating function of chemoreceptive mechanisms, whereas later processing is abolished (90 s).

Discussion

We have analysed anatomical defects and the physiological phenotypes in newborn *kreisler* mutant mice. Our observations support the hypothesis that r5 derivatives are eliminated in *kr/kr* animals, and are consistent with previous reports showing that respiratory parameters are genetically controlled by early segmentation genes (Jacquin *et al.*, 1996; Domínguez del Toro *et al.*, 2001). In this context, observations in +/kr mice provide the first description of a segmentation-related respiratory phenotype that is not associated with rhombomere elimination. Our data suggest that genetic abnormalities in hindbrain development having no obvious consequences on survival and general hindbrain anatomy, might nevertheless result in abnormal respiratory parameters, a factor potentially contributing to sudden infant death, when combined with environmental factors.

The Krox20-dependent antiapneic neuronal system originates from r3 whereas kr/kr phenotypic traits are related to r5 and r6

We conclude from the present study that the $Krox20^{-t}$ and $Hoxa1^{-t}$ respiratory phenotypes and lethality (Jacquin *et al.*, 1996; Domínguez del Toro *et al.*, 2001) result primarily from defects in r3/r4, as they are not reproduced in kr/kr mice in which r3 and r4 are present. In structures probably derived from r3/r4, many neurons: (i) project to respiratory neuronal groups (Haxhiu *et al.*, 1993; Nunez-Abades *et al.*, 1993; Dobbins & Feldman, 1994); (ii) control the duration of inspiration in adult rodents (Jodkowski *et al.*, 1994); (iii) depress the respiratory rhythm frequency in rodent neonates *in vitro* (Errchidi *et al.*, 1991; present results); and (iv), induce a periodic respiratory pattern in the foetal lamb (Dawes *et al.*, 1983). As discussed previously (Jacquin *et al.*, 1996), the $Krox20^{-t}$ mutation spares rhythm-depressant controls and eliminates the rhythm-promoting and the antiapneic systems. We show that this r3-/r4-derived system is not eliminated by the *kreisler* mutation.



FIG. 6. Anatomical defects in the hindbrain of kr/kr mice. Sagittal sections of the brainstem of wild-type (+/+, left) and kr/kr (right) littermates showing ChAT immunoreactive neurons. Top, location in the brainstem; bottom, structures (in grey) reduced in size by the mutation: the gigantocellular nucleus (Gi); the superior olive (SO); the preganglionic facial nucleus (7pgg). Note the absence of the abducens nucleus (6) in kr/kr mice. The mutation does not affect the size of the trigominal nucleus (5Mo), caudal pontine nucleus (PnC), facial nucleus (7mo) and nerve (7n), intermediate reticular nucleus (IRt) and of the different subnuclei of the ambiguus nucleus (ca); pars compacta (ca); pars semicompacta (sca); pars retro-ambigualis (ra). LC, locus coeruleus; Nts, nucleus tractus solitarius; Ve, vestibular nucleus. Scale bar, 200 µm. Arrows indicate rostral (r) and dorsal (d).

Phenotypic particularities of kr/kr mice, not observed in +/kr animals, appear as a result of the abnormal development of different neuronal populations derived from r5 or r6. Systems stimulating frequency are difficult to locate because pontine hypoplasia causes a rostral shift of bulbar structures relative to the facial nerve, so that PB transection removes more bulbar structures in kr/kr than in wild-type mice. Therefore, low frequency in kr/kr mice might result from the elimination of nonvital rhythm-promoting reticular circuits or alternatively from the impairment of the medullar rhythmogenic circuits themselves. The delayed chemosensory control of breathing seems also to require neurons originating in r5/r6. Among reticular structures that are reduced in kr/kr mice, the lateral paragigantocellular nucleus has been first suspected to control breathing by Von Euler (1986). This nucleus contains neurons that are connected to dorsal and ventral respiratory groups and respiratory premotoneurons (Andrezik et al., 1981; Ellenberger & Feldman, 1990; Nunez-Abades et al., 1993; Dobbins & Feldman, 1994). It also receives afferents from the primary relay nucleus of respiration-related sensory afferents, the nucleus tractus solitarius (Andrezik et al., 1981; Lovick, 1986). The kr/kr mutation could also affect the retrotrapezoid nucleus, a small group of neurons, located between the ventro-medial border of the facial nucleus and the ventral surface of the brain, controlling the delayed respiratory effects of CO₂ (Nattie & Li, 1990; Nattie, 2000) and hypoxia (Bodineau *et al.*, 2000a, b). Further experiments isolating *in vitro* the pontine CO₂ sensitive structures would be needed to identify alterations of CO₂ sensitivity in kr/kr mutant mice.

The heterozygous kreisler mutation increases the efficiency of antiapneic neuronal systems originating from r3

Comparing +/kr with $Krox20^{-/-}$ mice shows that the same respiratory parameters are affected in both mutants. Thus, the +/kr respiratory phenotype was a mirror image of that previously found lethal in $Krox20^{-/-}$ mice, in which the respiratory frequency was low, the tidal volume was large and the time spent in apnoeas dramatically increased compared to wild-type animals. Similarly, present observations in vitro, showing that the pontine inhibition is significantly less than normal in +/kr mutants contrasts with observations in Krox20^{-/-} mice, in which pontine inhibition was greater than normal as compared to wild-type animals. Altogether, results are therefore consistent with the hypothesis that the r3-derived part of the antiapneic system is hyperactive in the +/kr mutants and probably contributes to the increased respiratory frequency. Furthermore, comparisons between +/kr and kr/kr mice show that the +/kr mutation does not functionally modify r5-derived structures. These results could be in keeping with observations in +/kr embryos indicating that the pattern of gene expression is altered in r3 (Manzanares et al., 1999b). Alternatively, because the kreisler mutation affects rather large genomic domains (Cordes & Barsh, 1994), other yet undetermined genes operating in r3/r4 might be involved.

The expression of Hoxa3 is normally caudal to the r4/r5 limit and upregulated by kreisler in r5 and r6 (Manzanares et al., 1997). In +/kr mutants, Hoxa3 has been found to be induced in r3, raising the possibility that there may be a partial change in r3 identity (Manzanares et al., 1999b), but no deficits were found in r4. We have recently investigated the functional consequences of a similar mis-specification. In Hoxa1^{-/-} mutant mice, in which parts of r3 and r4 acquires an r2-like identity, the mutation induces formation of ectopic motor subnuclei and supernumerary neuronal circuits increasing respiratory frequency after birth (Domínguez del Toro et al., 2001). Generation of these new neuronal populations changes the antero-posterior length of the pons and the morphology of the anterior end of the fourth ventricle. Present results show that production of supplementary reticular neurons is unlikely to occur in +/kr mice. Lack of any obvious anatomical phenotype in the pons of +/kr mice suggests that the development of efferent connections of r3-derived neurons has been changed without significant modification in the size of neuronal populations.

Hyperactivity of the antiapneic neuronal system in +/kr mice requires kreisler-dependent neurons

Additional experiments, performed at embryonic stages, are required to investigate developing efferent connections of r3-derived neurons. Nevertheless, comparing +/kr with kr/kr mutants provides information on how these connections are modified. Although mis-specifications of r3 are exaggerated in kr/kr mutants (Manzanares *et al.*, 1999b), the behavioural analysis of kr/kr mice revealed a reversal, rather than an exaggeration, of respiratory phenotypic traits observed in +/kr mice. In vivo, the respiratory frequency was slightly less than normal and the duration of apneas was normal. Hypersensitivity to subcutaneous NLX administration was also reversed. In vitro, studies of rhythm generation indicated that the pontine control was normal. Thus, the kr/kr mutation abolished all phenotypic traits modifying the control of resting, apneic and *in vitro* respiratory frequencies in +/kr animals. It seems therefore that hyperactivity of the antiapneic neuronal system in +/kr mutants requires intact relay structures originating from r5/r6. Indeed, rhythm promoting PB pathways (Borday *et al.*, 1997), deriving probably from a lateral embryonic axonal tract (Lumsden *et al.*, 1994), cross r5 before reaching the rhythm generator. Hence, hyperactivity in +/kr mice could result from the development of additional axonal arborizations or increased synaptic efficacy in r5-/r6-derived territories. After elimination of r5 in kr/kr mice, direct functional connections are preserved with the major synaptic target, i.e. the rhythm generator. Therefore, the +/kr mutation could generate, in r5-/r6-derived territories, a novel collateral relay of the antiapneic neuronal system. Although abnormal, this relay persists and functions after birth.

The question whether this +/kr phenotype results exclusively from abnormalities in r3 remains open. Within r3, the mechanisms by which the mutation may influence cell specification remains poorly understood, because kreisler expression in this rhombomere, at the level of the dorsal roof, remains unaffected in the mutants (Cordes & Barsh, 1994). Furthermore, assuming an exclusive r3 origin of the phenotype, only Krox20-dependent neuronal systems would be affected. Our observations on the enkephalinergic control of the respiratory frequency show that, in fact, some neuronal populations that are not eliminated by the $Krox20^{-/-}$ mutation (Jacquin *et al.*, 1996), can also be hyperactive in +/kr mutants and presumably modified in kr/kr mutants, suggesting widespread abnormalities associated with the regulatory role of the kreisler gene, despite its restricted expression in r5 and r6. We hypothesize a contribution of r5/r6 kreisler-expressing cells in the establishment and/or maintenance of their presynaptic connectivity patterns. The same mechanism could also operate in wild-type animals, in which kreisler-dependent neurons receive collateral inputs from the chemosensory pathway. We suggest that the molecular signalling initiated by kreisler expression in r5/r6 could act presynaptically, to control the development of functional collateral relays, according to the identity of presynaptic neurons. In wild-type animals, this mechanism would prevent collateralization of pontine (antiapneic) or widely distributed (enkephalinergic) neuronal systems and promote collateralization of medullar (chemosensory) systems.

Conclusion

Our results provide additional evidence that hindbrain segmentation during early embryonic development controls the functional organization of neuronal networks after birth. Developmental processes initiated in r3 generate neuronal systems that are crucial to prevent sudden death during the restricted period of time extending during the first postnatal days in mice. In contrast, despite massive hypoplasia of the paragigantocellular reticular nucleus in kr/kr mutants, no evidence was found for a vital role of neuronal networks originating from r5; some of these neurons exert a positive control over respiratory frequency that relays pontine or chemosensory information controlling respiratory frequency.

These observations have important clinical implications for neonatal physiopathology. Observations in mouse models indicate at least three distinct syndromes indicative of abnormal embryonic development of hindbrain circuits. They might be detectable in human by scoring simple reflex reactions such as: (i) suction for $Krox20^{-/-}$ like syndromes (Jacquin *et al.*, 1996); (ii) righting for kr/kr-like syndromes; and (iii), chemosensory responses that are affected in human Ondine Course syndrome (Erickson *et al.*, 1996). Importantly, abnormalities of the suction-deglutition-respiration have been ascribed to different syndromes involving precise domains of the segmented hindbrain (Abadie *et al.*, 1999). Because transcription factors orchestrating hindbrain segmentation are organized in a regulatory network, a single mutation might have many consequences in this network. Therefore, prediction of neuronal deficits in patients is not straightforward. A point mutation might not necessarily eliminate function of neurons. Thus, previous and present work shows that genetic abnormalities of hindbrain segmentation are as able to either suppress (*kr/kr*, *Krox20^{-/-}*) or enhance (+/*kr*, *Hoxa1^{-/-}*) the function of the respiration-controlling neuronal system.

Acknowledgements

This work was supported by an H.F.S.P. research grant 101/97 to J.C. and P.C. We wish to thank G. Fortin and S. Jungbluth for valuable discussions and comments on the manuscript. We thank Mr Sahakian, Mss. Fourcaudeau, Morales, Daoud and Callens for very useful technical assistance. We thanks Dr Barsh for the kind gift of the *kreisler* oligonucleotides. Work in J.C.'s laboratory was supported by ACI BDPI#57, Centre National de la Recherche Scientifique, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). E.D.T. was supported by European Community (BIO4-CT975-096) and FRM (EP001227/1) training grants. Work in P.C.'s laboratory was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Abbreviations

+/+, wild-type mouse; +/kr, heterozygous kreisler mutant; kr/kr, homozygous kreisler mutant; ChAT, choline acetyltransferase; NLX, naloxone; P, postnatal day; PB, ponto-bulbar; PM, ponto-mesencephalic; TF, trigemino-facial; Vm, minute volume; V_{T} : tidal volume.

References

- Abadie, V., Champagnat, J. & Fortin, G. (2000) Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport*, **11**, 141–145.
- Abadie, V., Champagnat, J., Fortin, G. & Couly, G. (1999) Suckingdeglutition-respiration and brain stem development genes. *Arch. Pediatr.*, 6, 1043–1047.
- Andrezik, J.A., Chan-Palay, V. & Palay, S.L. (1981) The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Demonstration of afferents by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat. Embryol. (Berl*), 161, 373–390.
- Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R. & Wessendorf, M.W. (1995) δ-opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. J. Neurosci., 15, 1215–1235.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M. & Champagnat, J. (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.*, 75, 1–45.
- Bodineau, L., Cayetanot, F. & Frugiere, A. (2000a) Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an *in vitro* study in neonatal rat. *Neurosci. Lett.*, **295**, 67–69.
- Bodineau, L., Frugiere, A., Marlot, D. & Wallois, F. (2000b) Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci. Lett.*, 280, 111–114.
- Borday, V., Kato, F. & Champagnat, J. (1997) A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. *Neuroreport*, 8, 3679–3683.
- Champagnat, J. & Fortin, G. (1997) Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *Trends Neurosci.*, **20**, 119–124.
- Cordes, S.P. & Barsh, G.S. (1994) The mouse segmentation gene kr encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell*, **79**, 1025–1034.
- Dawes, G.S., Gardner, W.N., Johnston, B.M. & Walker, D.W. (1983) Breathing in fetal lambs: the effect of brainstem section. J. Physiol. (Lond.), 335, 535–553.
- Deol, M.S. (1964) The abnormalities of the inner ear in kreisler mice. J. Embryol. Exp. Morph., 12, 475–490.
- Dillon, G.H., Welsh, D.E. & Waldrop, T.G. (1991) Ventrolateral pons mediates short-term depression of respiratory frequency after brief hypoxia. *Respir. Physiol.*, **121**, 87–100.

692 F. Chatonnet et al.

- Dobbins, E.G. & Feldman, J.L. (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. J. Comp. Neurol., 347, 64–86.
- Domínguez del Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F. & Champagnat, J. (2001) Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J. Neurosci.*, **21**, 5637–5642.
- Ellenberger, H.H. & Feldman, J.L. (1990) Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res.*, **513**, 35–42.
- Erickson, J.T., Conover, J.C., Borday, V., Champagnat, J. & Katz, D.M. (1996) Mice lacking BDNF exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. J. Neurosci., 16, 5361–5371.
- Errchidi, S., Monteau, R. & Hilaire, G. (1991) Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an *in vitro* study. J. Physiol. (Lond.), 443, 477–498.
- Fortin, G., Champagnat, J. & Lumsden, A. (1994a) Onset and maturation of branchiomotor activities in the chick hindbrain. *Neuroreport*, 5, 1149–1152.
- Fortin, G., Foutz, A.S. & Champagnat, J. (1994b) Respiratory rhythm generation in chick hindbrain: effect of MK-801 and vagotomy. *Neuroreport*, 5, 1137–1140.
- Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A. & Champagnat, J. (1999) Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat. Neurosci.*, 2, 873–877.
- Fortin, G., Kato, F., Lumsden, A. & Champagnat, J. (1995) Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. J. Physiol. (Lond.), 486, 735– 744.
- Garel, S., Garcia-Dominguez, M. & Charnay, P. (2000) Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development*, 127, 5297–5307.
- Gonzalez, C., Almaraz, L., Obeso, A. & Rigual, R. (1994) Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.*, 74, 829–898.
- Haxhiu, M.A., Jansen, A.S.P., Cherniack, N.S. & Loewy, A.D. (1993) CNS innervation of airway-related parasympathetic preganglionic neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *Brain Res.*, 618, 115–134.
- Hertwig, P. (1942) Sechs neue Mutationen bei der Hausmaus in ihrer Bedeutung für allgemeine Vererbungsfragen. YX. menschl. Vererbgslehre, 26, 1–21.
- Hertwig, P. (1944) Die Genese der Hirn- und Gehörorganmißbildungen bei röntgenmutierten Kreisler-Mäusen. Zeit. Konstlehre, 28, 327–354.
- Jacquin, T.D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P. & Champagnat, J. (1996) Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks *in Krox20* knockout mice. *Neuron*, **17**, 747–758.
- Jodkowski, J.S., Coles, S.K. & Dick, T.E. (1994) A 'pneumotaxic centre' in rats. *Neurosci. Lett.*, **172**, 67–72.
- Lovick, T.A. (1986) Projections from brainstem nuclei to the nucleus paragigantocellularis lateralis in the cat. J. Auton. Nerv. Syst., 16 (1), 1–11.
- Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. & Chambon, P. (1991) Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell*, 66, 1105–1119.
- Lumsden, A., Clarke, J. D., Keynes, R. & Fraser, S. (1994) Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of the chick embryo hindbrain. *Development*, **120**, 1581–1589.
- Lumsden, A. & Keynes, R. (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, 337, 424–428.
- Lumsden, A. & Krumlauf, R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. Science, 274, 1109–1115.

- Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G. & Krumlauf, R. (1999a) Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development*, **726** (4), 759–769.
- Manzanares, M., Cordes, S., Kwan, C.T., Sham, M.H., Barsh, G.S. & Krumlauf, R. (1997) Segmental regulation of *Hoxb3* by. *Kreisler. Nature*, 387, 191–195.
- Manzanares, M., Trainor, P.A., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C.T., Sham, M.H., Wilkinson, D.G. & Krumlauf, R. (1999b) The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. *Dev. Biol.*, **211**, 220–237.
- Marin, F. & Puelles, L. (1995) Morphological fate of rhombomeres in quail/ chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur. J. Neurosci.*, 7, 1714–1738.
- Mark, M., Lufkin, T., Vonesh, J.-L., Ruberte, E., Olivo, J.-C., Dollé, P., Gorry, P., Lumsden, A. & Chambon, P. (1993) Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development*, **119**, 319–338.
- McKay, I.J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A. & Lewis, J. (1994) The *kreisler* mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development*, **120**, 2199–2211.
- Nattie, E.E. (2000) Multiples suites for central chemoreception: their roles in response sensitivity and in sleep and wakefulness. *Respir. Physiol.*, **122**, 223–235.
- Nattie, E.E. & Li, A.H. (1990) Fluorescence location of RVLM kainate microinjections that alter the control of breathing. J. Appl. Physiol., 68 (3), 1157–1166.
- Neubauer, J.A., Melton, J.E. & Edelman, N.H. (1990) Modulation of respiration during brain hypoxia. J. Appl. Physiol., 68 (2), 441–451.
- Nunez-Abades, P.A., Morillo, A.M. & Pasaro, R. (1993) Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections. J. Auton. Nerv. Syst., 42, 99–118.
- Reckling, J.C., Champagnat, J. & Denavit-Saubie, M. (1996) Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. J. Neurophysiol., 75, 795–810.
- Romagnano, M.A., Harshbarger, R.J. & Hamill, R.W. (1991) Brainstem enkephalinergic projections to spinal autonomic nuclei. J. Neurosci., 11, 3539–3555.
- Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P. & Charnay, P. (1998) How to build a vertebrate hindbrain. Lessons from genetics. C. R. Acad. Sci., III, 321(10), 819–834.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P. & Lumsden, A. (1997) Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of *Krox20* mouse mutants. *Development*, **124**, 1215–1226.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C. & Charnay, P. (1993) Disruption of *Krox20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell*, **75**, 1199–1214.
- Suzue, T. (1984) Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brainstem spinal cord preparation of the neonatal rat. J. Physiol. (Lond.), 354, 173– 183.
- Vizek, M. & Bonora, M. (1998) Diaphragmatic activity during biphasic ventilatory response to hypoxia in rats. *Respir. Physiol.*, **111** (2), 153–162.
- Von Euler, C. (1986) Brainstem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In Fishman, A. P. (ed.). *Handbook of Physiology. The Respiratory System*, Vol. II, Control. Breathing Part I. American Physiology Society, Bethesda, MD, 1–67.

Chapitre 2

Identification d'un nouveau type de perturbation du réseau neuronal respiratoire chez un mutant hétérozygote.

Les souris mutantes naturelles *kreisler* hétérozygotes : un exemple de phénotype fonctionnel dans un contexte anatomo-pathologique normal.

Collaboration : O. Voiculescu, P. Charnay, INSERM U368 – Biologie Moléculaire du Développement, ENS Paris.

La première stratégie utilisée consiste à étudier les animaux mutants hétérozygotes pour un gène d'intérêt. La mise en évidence de re-spécifications cellulaires chez l'embryon des mutants hétérozygotes pour le gène *kreisler* (+/kr) nous a conduit à examiner le comportement respiratoire et l'anatomie de ces animaux à la naissance, au cours de l'étude de leurs congénères sauvages et homozygotes mutants. En effet, les études chez l'embryon révèlent des modifications dans les patrons d'expression de certains gènes impliqués dans le contrôle et le maintien des identités rhombomériques. Ainsi, les gènes *Hoxa3* (Manzanares et al., 1999b) et *MafB/kreisler* (Giudicelli et al., 2003) habituellement exprimés dans les rhombomères postérieurs à la limite r4 / r5, sont exprimés dans certaines cellules de r3 chez les embryons +/kr. Cette re-spécification n'est que partielle et laisse les frontières interrhombomériques intactes. Nous avons vu précédemment que le rhombomère 3 tenait une place importante dans le système excitateur pontique de contrôle du rythme respiratoire appelé centre anti-apnéique.

L'étude détaillée de l'anatomie de ces animaux +/kr ne nous a pas permis d'identifier ni de localiser des populations neuronales qui auraient pu être affectées par les changements d'identité au niveau du rhombomère 3. Ces mutants sont donc les premiers animaux mutants qui possèdent un phénotype respiratoire visible tout en ne montrant pas de perturbations anatomiques clairement identifiables. De plus, ces animaux ne présentent aucun défaut dans les différents réflexes étudiés, que ce soit le réflexe oro-buccal impliquant le niveau trigeminal, le réflexe de retournement testant l'étage vestibulo-facial ou les réponses respiratoires aux stimuli hypoxique ou hyperoxique, mettant en jeu le niveau glossopharyngien.

L'analyse de la respiration *in vivo* et *in vitro* chez les animaux +/kr montre que ces animaux ont une fréquence respiratoire augmentée de 50% par rapport à leurs congénères sauvages pendant les 3 premiers jours postnataux (cf. publication 2). Cette fréquence respiratoire forte est observée à la fois *in vivo* et *in vitro*. Cette hyperactivité respiratoire est liée à un temps passé en apnée moins important. De plus, cette augmentation de la fréquence est renforcée lors de l'administration de naloxone qui n'a aucun effet chez les congénères sauvages ou kr/kr (cf. publication 2).

Les expériences menées *in vitro* nous permettent de localiser dans le pont les modifications à l'origine de l'augmentation de la fréquence respiratoire chez ces animaux. En effet, la fréquence du rythme généré par le bulbe isolé des animaux +/kr est similaire à celle des animaux sauvages, mais quand les enregistrements électrophysiologiques sont effectués sur des tronc cérébraux entiers, la fréquence respiratoire des animaux +/kr est supérieure à celle des animaux sauvages. Au contraire de ce qui a été observé chez les animaux Krox20, il semble que chez les animaux +/kr la balance des afférences pontiques sur le générateur central du rythme respiratoire soit déplacée dans le sens des excitations : quand le pont est ôté par section, son action paraît moins inhibitrice chez les animaux hétérozygotes *kreisler* que chez les animaux sauvages. Ces travaux montrent pour la première fois que des mutations de gènes de développement impliqués dans l'ontogenèse du tronc cérébral peuvent conduire à une augmentation de la fréquence respiratoire.

L'analyse des animaux homozygotes chez lesquels les mêmes altérations géniques embryonnaires dans le rhombomère 3 ont été observées, nous a montré non pas une aggravation du phénotype hétérozygote comme nous pouvions nous y attendre, mais des paramètres respiratoires proches de ceux des animaux sauvages (fréquence, volume courant, apnées, insensibilité à la naloxone). Par contre, comme il a été signalé précédemment (cf. chapitre 1), les animaux kr/kr sont soumis à un profond remaniement anatomique puisqu'une grande partie des territoires dérivés de r5 sont absents chez ces individus.

Pour rendre cohérent cet ensemble d'observations, nous avons bâti l'hypothèse que les modifications de l'expression de gènes dans le rhombomère 3 conduisait à des reconfigurations au sein du réseau neuronal respiratoire. Ces reconfigurations, induisant l'augmentation de la fréquence respiratoire chez les animaux +/kr, seraient dépendantes de la présence du rhombomère 5 qui pourrait être utilisé comme relais. Ceci expliquerait que les animaux kr/kr, bien que présentant les mêmes modifications embryonnaires des patrons

d'expression géniques dans r3, n'ont pas un phénotype respiratoire identique ou aggravé par rapport à celui des animaux +/kr, mais qu'ils sont plus proches des animaux sauvages (cf. publication 2).

Chapitre 3

Comparaison des différentes mutations affectant la segmentation du tronc cérébral, et de leurs conséquences sur le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire.

Les différentes mutations touchent des populations neuronales sélectives : l'aspect modulaire du réseau neuronal respiratoire.

La comparaison des différentes mutations conduisant à des perturbations de la segmentation ($Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr et kr/kr, $Hoxa2^{-/-}$) permet d'émettre des hypothèses concernant la mise en place des groupes et circuits neuronaux constituant le réseau neuronal respiratoire. En effet, à chaque mutation correspond un phénotype particulier qui affecte des populations neuronales spécifiques. Dans le cas des animaux $Krox20^{-/-}$, les cellules excitatrices dérivées de r3 sont éliminées, tandis que dans la même zone anatomique les neurones catécholaminergiques du groupe A5 et les neurones enképhalinergiques restent présents et fonctionnels (Jacquin et al., 1996). Dans ce cas, l'invalidation d'un gène de segmentation qui produit une re-spécification suivie d'une suppression de territoires rhombomériques (r3 et r5, cf. ci-dessus, chapitre 1) induit l'élimination d'une population neuronale définie.

Chez les animaux *Hoxa1^{-/-}*, un groupe de neurones surnuméraires, transitoirement excitateurs du rythme respiratoire, a été découvert dans une zone du tronc cérébrale probablement dérivée des rhombomères r3 et r4, dont certaines cellules subissent un changement d'identité antéro-postérieure (r3 ou r4 changée en r2). Ainsi, les conséquences d'une invalidation de gène ne se traduisent pas forcément par la disparition de populations neuronales, mais peuvent aussi inclure l'apparition de groupes neuronaux nouveaux, fonctionnels et conservés au cours du développement (Domínguez del Toro et al., 2001).

Les résultats concernant les animaux +/kr montrent, quant à eux, que des modifications du réseau neuronal respiratoire peuvent se produire sans perturbations majeures de l'architecture rhombomérique, et sans élimination de larges territoires du tronc cérébral. Dans ce cas, les défauts d'expression génique observés dans r3 chez l'embryon conduisent à

des reconfigurations subtiles au sein du réseau (cf. chapitre 2). Les expériences menées sur les animaux kr/kr nous indiquent que les conséquences de la mutation d'un gène régulateur de la segmentation sur la physiologie respiratoire à la naissance ne sont pas aisément prévisibles. Une comparaison des mutations $Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr et kr/kr est présentée dans la publication 3 suivante.

L'analyse des mutants $Hoxa2^{-/-}$ permet de dire que le rhombomère 2 ne semble pas jouer de rôle majeur dans la mise en place du système central de contrôle de la respiration, puisque ces animaux n'ont pas de phénotype respiratoire très marqué (cf. chapitre1). Par contre, cette mutation affecte le comportement masticatoire, comme la mutation $Krox20^{-/-}$. D'autre points similaires sont notés entre les comportements des animaux mutants $Hoxa2^{-/-}$ et $Krox20^{-/-}$, quoique très atténués chez $Hoxa2^{-/-}$. Ces similitudes peuvent s'expliquer par le fait que ces deux mutations touchent le système moteur du trijumeau, qui contrôle la mastication et qui dérive des rhombomères 2 et 3. De plus, ces mutations ne sont pas indépendantes, puisque Hoxa2 est régulé positivement par Krox20 dans r3 et r5 (cf. introduction).

De la comparaison de ces différentes mutations et de leurs conséquences sur le réseau neuronal respiratoire du tronc cérébral, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- i) le réseau respiratoire est organisé de façon modulaire, chaque module représentant un groupe de neurones défini, ayant au sein du réseau une fonction spécifique,
- ii) la mise en place de ces modules s'effectue par au moins trois mécanismes différents : l'élimination, la néoformation, la reconfiguration,
- iii) les conséquences de la mutation d'un gène de segmentation sont difficilement prévisibles car elles peuvent affecter des populations qui sont hors du domaine d'expression du gène muté ou invalidé : c'est un réseau de gènes interdépendants qui contrôle le développement du tronc cérébral et, changer l'expression d'un gène, peut provoquer des modifications dans tout le réseau génique.

Publication 3

Chatonnet F., Thoby-Brisson M., Abadie V., Domínguez del Toro E., Champagnat J and. Fortin G. (2002). Early development of respiratory rhythm generation in mouse and chick. *Resp. Physiolo. Neurobiol.* **131**(1-2), 5-13.



Respiratory Physiology & Neurobiology 131 (2002) 5-13



www.elsevier.com/locate/resphysiol

Early development of respiratory rhythm generation in mouse and chick

Fabrice Chatonnet *, Muriel Thoby-Brisson, Véronique Abadie, Eduardo Domínguez del Toro, Jean Champagnat, Gilles Fortin

U.P.R. 2216, Neurobiologie Génétique et Intégrative, IFR 2118 Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, C.N.R.S., 1, av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Accepted 30 January 2002

Abstract

We are investigating neuronal circuits resulting from conservative developmental mechanisms orchestrating the segmentation of the vertebrates hindbrain into compartments called rhombomeres (r). Segmentation transcription factors *Hoxa1*, *Krox20* and *kreisler* are expressed in the future rhombomeres r4–r5, r3 and r5, r5–r6, respectively. In mice, the in vivo and in vitro analysis of neuronal groups after inactivation of these three genes revealed distinct postnatal respiratory phenotypes associated with defects of central respiratory controls resulting from deletion, neoformation or reconfiguration of modular circuits. In chick and mice, we have found neuronal rhythm generators that conform to the rhombomeric anatomical pattern as early as at the end of the segmentation. By isolating chick hindbrain segments in vitro, we have also identified rhombomeric motifs allowing the formation or deletion of a specific (GABAergic) rhythm-promoting module. Therefore, primordial rhombomeric organization of the hindbrain seems to determine a modular organization of the rhythmogenic network, thereby influencing later function of brainstem respiratory control networks. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Birds; chick; Brainstem; segmentation; Control of breathing; respiratory rhythm generation; Development; respiratory rhythm generation; hindbrain segmentation; Genes; hindbrain segmentation; Mammals; mouse; Rhythm; respiratory; generation; Transcription factors; hindbrain segmentation

1. Introduction

Respiratory-like rhythmic movements are among the earliest detectable behaviors of embryonic life (DeVries et al., 1982; Jansen and Chernick, 1983). Breathing is under the control of rhythmic respiratory signals generated by synaptic relationships and electrical membrane properties of reticular neurons located in the brainstem (Bianchi et al., 1995). The brainstem derives from the embryonic hindbrain (rhombencephalon), one of the vesicles that appears towards the anterior end of the neural tube. When reticular neurons differentiate, the hindbrain neuroepithelium is partitioned along the antero-posterior axis into an

^{*} Corresponding author. Tel.: + 33-1-69-82-34-05; fax: + 33-1-69-82-41-78

E-mail address: fabrice.chatonnet@iaf.cnrs-gif.fr (F. Chatonnet).

iterated series of eight cellular compartments called rhombomeres. This segmentation process is transient and believed to specify neuronal fates by encoding positional information (Lumsden and Keynes, 1989; Lumsden et al., 1994). We have proposed that segmentation is also determinant in conferring the ability to generate a rhythm. By the end of the segmentation period, the hindbrain exhibits a consistent and organized rhythmic respiratory-like activity (Fortin et al., 1994b). The network organization which is responsible for this rhythm generation conforms to the rhombomeric pattern in the hindbrain of the embryo (Fortin et al., 1995).

A large amount of data has been accumulated on transcription factors governing the developmental process of hindbrain segmentation (Fig. 1). Expression of homeobox genes of the *Hox* family (Fig. 1A) precedes rhombomere formation and analysis of mouse *Hox* mutations revealed an important role in the establishment of rhombomere-specific neuronal patterns (Mark et al., 1993; Carpenter et al., 1993; Studer et al., 1996; Goddard et al., 1996; Lumsden and Krumlauf, 1996; Gavalas et al., 1997, 1998; Rijli et al., 1998; Helmbacher et al., 1998; Davenne et al., 1999; Rossel and Capecchi, 1999; Jungbluth et al., 1999; Bell et al., 1999).

Krox20 is also transiently expressed within the yet unsegmented hindbrain in two stripes with sharp edges corresponding to the future rhombomeres r3 and r5 (Wilkinson et al., 1989, Fig. 1A). The Krox20 gene product acts as a direct transcriptional activator of other r3- and r5-related genes belonging to the homeobox clusters (Sham et al., 1993; Nonchev et al. 1996) and participates in rhombomere boundaries formation (Giudicelli et al., 2001; Fig. 1B). The inactivation of Krox20 in transgenic mice eventually results in the deletion of r3 and r5 (Fig. 2A) as demonstrated by anatomical analysis of the hindbrain combined with the determination of the expression patterns of rhombomere-specific genes (Schneider-Maunoury et al., 1993; Swiatek and Gridley, 1993).

kreisler is expressed in r5 and r6 (Fig. 1A) and is a segmentation gene: its deletion leads to the lack of r5 (Fig. 2A). It is also a cellular identity gene because its mutation modified the expression patterns of some later developmental genes such as *Phox2b* in r6 (Manzanares et al., 1999). Interestingly, both *kreisler* homozygous and heterozygous mutations cause cellular identity modifications in r3 (Fig. 2A), a domain in which *kreisler* is not expressed (Manzanares et al., 1999).

Segmentation and segmental expression of genes are transient features. A dramatic reconfiguration of neurons and synapses takes place during



Fig. 1. The genetic control of hindbrain segmentation in vertebrates. (A) expression domains of some segmentation controlling genes. Boxes represent rhombomeres from r2 (anterior) to r6 (posterior). Black lines indicate strong expression domains, grey lines indicate moderate or lighter expression domains. Caudally to r6, Hox gene expression domains are continued in the spinal cord; (B) possible role of Krox20 and Hox genes in the formation of r3 (light grey box) and r4 (dark grey box, from Giudicelli et al. (2001)). Arrows: upregulations, bars: inhibitions. The first gene expressed is Hoxa1 in presumptive r4, which upregulates Hoxb1. Krox20 is first expressed in a narrow stripe anterior to this presumptive r4 and its expression spreads rostrally to form the presumptive r3. Formation of the r3-r4 boundary involves an inhibitory interaction between Hoxb1 and Krox20, as well as cell-cell signalling between EphA4 tyrosine kinase receptor (upregulated by Krox20) and its ligand ephrinB2 (Mellitzer et al., 1999).



Fig. 2. Rhombomere elimination and behavioral phenotypes in Hoxa1, Krox20 and kreisler mutants. (A) rhombomere elimination or modifications in some segmentation gene mutants. Boxes represent rhombomeres from r2 to r6. Crosses indicates eliminated rhombomeres: r3 and r5 in $Krox20^{-/-}$ mice, r5 and part of r4 in $Hoxa1^{-/-}$ mice, r5 in kr/kr. Stars indicate modifications in rhombomere identity: one star and italic underlined rhombomere number indicate that the rhombomere partially takes another identity e.g. some cells of r3 and r4 are modified and show and r2 identity in $Hoxa1^{-/-}$ mice; two stars indicate modification in late Phox2b expression without change in rhombomere identity; (B) Comparison of respiratory phenotypes of $Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr and kr/kr mutant mice at P0.5. Black: wild-type, white: homozygous mutants, grey: heterozygous mutants B1, respiratory frequency in vivo, B2, rhythm frequency recorded in vitro from cranial rootlets of isolated ponto-bulbar preparations, B3, masticatory rhythm: number of jaw opening elicited by peribuccal contact during 30 sec, B4, tidal volume in vivo.

fetal and postnatal stages. Thus, it is not clear whether the early rhombomeric pattern of *Hox* expression has any influence on the establishment of the neuronal circuitry of the mature brainstem. The present paper summarizes evidence indicating that, in fact, the specification of rhythmic circuits and breathing patterns takes place within the segmented hindbrain of the embryo.

2. Early *Hoxa1* and *Krox20* gene expressions in the embryonic hindbrain is vital after birth

The advent of mutant mice in which embryonic hindbrain development is affected by the deletion of specific territories facilitates the investigation of the physiological importance of segmentation (Fig. 2A). Life-threatening deficiency during the first day after birth (P0) has been established after the elimination of r4 and r5 in $Hoxa1^{-/-}$ mice (Domínguez del Toro et al., 2001; Fig. 2A), after the elimination of r3 and r5 in $Krox20^{-/-}$ mice (Jacquin et al., 1996, Fig. 2A) but not after the elimination of r5 only in homozygous *kreisler*

mutant (kr/kr) mice (Chatonnet et al., 2002, Fig. 2A). In $Krox20^{-/-}$ mice, lethality at P0 is associated with apneas lasting 10-times longer than normal and with the elimination of a rhythm promoting 'anti-apneic' module that is located in the caudal pontine reticular nucleus and derived from r3 and r4. None of the $Hoxa1^{-/-}$ mutant mice live more than 18 h after birth. They can be separated in two populations: one with a low respiratory frequency with early death (in the first 3 h of life) and the other with normal respiratory frequency with later death (around 15–18 h after birth).

Recording of the respiratory frequency in vitro (Fig. 2B2) revealed that different types of rhythm promoting and depressing systems, spatially intermingled in the caudal pontine reticular formation, can be discriminated by the lethal elimination of r3 or r4. Alterations in both the rhythm depressing or promoting groups can be assumed by pharmacological and sections experiments isolating the caudal medullar generator from its pontine afferences. In wild-type, the promoting mechanism has been analysed using a novel ventral-horizontal slice preparation (Borday et al., 1997). Noradrenergic and enkephalinergic rhythm-depressing neurons (Errchidi et al., 1991; Arvidsson et al., 1995) are spared and therefore distinct from the population of rhythm promoting neurons eliminated by the $Krox20^{-/-}$ mutation (Jacquin et al., 1996). Hence, the increase in rhythm frequency resulting from a section of rostral descending connections from the pons in vitro is larger than normal in $Krox20^{-/-}$ animals, indicating a bias of pontine afferences in favor of inhibition. Therefore, the development of a pontine rhythm-promoting module requires r3-derived territories eliminated in the $Krox20^{-/-}$ mutation.

Comparisons of respiratory and masticatory behaviors also reveal that distinct rhombomere eliminations (Fig. 2A) cause different functional phenotypes (Fig. 2B). $Krox 20^{-/-}$ is the only mutation leading to a masticatory (trigeminal) deficit. Elimination of r5 combined with abnormalities in r6 (compare +/kr and kr/kr, Fig. 2A) causes a significant cell loss in the rostral medulla resulting in a significant non-lethal decrease of respiratory frequency both in vivo and in vitro (Fig. 2B1-B2). Comparison with other mutants discussed elsewhere (Erickson et al., 1996; Fortin et al., 2000) suggests that small tidal volumes (e.g. in $Hoxa1^{-/-}$ and kr/kr mice, Fig. 2B4) result from the abnormal chemosensory reflex control of breathing.

3. Mechanisms by which modifications of the rhombomeric pattern alter the hindbrain neuronal organization

Beyond rhombomere elimination, inactivation of segmentation genes causes re-specification of progenitor cells in rhombomeres (see stars in Fig. 2A) and these changes also affect breathing behavior. Recently, we have shown that ectopic neuronal groups in the hindbrain of $Hoxa1^{-/-}$ mice establish de novo a neuronal circuit that escapes apoptosis and becomes functional postnatally so that respiratory frequency in vivo transiently reaches near normal levels (Fig. 2B1). This module develops from the mutant r3-r4 level, includes an ectopic group of progenitors with r2 identity (Fig. 2A), and integrates with the rhythmgenerating network controlling respiration at birth. Thus, in $Hoxa1^{-/-}$ mice, respiratory rhythm exhibits a correlation with anatomical modifications: the more the brainstem is altered, the more the respiratory frequency tends to be high, reaching wild-type levels for the most anatomically disturbed animals (Domínguez del Toro et al., 2001).

This was the first demonstration that changes in *Hox* expression patterns result in the appearance of novel neuronal circuits regulating vital adaptive behaviors. This striking finding prompts the question of the cascade of regulatory events triggered by Hoxal loss-of-function, leading to such longterm modification of hindbrain neural networks. Previous work demonstrated a role for *Hoxa1* in the activation of Hoxb1 expression in the presumptive r4 (Studer et al., 1996, Fig. 1B). Thus, some of the long-term effects of the Hoxa1 mutation could be due to the lack of *Hoxb1* activation in a subset of presumptive r4 cells, leading to r2-like specification. However, Hoxa1, unlike *Hoxb1*, appears to control both r4 and, indirectly, r3 development (Helmbacher et al., 1998; Domínguez del Toro et al., 2001, Fig. 1B). Thus, it is tempting to speculate that regulatory changes in two adjacent rhombomeres may be required for the generation of a supernumerary neuronal circuit.

In heterozygous *kreisler* mutants (+/kr), we noticed an abnormally high respiratory frequency both in vivo and in vitro (Fig. 2B1 and B2), without any distinguishable anatomical perturbation (Chatonnet et al., 2002). Early expression of some developmental genes have been investigated in +/kr mutants (Manzanares et al., 1999) and revealed that some r3 cells are modified, being transformed in r5-like cells (Fig. 2A). This suggests that some modifications of cell identity in the embryo could lead to the reconfiguration of the neuronal network without visible anatomical changes. We hypothesize that some new collateral pathways appear in +/kr mutants and increase the respiratory rhythm frequency.

Altogether, observations in mutant mice indicate that there are at least three ways by which modifications of the rhombomeric pattern alter the neuronal organization: deletion, neogenesis and reconfiguration of modular circuits.

4. Assembling a rhythm-promoting neuronal network in the chick embryo

In parallel with our studies of mutant mice, we have investigated whether or not normal embryonic development also involves the elimination, insertion or reconfiguration of modular circuits in the rhythmogenic network. This problem was mainly studied within the chick embryo for technical reasons. Fig. 3 compares the normal development of rhythmic activities in chick and mice.

At birth, the de-afferented brainstem of permanently breathing vertebrates generates a respiratory-like bursting activity at intervals of 13.1 ± 6.9 sec in chick and 5.8 + 1.9 sec in mouse. From the close of the segmental period in the chick embryo, (stage 24) until stage 28 (E4.5-5.5), the isolated hindbrain generates a 'low frequency' rhythmic pattern (LF, Fig. 3), with inter-burst intervals of 75.9 + 18.8 sec. This is also seen in mice at E12 (75.1 + 18.0 sec). These frequencies are one order of magnitude lower than neonatal rhythms. A more mature activity with high frequency episodes appears at around E6 in chick and E13.5 in mouse (HF, Fig. 3, Abadie et al., 2000). The episodic activity was found to correlate with the appearance of a class of 'inhibited reticular neurons' (IRNs) identified by their temporal pattern of activity showing a post-inhibitory rebound discharge initiating firing at the onset of the high frequency motor burst. Other active 'burst-related neurons' are all rhythmic and discharge in phase



Fig. 3. Development of the chick and mice respiratory activities. Comparison of the development (from top to bottom) of respiratory activities in mouse (right) and chick (left) recorded on embryos isolated brainstem nerve rootlets. Chick embryos views at different stages are indicated on far left. Color code indicates the succession of activities and developmental stages. Left, chick activities from the end of segmentation (E4.5) to E8: a low frequency rhythmic synchronous activity (LF) appears and progressively turns to episodic activity (HF). Right, mouse activities from the end of segmentation (E9) to E14.5: After an initial period (E10.5), the activity becomes synchronous between nerve rootlets (E12, LF) and then episodic (E13.5, HF). At E14.5, mouse activity is continuous, similar to newborn activity (fetal). The funnel shape drawing refer to the interspecific differences: it is the smallest at a phylotypic stage correponding to E6 in chick and E13.5 in mouse (Abadie et al., 2000). Calibration bars: chick embryo: 5 mm, recordings: 30 sec.

with motor bursts, so that there are exclusive inhibitory connections between rhythmic GABAergic neurons and IRNs. Therefore, the episodic activity correlates with the appearance of IRNs and GABA_A receptor-mediated inhibition (Fortin et al., 1999).

The early establishment of the episodic central pattern generators (Ep-CPGs) prompted investigation of their origin in relation to hindbrain segmentation. This was done in chick by recording activities, at E7-7.5, from brain territories deriving from individual or pairs of rhombomeres isolated in situ at the time of their formation (E2). Only those deriving from the r3r4 or r5r6 pair, developed a normal Ep-CPG output. By contrast, neither isolated r2r3 nor r4r5 pair were able to generate episodic activity. In addition, failure to obtain episodic activity following isolation of r1r2 predicted the absence of an Ep-CPG at the trigeminal level that was verified by acute transverse section at E7-7.5. Therefore, r3 and r5 Ep-CPGs provide outpout to motor neuronal pools located in their caudal even-numbered neighbor (Fortin et al., 1999). These results revealed a rhombomeric code that is required for the assembly of a specific neuronal circuit within the hindbrain.

Altogether, experiments in mouse and chick show that perturbations of the rhombomeric pattern irreversibly alter the function of the embryonic neuronal network and can be reflected at birth by respiratory deficits.

5. Implications for the phylogeny of the respiratory rhythms in vertebrates

In view the variety of specific respiratory organs and adapted rhythmic patterns of breathing in vertebrates including agnathians (Rovainen, 1996), teleostean fishes (Ballintijn, 1982), lungfishes (Fishman et al., 1985), amphibians (McLean et al., 1995; Liao et al., 1996), reptiles (Takeda et al., 1986) and birds (Wild, 1993; Fortin et al., 1994a), the ability of central networks to produce rhythmic motor behaviors linked to respiratory function is a remarkably conserved property of the brainstem reticular formation.

Features of the hindbrain primordial rhythmic activities are reminiscent of the primitive rhythmic motor control of respiration in lower vertebrates (Ballintijn, 1982; Milsom, 1991). The long duration (on the order of minute) of the period of rhythmic activity generated in the embryo (Fortin et al., 1994b, LF in Fig. 3) relates more to intermittent breathing found in lower vertebrates than to the continuous breathing pattern of mammals, birds and amphibians. At this point, it is interesting to note that at embryonic stage E13.5, the mouse hindbrain rhythmic activity show a maximum degree of similarity to that of chick, despite earlier and later differences (phenotypic stage in Fig. 3). Therefore, based on these observations in three distant tetrapods, we speculate that this episodic pattern constitutes a functional phylotypic stage of the development of brainstem neuronal network.

This network configuration may be required to generate intermittent rhythmic pattern (e.g. respiration) that can be used during adult life or not. Co-activation of activities recorded from different cranial nerves (Fortin et al., 1995) is in register with the motor control of the buccal cavity by trigeminal and hypoglossal nerves coactive with facial, glossopharyngeal and vagal control of the opercular cavity in lower vertebrates. The presence of ancestral functional traits in the primordial rhythmic network strengthens the view that it may stand as a scaffold upon which later complexity and diversity can be built.

In this respect, major respiratory muscles in mammals control thoracic and abdominal cavities while trigeminal or facial motoneurons have only accessory respiratory function. Therefore, reconfiguration of redundant rhythmogenic circuits present in the embryo appears to be mediated by a functional re-specification, a mechanism recently identified in invertebrates (Le Feuvre et al., 1999). The result of this scheme is a pattern brainstem organization by which the pontine respiratory group lies within territories deriving probably from r1 or the isthmus, the caudal pontine rhythm-promoting system deriving from r3 and r4 and the dorsal and ventral respiratory group from r6-r8 (Champagnat and Fortin, 1997). Further work is required to fully elucidate the mechanisms by which rhythm controlling properties are re-specified in the primordial network.

6. Conclusion

The evolution of neural networks of multi-segmental origin may be facilitated by the partitioning of the early hindbrain to a number of metameric units initially developing as independent modules (Lumsden, 1990; Clarke and Lumsden. 1993: Champagnat and Fortin, 1997). As a result, subsets of neurons may be developmentally isolated from each other and allowed to evolve independently. Our data suggest that Hox and other key developmental genes may provide a genetic basis for segment-specific modulation of neuronal development and connectivity. Changes in Hox cis-regulatory sequences and downstream targets have been suggested to underlie morphological changes of segmented structures in animal evolution (Gellon and McGinnis, 1998). Similarly, local changes in the regulation of Hox genes within the segmented hindbrain of vertebrates may open novel opportunities for the evolution of distinct subsets of neurons, without affecting the function of others, eventually resulting in novel functional features (Brunet and Ghysen, 1999).

Acknowledgements

This work was supported by a H.F.S.P. research grant 101/97. We wish to thank D. Katz for valuable discussions and comments on the manuscript. We thanks Dr Barsh for kind gift of *kreisler* oligonucleotides. Work in J.C.'s laboratory was supported by ACI BDPI # 57, European Community (QLRT-2000-01467 'Braistem Genetics'), Centre National de la Recherche Scientifique, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). E.D.T. was supported by European Community (BIO4-CT975-096) and FRM (EP001227/1) training grants.

References

- Abadie, V., Champagnat, J., Fortin, F., 2000. Branchiomotor activities in mouse embryo. Neuroreport 11 (1), 141-145.
- Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R., Wessendorf, M.W., 1995. δ-opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. J. Neurosci. 15, 1215–1235.
- Ballintijn, C.M., 1982. Evolution of central nervous control of ventilation in vertebrates. In: Taylor, E.W. (Ed.), The Neurobiology of the Cardiorespiratory System. Manchester University Press, Manchester, pp. 3–27.
- Bell, E., Wingate, R.J., Lumsden, A., 1999. Homeotic transformation of rhombomere identity after localized *Hoxb1* misexpression. Science 284 (5423), 2168–2171.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M., Champagnat, J., 1995. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. Physiol. Rev. 75, 1–45.
- Borday, V., Kato, F., Champagnat, J., 1997. A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. Neuroreport 8, 3679–3683.
- Brunet, J.F., Ghysen, A., 1999. Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. Bioessays 21 (4), 313–318.
- Carpenter, E.M., Goddard, J.M., Chisaka, O., Manley, N.R., Capecchi, M.R., 1993. Loss of *Hoxa1* (*Hox-1.6*) function results in the reorganization of the murine hindbrain. Development 118 (4), 1063–1075.
- Champagnat, J., Fortin, G., 1997. Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. Trends Neurosci. 20 (3), 119–124.
- Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Voiculescu, O., Charnay, P., Champagnat, J., 2002. Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutant mice. Eur. J. Neurosci. 15(4), 684–692.
- Clarke, J.D., Lumsden, A., 1993. Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. Development 118 (1), 151–162.
- Davenne, M., Maconochie, M.K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., Rijli, F.M., 1999. *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. Neuron 22 (4), 677–691.
- DeVries, J.I.P., Visser, G.H.A., Prechtl, H.F.R., 1982. The emergence of behavior. I. Qualitative aspects. Early Hum. Dev. 7, 301–322.
- Domínguez del Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F.M., Champagnat, J., 2001. Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. J. Neurosci. 21 (15), 5637–5642.
- Erickson, J.T., Conover, J.C., Borday, V., Champagnat, J., Katz, D.M., 1996. Mice lacking BDNF exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. J. Neurosci. 16, 5361–5371.

- Errchidi, S., Monteau, R., Hilaire, G., 1991. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. J. Physiol. 443, 477–498.
- Fishman, A.P., DeLaney, R.G., Laurent, P., 1985. Circulatory adaptation to bimodal respiration in the dipnoan lungfish. J. Appl. Physiol. 59 (2), 285–294.
- Fortin, G., Foutz, A.S., Champagnat, J., 1994a. Respiratory rhythm generation in chick hindbrain: effects of MK-801 and vagotomy. Neuroreport 5 (9), 1137–1140.
- Fortin, G., Champagnat, J., Lumsden, A., 1994b. Onset and maturation of branchiomotor activities in the chick hindbrain. Neuroreport 5 (9), 1149–1152.
- Fortin, G., Kato, F., Lumsden, A., Champagnat, J., 1995. Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. J. Physiol. 486 (3), 735–744.
- Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A., Champagnat, J., 1999. Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. Nat. Neurosci. 2 (10), 873–877.
- Fortin, G., del Toro, E.D., Abadie, V., Guimaraes, L., Foutz, A.S., Denavit-Saubie, M., Rouyer, F., Champagnat, J., 2000. Genetic and developmental models for the neural control of breathing in vertebrates. Respir. Physiol. 122 (2-3), 247–257.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., Rijli, F.M., 1997. Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. Development 124 (19), 3693–3702.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F.M., Krumlauf, R., Chambon, P., 1998. *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. Development 125 (6), 1123–1136.
- Gellon, G., McGinnis, W., 1998. Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of *Hox* expression patterns. Bioessays 20 (2), 116–125.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P., Gilardi-Hebenstreit, P., 2001. *Krox20* patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. Genes Dev. 15 (5), 567–580.
- Goddard, J.M., Rossel, M., Manley, N.R., Capecchi, M.R., 1996. Mice with targeted disruption of *Hoxb-1* fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. Development 122 (10), 3217–3228.
- Helmbacher, F., Pujades, C., Desmarquet, C., Frain, M., Rijli, F.M., Chambon, P., Charnay, P, 1998. *Hoxa1* and *Krox20* synergize to control the development of rhombomere 3. Development 125 (23), 4739–4748.
- Jacquin, T.D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P., Champagnat, J., 1996. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox20* knock-out mice. Neuron 17 (4), 747–758.
- Jansen, A.H., Chernick, V., 1983. Development of respiratory control. Physiol. Rev. 63, 437–483.
- Jungbluth, S., Bell, E., Lumsden, A., 1999. Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities

of individual Hox genes. Development 126 (12), 2751-2758.

- Le Feuvre, Y., Fenelon, V.S., Meyrand, P., 1999. Central inputs mask multiple adult neural networks within a single embryonic network. Nature 402 (6762), 660–664.
- Liao, G.S., Kubin, L., Galante, R.J., Fishman, A.P., Pack, A.I., 1996. Respiratory activity in the facial nucleus in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana Catesbeiana*. J. Physiol. 492 (2), 529–544.
- Lumsden, A., Keynes, R., 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. Nature 337, 424–428.
- Lumsden, A., 1990. The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. Trends Neurosci. 13, 329–335.
- Lumsden, A., Clarke, J.D.W., Keynes, R., Fraser, S., 1994. Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of chick embryo hindbrain. Development 120 (6), 1581–1589.
- Lumsden, A., Krumlauf, R., 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. Science 274, 1109–1115.
- Manzanares, M., Trainor, P.A., Nonchev, S., Ariza-Mc-Naughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C.T., Sham, M.H., Wilkinson, D.G., Krumlauf, R., 1999. The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. Dev. Biol. 211 (2), 220– 237.
- Mark, M., Lufkin, T., Vonesh, J.L., Ruberte, E., Olivo, J.C., Dollé, P., Gorry, P., Lumsden, A., Chambon, P., 1993. Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. Development 119 (2), 319–338.
- McLean, H.A., Perry, S.F., Remmers, J.E., 1995. Two regions in the isolated brainstem of the frog that modulate respiratory-related activity. J. Comp. Physiol. A 177 (2), 135–144.
- Mellitzer, G., Xu, Q., Wilkinson, D.G., 1999. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling an communication. Nature 400 (6739), 77–80.
- Milsom, W.K., 1991. Intermittent breathing in vertebrates. Annu. Rev. Physiol. 53, 87–105.
- Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Maruthainar, K., Kuroiwas, A., Brenner, S., Charnay, P., Krumlauf, R., 1996. The conserved role of *Krox20* in directing *Hox* gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93 (18), 9339–9345.
- Rijli, F.M., Gavalas, A., Chambon, P., 1998. Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the *Hox* selector genes. Int. J. Dev. Biol. 42 (3), 393–401.
- Rossel, M., Capecchi, M.R., 1999. Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. Development 126 (22), 5027–5040.
- Rovainen, C.M., 1996. Feeding and breathing in lampreys. Brain Behav. Evol. 48 (5), 297–305.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C.,

Charnay, P., 1993. Disruption of *Krox20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. Cell 75 (6), 1199–1214.

- Sham, M.H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R.D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P., Krumlauf, R., 1993. The zinc finger gene *Krox20* regulates *Hoxb-2* (*Hox 2.8*) during hindbrain segmentation. Cell 72 (2), 183–196.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., Krumlauf, R., 1996. Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking *Hoxb-1*. Nature 384 (6610), 630–634.

Swiatek, P.J., Gridley, T., 1993. Perinatal lethality and defects

in hindbrain development in $Krox20^{-}/{}^{-}$ mice for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. Genes Dev. 7 (11), 2071–2084.

- Takeda, R., Remmers, J.E., Baker, J.P., Farber, J.P., 1986. Postsynaptic potentials of bulbar respiratory neurons of the turtle. Respir. Physiol. 64, 149–160.
- Wild, J.M., 1993. The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. Brain Res. 606 (2), 319–324.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., Charnay, P., 1989. Segment-specific expression of a zinc finger gene in the developing nervous system of the mouse. Nature 337 (6206), 461–464.

Chapitre 4

Exemple de compensation fonctionnelle de troubles du développement indépendants de la segmentation embryonnaire.

Les souris invalidées pour le gène de l'acétylcholine estérase, une approche transgénique d'un système neurotransmetteur vital pour le rythme respiratoire.

Collaboration : A. Chatonnet, INRA, Montpellier ; S. Daulon, L. Taysse, Centre d'études du Bouchet, Vert-le-petit.

La seconde stratégie utilisée consiste à observer des mutations de gènes qui vont intervenir plus tardivement au cours du développement, donc qui ont plus de chances d'être compensées. Nous avons choisi un système neuromédiateur connu pour son rôle vital dans le contrôle de la respiration : son blocage par administration d'agents pharmacologiques induit une respiration apnéique létale. L'acétylcholine participe à la fonction ventilatoire, non seulement au niveau de la jonction neuromusculaire au niveau des muscles respiratoires (intercostaux, diaphragme, abdominaux), mais aussi en tant que neuromodulateur de l'activité du générateur central du rythme respiratoire. Afin de déterminer si un excès permanent d'acétylcholine pouvait avoir des conséquences sur le développement et l'activité respiratoire à la naissance, nous avons réalisé une étude du comportement respiratoire de souris invalidées pour le gène de l'acétylcholine estérase (AChE). Des études précédentes montrent que les animaux homozygotes $AChE^{-/-}$ sont viables à condition de leur faire suivre un régime spécial et qu'ils survivent jusqu'à l'âge adulte.

Au cours des expériences de pléthysmographie *in vivo* menées chez des animaux adultes et nouveau-nés, nous avons observé que l'injection sous-cutanée d'un inhibiteur de la butyrylcholine estérase (BChE), le bambutérol, était suivie de la mort des animaux $AChE^{+/-}$ par arrêt respiratoire, alors que ce produit n'avait aucun effet sur les congénères $AChE^{+/-}$ et sauvages. Lorsque les troncs cérébraux de nouveau-nés ont été prélevés au moment où les animaux mutants meurent, une activité respiratoire est enregistrée *in vitro* aussi bien sur les troncs cérébraux provenant d'animaux sauvages, hétérozygotes qu'homozygotes. De plus, ces activités respiratoires *in vitro* sont insensibles à deux inhibiteurs de BChE, le bambutérol et l'iso-OMPA. L'action du bambutérol injecté semble donc dirigée contre des cibles périphériques et non contre le générateur central du rythme respiratoire (cf. publication 4).

Par ailleurs, les agonistes cholinergiques que sont la nicotine et la muscarine, appliqués lors de l'enregistrement électrophysiologique des activités respiratoires de troncs cérébraux isolés, produisent chez les animaux sauvages et $AChE^{+/-}$ une augmentation de la fréquence, ainsi que l'apparition d'un décharge tonique qui s'atténue rapidement au cours de l'application des produits. En revanche, les tronc cérébraux issus d'animaux $AChE^{-/-}$ présentent ces caractéristiques de façon très atténuée : l'augmentation de la fréquence des décharges inspiratoires est très faible et l'activité tonique est quasiment invisible lors des applications de nicotine ou de muscarine (cf. publication 4).

La réponse à l'excès permanent d'acétylcholine induite par l'invalidation de l'AChE consiste donc en une régulation négative des récepteurs muscariniques et nicotiniques au niveau des neurones centraux du réseau respiratoire. De plus, le rôle de la BChE au niveau de la jonction neuromusculaire devient crucial pour la survie des animaux.

Depuis quelques années, les systèmes et voies moléculaires de synthèse et de diffusion des neurotransmetteurs ou neuromodulateurs sont connus pour jouer un rôle important au cours du développement embryonnaire, en particulier lors de l'organogenèse du système nerveux et de l'établissement des connexions synaptiques. Nous montrons ici que dans le cas de l'acétylcholine, une anomalie du fonctionnement synaptique pendant tout le développement n'altère pas de façon dramatique le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire, mais qu'au contraire, elle est compensée. Il n'en est pas de même si, au contraire, un agent qui contrôle l'expression des gènes Hox, l'acide rétinoïque, est administré en très faible dose à un stade précis du développement.

Publication 4

Chatonnnet F., Boudinot E., Chatonnet A., Daulon S., Taysse L. and Foutz A.S. (2003). Survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mice. Eur. J. Neurosci., sous presse.

Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse

Fabrice Chatonnet,¹ Éliane Boudinot,¹ Arnaud Chatonnet,² Laurent Taysse,³ Sébastien Daulon,³ Jean Champagnat¹ and Arthur S. Foutz¹

¹Neurobiologie Génétique et Intégrative UPR2216, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2218, C.N.R.S., 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

²Département de Physiologie Animale, I.N.R.A., Montpellier, France

³Centre d'Etudes du Bouchet, Vert-le-Petit, France

Keywords: acetylcholine, bambuterol, butyrylcholinesterase, respiration

Abstract

Cholinergic neurotransmission ensures muscle contraction and plays a role in the regulation of respiratory pattern in the brainstem. Inactivation of acetylcholinesterase (AChE) by organophosphates produces respiratory failure but AChE knockout mice survive to adulthood. Respiratory adaptation mechanisms which ensure survival of these mice were examined *in vivo* by whole body plethysmography and *in vitro* in the neonatal isolated brainstem preparation. AChE^{-/-} mice presented no AChE activity but unaffected butyrylcholinesterase (BChE) activity. *In vivo*, bambuterol (50–500 μ g/kg s.c.) decreased BChE activity peripherally but not in brain tissue and induced apnea and death in adult and neonate AChE^{-/-} mice without affecting littermate AChE^{+/+} and ^{+/-} animals. *In vitro*, bath-applied bambuterol (1–100 μ M) and tetraisopropylpyrophosphoramide (10–100 μ M) decreased BChE activity in the brainstem but did not perturb central respiratory activity recorded from spinal nerve rootlets. *In vitro*, the cholinergic agonists muscarine (50–100 μ M) and nicotine (0.5–10 μ M) induced tonic activity in respiratory motoneurons and increased the frequency of inspiratory bursts in AChE^{+/+} and ^{+/-} animals. These effects were greatly attenuated in AChE^{-/-} animals. The results suggest that, in mice lacking AChE, (i) BChE becomes essential for survival peripherally but plays no critical role in central respiratory-related neurons and motoneurons to muscarinic and nicotinic agonists.

Introduction

Acetylcholine (ACh) mediates neurotransmission at the neuromuscular junction and contraction of respiratory muscles. A large body of literature indicates that it is also involved in central respiratory control (reviewed in Bianchi et al., 1995; Haji et al., 2000) including central chemosensitivity (Gillis et al., 1988; Nattie & Li, 1990; reviewed in Burton & Kazemi, 2000). The level of ACh at the synaptic cleft and neuromuscular junction is regulated by the enzyme acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) which rapidly hydrolyses ACh into choline and acetate. It has long been known that blockade of AChE by organophosphorus compounds, such as insecticides and chemical warfare agents, produces rapid death by respiratory failure (reviewed in Brimblecombe, 1981). Surprisingly, it was found that despite the absence of AChE activity in all tissues, AChE^{-/-} mice develop to term in utero. They survive after birth and have normal cholinergic pathways (Mesulam et al., 2002), although they present a phenotype comprising many symptoms of a cholinergic syndrome, such as permanent muscle tremors (Xie et al., 2000; Duysen et al., 2002). Quite unexpectedly, nullizygous animals show no sign of hypoventilation but, on the contrary, they display an increased minute-ventilation compared with their wild-type littermates from the first days of

Received 19 May 2003, revised 2 July 2003, accepted 3 July 2003

postnatal life to mature adulthood (Emery *et al.*, 2001), a possible consequence of increased metabolic needs (Duysen *et al.*, 2002).

Mechanisms through which respiratory failure is prevented in $AChE^{-/-}$ mice are unknown. Adaptation to the loss of a key enzyme like AChE might involve substitution by another enzyme, a common compensation mechanism in biology (Mashimo & Goyal, 1999), and/ or adaptation to the excess ACh resulting from the missing enzyme. In the present study we, therefore, investigated respiratory adaptation mechanisms through which nullizygous mice survive in the absence of AChE. To distinguish whether the adaptation processes occur in brainstem rhythm-generating structures or peripherally (probably at the diaphragmatic neuromuscular junction), we used a combined in vivolin vitro approach. The survival of AChE knockout mice is dependent on an enzyme classically regarded as physiologically irrelevant, butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), because pharmacological blockade of this enzyme by bambuterol [1-(3,5-bis-(N,Ndimethylcarbamyloxy)-phenyl)-2-t-butylaminoethanol hydrochloride] kills the nullizygous animals but not their wild-type and heterozygous littermates (Xie et al., 2000). Therefore, in vivo, we compared the effects produced on ventilation by selective pharmacological inactivation of BChE in the three genotypes, nullizygous, heterozygous and wild-type animals. We then isolated in vitro the brainstem of neonatal mice which in vivo ceased breathing (AChE^{-/-} mice) or were unaffected following bambuterol administration (AChE^{+/+} or ^{+/-} mice). In the isolated brainstem preparation we recorded the response of the centrally generated respiratory rhythm to application of BChE

Correspondence: Dr Arthur S. Foutz, as above. E-mail: foutz@iaf.cnrs-gif.fr

inhibitors and cholinergic agonists. The experiments revealed a distinct central adaptation mechanism independent of BChE activity, which results from a down-regulated response to cholinergic agonists.

Materials and methods

Mice

Animal studies were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and European Union and French Government animal protection laws. An AChE knockout mouse colony (Xie et al., 2000) was maintained under standard conditions (constant temperature of 24 °C with a 12:12 daylight cycle) in the transgenic mouse facility of the Gif-sur-Yvette campus by breeding heterozygous males and females. Original founders were kindly provided by Prof O. Lockridge (Eppley Institute, Omaha, NB, USA) and were maintained in a 129SVJ strain background. Mice of either sex were used between postnatal days 0 and 3 for both in vivo and in vitro experiments and between 1 and 5 months of age for in vivo studies. Nullizygous mice have trouble eating solid food and, without special care, do not survive past the weaning period. Feeding the nursing dams and the weaned pups with enriched liquid food (ENSURE; Abbott Laboratories) or, in the present study, with Renutryl 500 (Nestlé Clinical Nutrition, Sèvres, France) allows some animals to survive to 6 months. The mouse phenotype and nursing protocol are detailed in Duysen et al. (2002).

Genotype analysis

All mice used in the experiments were genotyped by polymerase chain reaction. Primers for wild-type AChE were 21mer sense (5'AATGAC-ACCGAGCTGATAGCC) and 22mer antisense (5'CCAGTATTG-ATGAGAGCCTCCG), both located within exon 2 of the AChE gene. Primers for the AChE knockout allele were in the NEO gene, 25mer sense (5'AATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCG) and 25mer antisense (5'AACAGACAATCGGCTGCTCTGATGC).

In vivo measurement of ventilation

Ventilatory activity in neonate and adult mice was monitored using a barometric method (Bartlett & Tenney, 1970). The plethysmograph chamber (15-700 mL, depending on animal size), equipped with a temperature sensor, was connected to a reference chamber of the same volume. The pressure difference between the two chambers was measured with a differential pressure transducer (Validyne, DP-103-10) connected to a sine wave carrier demodulator (Validyne, CD15). The spirogram was stored on a PC (Chatonnet et al., 2002). Calibrations were made during each recording session by injecting 5-100 µL of air into the experimental chamber with a Hamilton syringe. Each animal was placed in the chamber, maintained at 28-30 °C (with neonates) and 27-28 °C (with adult animals) and hermetically sealed during 2-3 min recording sessions. Between sessions the chamber was flushed with fresh humidified air. Chamber and animal temperatures were measured by means of a dual channel thermocouple thermometer (Bat 10, Physitemp). In neonates, oral temperature was measured before and after each recording by means of a small probe. Based on dual measurements in week-old animals, we estimated the internal temperature to be 0.6 °C above oral temperature. In the plethysmograph chamber, adult animals were partially restrained by the tail with the flexible temperature probe permanently inserted in the rectum. The animal was placed in a small rectangular house opened at both ends which allowed body repositioning but discouraged turning around to chew on the probe. In each record, we analysed the periods of breathing recorded in the absence of limb, body and head movements. A computer-assisted method (ACQUIS1 software; BioLogic, Claix, France) was used to measure the duration of inspiration and expiration,

ventilatory frequency and tidal volume. Mean values were calculated from 10 to 100 breaths (depending on frequency) collected within at least 15 s. Control baseline ventilation was always measured prior to drug administration.

In vitro perfused brainstem

To dissociate possible compensatory mechanisms at the diaphragmatic neuromuscular junction from those of central origin, we also observed respiratory activity generated in the neonate mouse brainstem preparation isolated in vitro. The brainstem-spinal cord preparations were isolated from 0- to 3-day-old cold-anaesthetized mice using standard procedures (Ballanyi et al., 1999). To isolate the brainstem-spinal cord, the rostral section was made at the level of the inferior cerebellar arteries to isolate the medullary respiratory generator from its pontine afferences and from the cerebellum (pontobulbar section). The caudal section was made at the low cervical level. The preparations were placed for electrophysiological recordings with the ventral surface upwards in a 2-mL chamber and bathed in a Ringer solution. The Ringer solution had the following composition (mM): KCl, 8.0; NaCl, 128; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 24; D-glucose, 30; CaCl₂, 1.5, equilibrated with 5% CO₂, 95% O₂ at 26 $^{\circ}$ C, pH 7.4, and perfused at a rate of 1 mL/ min. Respiratory motor activity was recorded from C1-C2 spinal rootlets by means of a suction electrode. Amplified signals (Grass P511 amplifier) were filtered (3 Hz-3 kHz) and stored on a PC using a Labmaster interface at a sampling frequency of 1 kHz. Smooth integration was performed from a full wave rectified signal with a 40-ms time constant. Cranial and spinal respiratory motor nerves of neonatal rodents normally show no activity between inspiratory bursts (Ballanyi et al., 1999). Cholinergic agonists induce a permanent, tonic discharge activity which fills up the normally silent 'expiratory' phase between inspiratory bursts. Tonic activity was measured as the amplitude between baseline of the integrated trace (continued by a dashed line in Figs 4 and 5) and the emergence of the inspiratory bursts above this activity. It was expressed as a percentage of the average amplitude of inspiratory burst discharges recorded just before drug application.

Enzyme activity assays

For cholinesterase assays, we froze whole brains, forebrains (after dissection from the brainstem), brainstems (at the end of the perfusion session with or without bath application of drugs) and hindlimb muscles. Samples were stored at -80 °C. To determine the relative efficacy of bambuterol in inhibiting BChE in blood and brain, adult heterozygous mice were killed by cervical dislocation 13 min after saline or bambuterol injection, blood was drawn by cardiac puncture and the brain was immediately removed.

Nervous or muscle tissue was weighed and homogenized in 20 volumes of ice-cooled 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8) with 1 M NaCl and 1% Triton X-100 using a homogenizer (Ultra turrax; Ika Werk). The AChE activity was measured by the method of Ellman *et al.* (1961) at 37 °C in a temperature-controlled spectrophotometer (Beckman Instruments). Samples were preincubated with 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) in 0.1 M phosphate buffer, pH7, to react free sulfhydryl groups before the addition of substrate. Specific BChE activity was assayed with 1 mM butyrylthiocholine. Total cholinesterase activity was assayed with 1 mM acetylthiocholine and is presented in the Results as AChE activity, because BChE contribution to total activity was negligible (see Table 1). The enzymatic activities were expressed in international units/L.

Drugs

Tetraisopropylpyrophosphoramide (iso-OMPA), (+)-muscarine chloride and (-)-nicotine hydrogen tartrate were purchased from

TABLE 1. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity in the brains of adult and neonate mice untreated (-) or treated (+) with bambuterol *in vivo* and/or with tetraisopropylpyrophosphoramide (iso-OMPA) *in vitro*

	Group				Activity	
	Genotype	In vivo treatment	In vitro treatment	(<i>n</i>)	AChE (IU/L)	BChE (IU/L)
Adults						
Whole brain	+/+	_	NA	(11)	12.22 ± 0.60	0.472 ± 0.019
	+/-	_	NA	(6)	7.55 ± 0.25	0.409 ± 0.049
	/	_	NA	(1)	0.61	0.380
	/	+	NA	(2)	0.40 ± 0.05	0.409 ± 0.080
Neonates						
Forebrain	+/-	_	NA	(7)	1.24 ± 0.06	0.288 ± 0.092
	+/-	+	NA	(4)	1.14 ± 0.14	0.329 ± 0.106
	/	_	NA	(5)	0.22 ± 0.05	0.227 ± 0.023
	/	+	NA	(2)	0.17 ± 0.02	0.307 ± 0.155
Muscle	+/-	<u> </u>	NA	(7)	1.01 ± 0.06	0.390 ± 0.03
	+/-	+	NA	(3)	1.00 ± 0.13	0.301 ± 0.11
Perfused brainstem	+/-	<u> </u>	_	(7)	3.80 ± 0.30	0.381 ± 0.056
	+/-	+	_	(3)	3.40 ± 0.33	0.217 ± 0.037
	+/-	+	+	(2)	2.15 ± 0.24	0.051 ± 0.002
	/	_	_	(5)	0.24 ± 0.04	0.238 ± 0.053
	/	+	_	(2)	0.19 ± 0.06	0.334 ± 0.251
	/	+	+	(3)	0.13 ± 0.10	0.040 ± 0.010

NA, not applicable; IU, international units. Doses of bambuterol for *in vivo* treatment were $50 \mu g/kg$ in adults and 0.5 mg/kg in neonates. In the latter, cholinesterases were assayed in the forebrain and hindlimb muscle at the time of separation from the brainstem (12 min after injection of saline or bambuterol or at the time of death in nullizygotes). Brainstems were subjected to either no treatment, *in vivo* treatment alone (assays after 30–150 min perfusion) or *in vivo* followed by *in vitro* treatment and assayed at the end of perfusion time. Note the profound decrease of BChE activity after *in vitro* treatment with iso-OMPA.

Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Bambuterol was a generous gift from AstraZeneca (Rueil-Malmaison, France).

Data analysis

The results are expressed as means \pm SEM. *In vivo* data were analysed using a two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), the factors of variation being genotype and treatment, followed by Bon-ferroni-Dunn posthoc tests. *In vitro* data were analysed using paired and unpaired *t*-tests (Mann–Whitney *U*-test for tonic activity with large variability). The significance level was set at *P* < 0.05. Biochemical data were not suited for statistical analysis because sample numbers in each condition were usually too small. Conclusions were based on consistency of results over different but similar conditions. For example, bambuterol administered *in vivo* was expected to affect BChE activity in a similar fashion in heterozygous and nullizygous animals and in forebrain and brainstem structures. The responses to cholinergic agonists of wild-type animals that were tested were not consistently different from the responses of heterozygotes. Thus, the two groups were pooled together.

Results

Bambuterol in vivo did not affect central butyrylcholinesterase activity

In line with previous findings (Xie *et al.*, 2000; Duysen *et al.*, 2001), whole brain levels of BChE activity in adult mice were not dependent on genotype and AChE activity in heterozygous mice was reduced to 62% of the level found in wild-type mice whereas, in nullizygous animals, the detected activity was extremely low and corresponded to BChE activity (Table 1). In 0–3-day-old heterozygous mice, AChE activity was three times higher in the brainstem, a region rich in cholinergic nuclei, than in the forebrain but BChE activity was not different in the two regions, although there was larger interindividual variation than with AChE. Following bambuterol administration *in vivo*, levels of BChE activity in the forebrains of nullizygous animals at the time of death, or of heterozygous animals killed at similar times,

were not decreased compared with levels found in untreated animals. In peripheral (hindlimb) muscles, bambuterol decreased BChE levels by 23% in heterozygous animals (Table 1) and by the same proportion in nullizygous animals (two of seven were treated). In two different litters where one animal was treated and one to two others of the same genotype were not, BChE activity was 29–44% lower in the treated animals. In adult heterozygous animals, bambuterol profoundly decreased BChE activity in the plasma while not affecting activity in the brains of the same animals (Table 2).

The activity of BChE in the brainstem, after 30–150 min perfusion in bambuterol-free medium *in vitro*, was not consistently affected by prior administration of bambuterol *in vivo*. Thus, the overall picture is that, at the dosage used, there was no significant brain penetration of the drug. However, bath application of iso-OMPA (10 and 100 μ M successive applications) or bambuterol alone significantly reduced BChE activity in the isolated brainstem by at least 80% (Table 1).

Respiratory failure following peripheral blockade of butyrylcholinesterase in adult and neonate nullizygous mice in vivo

Adult mice

We determined the lowest lethal dose of bambuterol in adult mice. All nullizygous adult mice survived a dose of $25 \,\mu$ g/kg s.c. (n = 4). However, tidal volume decreased by one-half (compared with the

TABLE 2.	Plasma	and	brain	butyrylcholi	nesterase	(BChE)	activity in	adult
heterozyg	ous anir	nals	after	bambuterol a	administra	ation		

	Bambuterol		
	$\frac{0 \text{ mg/kg}}{(n=5)}$	0.05 mg/kg (<i>n</i> = 2)	$\begin{array}{c} 0.5 \text{mg/kg} \\ (n = 5) \end{array}$
BChE plasma BChE brain	$\begin{array}{c} 3102 \pm 317 \\ 0.50 \pm 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 183 \pm 5 \\ 0.54 \pm 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{c} 62\pm 3\\ 0.46\pm 0.01\end{array}$

Note the profound decrease of BChE activity in the plasma but not in the brain.

1422 F. Chatonnet et al.

same animals receiving saline on a previous day) between 40 and 90 min after injection, with no change of respiratory frequency. A larger, albeit still low, dose of 50 µg/kg, which has no effect in adult wild-type mice, was lethal in nullizygous mice (at 15-23 min). This is suggestive of a steep dose-response as with organophosphate anticholinesterases. Terminal apnea was preceded by a decrease of tidal volume without change of respiratory frequency (Fig. 1, middle traces). When the mouse inhaled 100% oxygen, the initial decrease of tidal volume was followed by a profound change of breathing pattern consisting of low frequency, ample breaths (Fig. 1, lower traces) as seen in neonates after bambuterol (see below). Brain BChE activity was not reduced in these animals (Table 1). The toxic effect of bambuterol was specific to nullizygous animals. Although the 50 µg/ kg dose of bambuterol decreases plasma BChE by 94% but not brain BChE in heterozygous animals (Table 2), a large increase of dosage (1.0 mg/kg, n = 5 and 5 mg/kg, n = 3) caused no lethality in heterozygous animals.

Neonate mice

For screening purposes prior to in vitro recording, we administered to neonate mice a dose of bambuterol (0.5 mg/kg s.c.) which killed all nullizygotes within 5-12 min but had no visible effect during a 1-h observation on littermates later genotyped as wild-type or heterozygous. Plethysmographic recordings revealed a phase of disorganized, laboured breathing followed by a dramatic change of respiratory pattern with a progressively decreasing breathing frequency and characteristic respiratory movements presenting as expiratory-inspiratory efforts (Fig. 2A) resembling 'type 1' gasps induced by anoxia (Gozal et al., 1998). The extreme slowing of breathing was accompanied by a bluish colouring of the normally pink skin, revealing asphyxia. Upon cessation of breathing movements the animals were cold-anaesthetized and dissected for in vitro recording of the isolated brainstem. No significant difference was observed between breathing patterns of wild-type and heterozygous animals at a time (10-12 min) when all nullizygous animals were dead or dying (Fig. 2B). The 0.5 mg/kg dose of bambuterol did not affect BChE activity in the forebrains and brainstems of the animals (compared with untreated



FIG. 1. Effect of butyrylcholinesterase inactivation in adult mice *in vivo*. Plethysmographic recordings of adult mice under control conditions (air or 100% O₂) and after injection of bambuterol (50 μ g/kg, s.c.). Note the ineffectiveness of bambuterol in the wild-type mouse breathing air (upper trace) and the profound decrease of tidal volume in AChE^{-/-} mice (middle trace). In the animal breathing O₂ (lower trace), the final apnea was preceded by a respiratory pattern resembling that observed in bambuterol-treated newborn nullizygous mice (Fig. 2A). Calibration bar, 250 µL. Inspiration: upward deflections.



FIG. 2. Bambuterol-induced apnea in vivo and in vitro respiratory recovery in neonatal mice. (A) Left: in vivo respiratory recordings of both wild-type and AChE⁻ newborn littermates in control and after injection of bambuterol (0.5 mg/kg, s.c.). Note the apnea in the AChE^{-/-} mouse. Right: integrated respiratory bursting activity recorded in vitro from the C2 motor rootlets in the brainstems of the same mice, isolated immediately after apnea in the nullizygous animal and 12 min after bambuterol injection in the wild-type. Note the recovery of a rhythmic activity in the $AChE^{-i}$ brainstem similar to the activity recorded in the wild-type. Calibration bar, 100 µL. Inspiration: upward deflections. (B) Bar graphs showing *in vivo* changes in respiratory frequency $(f_{\rm B})$ and tidal volume (V_T) after bambuterol injection in wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and nullizygous (-/-) newborn mice. Measures made during the 2 min preceding death in -/- mice and at 10-12 min postinjection in the others are expressed as percentage of f_R and V_T before injection. Note the similarity of +/ + and +/- animals and the dramatically reduced f_R and increased V_T in -/mice (gasping pattern). *** P < 0.001 vs. +/+ and +/-. Number of animals is indicated in the graphs.

animals, Table 1) but slightly decreased activity in peripheral muscles. In adults, it decreased BChE activity by 98% in plasma with no significant effect in brain.

Butyrylcholinesterase inactivation does not affect respiration in the isolated brainstem preparation

When, after the occurrence of apnea *in vivo*, the brainstem of bambuterol-treated nullizygous animals was isolated *in vitro*, a regular respiratory bursting activity could be recorded from the spinal nerves (Fig. 2A, right traces). Basal respiratory burst frequency was not significantly different between wild-type animals $(4.84 \pm 0.51$ bursts/min, n = 6), heterozygotes $(4.07 \pm 0.48$ bursts/min, n = 23) and nullizygotes $(5.06 \pm 0.37$ bursts/min, n = 20). No differences of basal burst frequencies were observed between animals which had been injected or not with bambuterol before dissection, which is not surprising as BChE was not inhibited in brains of bambuterol-treated animals (Table 1). In isolated brainstem preparations, neither bambuterol $(1-100 \,\mu\text{M})$ nor the irreversible BChE inhibitor iso-OMPA $(10-100 \,\mu\text{M})$ affected respiratory burst frequency in any genotype



FIG. 3. Effects of butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors in the isolated brainstem preparation. (A) Ineffectiveness of bambuterol applications (100 μ M) on integrated respiratory burst activity of +/- (upper trace) and -/- (lower trace) brainstems from littermate animals. (B) Ineffectiveness of tetraisopropylpyrophosphoramide (iso-OMPA) (10 and 100 μ M successive applications) on respiratory activity in a +/- brainstem (top trace) and a -/ - brainstem (bottom trace) from littermate animals. Left traces, predrug control; middle traces, end of 10 min iso-OMPA applications; right traces, wash 30 min after drug application. (C) Respiratory frequency at the end of bambuterol and iso-OMPA applications expressed as percentage of predrug control activity. Number of animals is indicated in the bar graphs. All animals in the dark bar graphs were heterozygotes except for the 1 μ M bambuterol (two +/ +, four +/-). The largest doses of iso-OMPA inhibited BChE by over 80%.

group of mice tested (Fig. 3), despite BChE inhibition exceeding 80% with $100 \,\mu$ M of iso-OMPA (Table 1). Bambuterol and iso-OMPA had no effect on inspiration time (burst duration) and burst amplitude in any group of mice (not shown).

Reduced effects of cholinergic agonists in the isolated brainstem of $AChE^{-/\!-}$ mice

Muscarine

In both wild-type and heterozygous brainstems, muscarine application (50 and 100 μ M) produced distinct dose-dependent effects. First to appear was a tonic activity which reached a maximal value 50–125 s after onset (Fig. 4A and C) and thereafter declined rapidly despite the



FIG. 4. Effects of muscarine on the isolated brainstem in vitro. (A) Effects of a 100-µM muscarine application on integrated respiratory bursting activity in wild-type (+/+, top traces) and nullizygous (-/-, bottom traces) brainstems from littermate animals recorded simultaneously in the same bath. Note the appearance of a rapidly desensitizing tonic activity (above the dashed line) and an increase in respiratory frequency in the wild-type brainstem, whereas in the nullizygous brainstem tonic activity was barely visible and frequency increase was small. Dashed line indicates the baseline, any point above this line is activity. Wash was 30 min after muscarine application. (B) Maximal changes of respiratory frequency over predrug control. With the 100 µM dose, frequency increase was $131 \pm 5\%$ (*n* = 11) for +/- animals and $130 \pm 11\%$ (*n* = 4) for +/ + animals. Wild-type (n = 2 and 4 for the two muscarine doses, respectively) were pooled with +/- mice. (C) Maximal tonic activity induced by muscarine, expressed as percentage of predrug inspiratory discharge amplitude. Note the considerably reduced effect in -/- mice. Number of animals in each experiment is indicated in white rectangles. Wild-type (from left to right, n = 1, 4) and heterozygous animals (n = 2, 15) were pooled. *, significant vs. predrug control; \swarrow , comparison between genotypes. $\swarrow P < 0.05$, **P < 0.01, $\checkmark \checkmark \checkmark P < 0.001$.

continued muscarine application. Respiratory frequency increased within 80–205 s of the onset of tonic activity (Fig. 4B), inspiratory burst duration increased (to $167 \pm 22\%$, n = 12, of predrug control with the largest dose of muscarine, P < 0.02) and burst amplitude decreased. These latter effects outlasted the end of muscarine application (Fig. 4A). Muscarine effects were all greatly reduced in nullizy-gous mice. Tonic activity was barely visible (Fig. 4A and C), increase of respiratory frequency was smaller than in the other genotypes (Fig. 4B), decrease of burst amplitude was also smaller (Fig. 4A) and no change occurred in burst duration (99.7 \pm 2.9% of predrug control, n = 10, with the highest dose of muscarine).

Nicotine

Nicotine $(0.5-10 \,\mu\text{M})$ produced the same types of dose-dependent effects observed with muscarine (Fig. 5). In wild-type and heterozy-gous mice there was first appearance of a tonic activity (Fig. 5A and C)



FIG. 5. Effects of nicotine on the isolated brainstem in vitro. (A) Effects of nicotine (10 µM) on integrated respiratory activity in wild-type (+/+, top traces) and nullizygous (-/-, bottom traces) brainstems from littermate animals recorded simultaneously in the same bath. As with muscarine, a rapidly desensitizing tonic activity appeared (above the dashed line) and respiratory frequency increased in the wild-type brainstem, whereas in the nullizygous brainstem no tonic was detectable and frequency increase was small. Wash was 30 min after nicotine application. (B) Maximal changes of respiratory frequency over predrug control. Number of animals in each experiment is indicated in the bar graphs. Wild-type (n = 1, 2 and 2 for the three nicotine doses, respectively)and heterozygous animals (n = 1, 6 and 4, respectively) were pooled. (C) Maximal tonic activity induced by nicotine, expressed as percentage of predrug inspiratory discharge amplitude. Note the considerably reduced effect in -/mice. Number of animals in each experiment is indicated in white rectangles. Wild-type (from left to right, n = 1, 2 and 3) and heterozygous animals (n = 2, 6and 3) were pooled. *, comparison vs. control; \leq_{n} , comparison between genotypes. \leq_{n} , *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

which reached a maximal value 45-135 s after onset and then rapidly desensitized despite continued drug application (Fig. 5A). Respiratory frequency increased within 60-200 s of the onset of tonic activity (Fig. 5B), burst duration increased (to $124 \pm 4.6\%$ of predrug control, n = 6, P < 0.01, with $10 \,\mu$ M nicotine) and burst amplitude decreased. Recovery of respiratory frequency and amplitude was not complete after 30 min of wash. Frequency was still higher than before drug application and burst amplitude remained lower (Fig. 5A). As with muscarine, AChE^{-/-} mice showed a very weak tonic activity (Fig. 5A and C), increase of respiratory frequency was smaller than in the other genotypes (Fig. 5B) and there were no significant effects on burst duration (99.4 \pm 0.9% of predrug control with 10 μ M nicotine, n = 3) and on burst amplitude.

Discussion

 $AChE^{-/-}$ mice present a phenotype with many characteristics resembling the cholinergic syndrome seen in wild-type animals poisoned with anticholinesterase agents, such as body tremors, muscle

weakness, susceptibility to seizures, pinpoint pupils and, when stressed, excessive salivation and lacrimation (Duysen *et al.*, 2002). However, the respiratory function, a major target of anticholinesterases, appears to have adapted. Here we show that BChE inactivation in nullizygous animals produces respiratory failure *in vivo* but does not affect rhythm generation in the isolated brainstem preparation and that a major adaptive mechanism for respiratory survival is a down-regulated response of respiratory-related neurons to cholinergic stimulation.

Inactivation of butyrylcholinesterase induces apnea in neonate and adult $AChE^{-/-}$ mice

The terbutaline carbamate prodrug bambuterol is a very potent inhibitor for BChE, with a selectivity ratio of about 10⁴ over AChE (Tunek & Svensson, 1988). Inactivation of BChE activity in vivo with low doses of bambuterol induced respiratory failure in nullizygous neonatal and adult mice without affecting heterozygous or wild-type littermates. This failure can be interpreted as a two-phase event. A first phase of decreased inspiration efforts and/or impaired movements induced asphyxia which, in turn, resulted in a gasping pattern of the central generator (Gozal et al., 1998). Terminal gasping typically presents as high amplitude inspiratory drives of progressively decreasing frequency and these gasp drives could have overcome any lowered response of the muscular endplate (tidal volume is increased 10-fold during maximal inspiratory effort). As neonate animals are more resistant to hypoxia than mature animals (Ballanyi et al., 1996; Mortola, 1999), it was necessary to provide oxygen to the adult animals to increase survival time up to the gasping phase.

Butyrylcholinesterase activity is not essential in the brainstem of $AChE^{-/-}$ mice

We showed that respiratory failure in $AChE^{-/-}$ animals did not result from a primary dysfunctioning of either the central respiratory generator or output motoneurons. Firstly, normal respiratory motor activity was generated in the brainstem of these animals when it was isolated in vitro at the time of apnea and inactivation of BChE by bathapplied bambuterol or iso-OMPA in isolated brainstem preparations (from animals treated or not with bambuterol in vivo) did not perturb the ongoing respiratory pattern recorded from spinal rootlets. Secondly, doses of bambuterol which induced respiratory failure in vivo did not alter brain levels of BChE activity despite a profound BChE inhibition in plasma, in line with the poor blood-brain barrier penetration of this drug (Svensson, 1991). Conversely, bath-applied BChE inhibitors decreased BChE activity in the brainstem preparation without affecting respiratory generation. Hence, BChE becomes endowed in $AChE^{-/-}$ mice with a crucial life-sustaining role at peripheral sites but remains unessential in central rhythm-generating structures as it is in wild-type and heterozygous animals. A probable target for bambuterol in vivo is the neuromuscular junction (Minic et al., 2003), although BChE may also play a role in other respiratory-related functions affected by AChE inhibition, such as airways muscle tone (Norel et al., 1993).

Butyrylcholinesterase activity in $AChE^{-/-}$ mice: carry-over function or separate role?

The present results do not support a role for BChE in the central mechanisms which generate respiration but show that it becomes crucial for respiratory movements in the absence of AChE. It was recently shown that the amount of BChE in the body is larger than previously thought (Li *et al.*, 2000), which reopens the debate about possible specific functions for this enzyme. However, in nervous tissue, BChE localization is not essentially synaptic, as with AChE,

but is more diffuse and appears to be mostly of glial origin (Mesulam et al., 2002). A number of findings argue against a carry-over function of AChE by BChE. (i) The present and previous reports (Li et al., 2000; Xie et al., 2000) did not detect an increased BChE activity in AChE^{-/-} mice compared with $^{+/+}$ and $^{+/-}$ animals. (ii) The cholinergic syndrome presented by AChE^{-/-} mice, despite their profoundly decreased response to cholinergic agonists, is indicative of excess ACh levels at the postsynaptic membrane and suggests that any carry-over function at this level is, at best, marginal. (iii) At the neuromuscular junction of wild-type and AChE nullizygous mice, BChE inactivation does not affect the duration of ACh action on postsynaptic receptors but decreases evoked transmitter release, which is suggestive of BChE involvement in a presynaptic modulatory step of the release process (Minic et al., 2003). A presynaptic site of action for BChE has also been shown in ColQ knockout mice (Krejci et al., 2002), in which neither AChE nor BChE are functionally anchored at the neuromuscular junction (Feng et al., 1999). Our observation of decreased tidal volume in adult mice after bambuterol treatment is in keeping with these results and supports the hypothesis that the lethal effect of BChE inhibition in AChE^{-/-} mice might result from decreased release of transmitter on the postsynaptic membrane that has been adapted to high levels of ACh by down-regulation of cholinergic receptors.

In nullizygous mice, BChE might also be essential during development because inactivation of the ACHE gene in the zebrafish, an animal which, unlike mammals, is devoid of BChE, generates severe defects and is lethal at an embryonic stage (Behra *et al.*, 2002). The suppression of the neuromuscular phenotype by a further knockout of the α subunit of the nicotinic receptor further shows that a regulated level of ACh on postsynaptic neurons is essential for normal neuromuscular development.

Reduced efficacy of cholinergic agonists

A striking phenotypic trait of nullizygous mice was the near ineffectiveness of muscarine and nicotine in eliciting a tonic discharge activity on respiratory motor nerves at doses which could literally 'drown' inspiratory bursts in the permanent discharge in $^{+/+}$ and $^{+/-}$ littermates, a situation which in vivo would clearly result in failure of ventilation. This induction of tonic activity is not surprising because a majority of respiratory neurons, notably motoneurons (Shao & Feldman, 2001), are excited by ACh or ACh agonists (Jordan & Spyer, 1981; Bradley & Lucy, 1983; Morin-Surun et al., 1984; Böhmer et al., 1989; Haji et al., 1996) and subjected to cholinergic modulation (Bellingham & Funk, 2000). A second, albeit less pronounced phenotypic trait, was a smaller effect of cholinergic agonists on respiratory frequency in nullizygous animals. These agonists can act directly on rhythm-generating neurons in the preBötzinger complex in the ventrolateral medulla to increase frequency (Shao & Feldman, 2000, 2001, 2002) but also on central rhythm-controlling chemosensitive structures (Monteau et al., 1990; see Burton & Kazemi, 2000; Haji et al., 2000). The slow time course of frequency acceleration and recovery, compared with tonic effects, was probably due to different penetration and washout times in surface or deeper structures in the brainstem because the same pattern was observed with muscarine and nicotine. Although, in our experimental conditions, we did not distinguish any significant difference in the response of wild-types and heterozygotes to cholinergic agonists, it is clear that there was a dramatic difference between heterozygotes and nullizygotes. This reduced efficacy of agonists suggests a down-regulation of cholinergic receptors. Such downregulation may also occur in other brain structures in AChE^{-/-} mice, as shown by various behavioural, pharmacological and binding studies (Li et al., 2003). There is also anatomical evidence for internalization

of m2 muscarinic receptors in AChE^{-/-} mice (Bernard *et al.*, 2003) as well as in normal animals treated with anticholinesterase (Liste *et al.*, 2002).

Patterns of rhythm acceleration and tonic activity in motoneurons are also produced by anticholinesterases in brainstem preparations (Monteau *et al.*, 1990) as well as in unanaesthetized animals (Foutz *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1990). In terms of ventilatory efficiency, it is clear that increase of breathing frequency opposes hypoventilation but tonic activity impedes efficient respiratory movements and is observed before respiratory failure in unanaesthetized animals subjected to anticholinesterase intoxication (Foutz *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1990). In AChE^{-/-} mice, the unresponsiveness of respiratory motoneurons to ACh agonists prevents appearance of the same types of effects described below that lead to respiratory failure during organophosphate intoxication *in vivo*.

Rapid respiratory recovery after cholinesterase inhibition: implications for toxicology

Our previous and the present results suggest that respiration recovers after combined AChE and BChE inhibition and that this process occurs rapidly. Most anticholinesterases indiscriminately inactivate AChE and BChE (Minic et al., 2003). It has long been known that these compounds produce respiratory arrest in anaesthetized animals by disruption of rhythm generation and blockade of neuromuscular transmission (De Candole et al., 1953; Wright, 1954). When animals were maintained alive by artificial ventilation, respiratory activity and neuromuscular transmission recovered within a few hours (Meeter & Wolthuis, 1968; Melchers & van der Laaken, 1991), a delay much too short to allow any significant de novo synthesis of the enzyme (Van Dongen et al., 1988). These observations of a rapid respiratory arrest but much slower recovery in anaesthetized animals are not relevant to human toxicology or conscious AChE-deficient mice because, in unanaesthetized animals, the initial ventilatory response to excess ACh (and the response of most brainstem respiratory neurons to ACh applied locally) is an excitation, which is reversed to inhibition by anaesthetics (Morin-Surun et al., 1984; Foutz et al., 1987, 1989). Unanaesthetized animals subjected to AChE inhibition present an initial increase of both rate and depth of respiration followed by a progressive disorganization of the phase relation between respiratory neurons activity and diaphragm contraction, which leads to chaotic activation of respiratory muscles and ultimate apnea and death (Chang et al., 1990). When the animal is kept alive by artificial ventilation, the erratic pattern of phrenic nerve discharge (spaced irregular bursts and tonic activities) rapidly reverses to a regular pattern compatible with life-sustaining ventilation, despite a near complete cholinesterase inhibition (Foutz et al., 1989). Tonic activity induced by ACh agonists in wild-type and heterozygous animals in vitro also subsides within minutes during a continued application, which shows that downregulation of cholinergic receptors on respiratory-related neurons can occur within this time frame. Hence, the present and previous in vivo results suggest that the damped responsiveness of AChE^{-/-} mice to ACh agonists is an adaptive process which probably occurred during embryonic or fetal life but can probably also occur to a large extent any time after birth in a matter of minutes.

Conclusion

Our results show that, in $AChE^{-/-}$ mice, BChE activity becomes essential peripherally but not in brainstem rhythm-generating structures. These results also support the conclusion that down-regulation of cholinergic receptors may be essential to rhythm generation and transmission in the absence of AChE and to recovery after organophosphate intoxication. Such down-regulation could be a general adaptive process both in mice knockout for AChE and in normal animals subjected to toxic exposure to anticholinesterases.

Acknowledgements

The authors thank Dr Oksana Lockridge for valuable comments on the first version of this manuscript, Dr Eduardo Domínguez del Toro, Dr Stefan Jungbluth and Dr I.S. Delamanche for their help with some experiments. This work was supported by DGA contract DSP/STTC 00/34/077, European contract QLG2/CT/2001-01467 and by C.N.R.S.

Abbreviations

ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase enzyme; BChE, butyrylcholinesterase enzyme; iso-OMPA, tetraisopropylpyrophosphoramide.

References

- Ballanyi, K., Völker, A. & Richter, D.W. (1996) Functional relevance of anaerobic metabolism in the isolated respiratory network of newborn rats. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **432**, 741–748.
- Ballanyi, K., Onimaru, H. & Homma, I. (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Progr. Neurobiol.*, 59, 583–634.
- Bartlett, D. Jr & Tenney, S.M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.*, 10, 384–395.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.-L., Biellmann, D., Chatonnet, A. & Strähle, U. (2002) Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neurosci.*, 5, 111–118.
- Bellingham, M.C. & Funk, G.D. (2000) Cholinergic modulation of respiratory brain-stem neurons and its function in sleep-wake state determination. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27, 132–137.
- Bernard, V., Brana, C., Liste, I., Lockridge, O. & Bloch, B. (2003) Dramatic depletion of cell surface m2 muscarinic receptor due to limited delivery from intracytoplasmic stores in neurons of acetylcholinesterase deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.*, 23, 121–133.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M. & Champagnat, J. (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.*, 75, 1–45.
- Böhmer, G., Schmid, K. & Baumann, M. (1989) Evidence for a respirationmodulated cholinergic action on the activity of medullary respiration-related neurons in the rabbit; an iontophoretic study. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **415**, 72–80.
- Bradley, P.B. & Lucy, A.P. (1983) Cholinoceptive properties of respiratory neurones in the rat medulla. *Neuropharmacology*, 22, 853–858.
- Brimblecombe, R.W. (1981) Drugs acting on cholinergic mechanisms and affecting respiration. In Widdicombe, J. (Ed.), *Respiratory Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, pp. 175–184.
- Burton, M.D. & Kazemi, H. (2000) Neurotransmitters in central respiratory control. *Respir. Physiol.*, **122**, 111–121.
- Chang, F.C.T., Foster, R.E., Beers, E.T., Rickett, D.L. & Filbert, M.G. (1990) Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **102**, 233–250.
- Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Voiculescu, O., Charnay, P. & Champagnat, J. (2002) Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutant mice. *Eur. J. Neurosci.*, 15, 684–692.
- De Candole, C.A., Douglas, W.W., Evans, C.L., Holmes, R., Spencer, K.E.V., Torrance, R.W. & Wilson, K.M. (1953) The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning. *Br. J. Pharmacol.*, 8, 466–475.
- Duysen, E.G., Li, B., Xie, W., Schopfer, L.M., Anderson, R.S., Broomfield, C.A. & Lockridge, O. (2001) Evidence for non-acetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent; supersensitivity of the acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. J. Pharmacol. Exp. Ther., 299, 542–550.
- Duysen, E.G., Stribley, J.A., Fry, D.L., Hindrichs, S.H. & Lockridge, O. (2002) Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. *Dev. Brain Res.*, 137, 43–54.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R.H. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.

- Emery, M.J., Boudinot, E., Chatonnet, F., Chatonnet, A., Lockridge, O., Escourrou, P., Champagnat, J., Naquet, R. & Foutz, A.S. (2001) Ventilation in newborn and adult mice knockout for acetylcholinesterase. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 27, 173.13.
- Feng, G., Krejci, E., Molgo, J., Cunningham, J.M., Massoulié, J. & Sanes, J.R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acteylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. J. Cell. Biol., 144, 1349–1360.
- Foutz, A.S., Boudinot, E. & Denavit-Saubié, M. (1987) Central respiratory depression induced by acetylcholinesterase inhibition: involvement of anaesthesia. *Eur. J. Pharmacol.*, **142**, 207–213.
- Foutz, A.S., Delamanche, I.S. & Denavit-Saubié, M. (1989) Persistence of central respiratory rhythmogenesis after maximal acetylcholinesterase inhibition in unanaesthetized cats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67, 162–166.
- Gillis, R., Walton, D., Quest, J., Namath, I., Hamosh, P. & Dretchen, K. (1988) Cardiorespiratory effects produced by activation of cholinergic muscarinic receptors on the ventral surface of the medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247, 765–773.
- Gozal, D., Torres, J.E., Gozal, E., Nuckton, T.J., Dixon, M.K., Gozal, Y.M. & Hornby, P.J. (1998) Nitric oxide modulates anoxia-induced gasping in the developing rat. *Biol. Neonate*, **73**, 264–274.
- Haji, A., Furuchui, S. & Takeda, R. (1996) Effects of iontophoretically applied acetylcholine on membrane potential and synaptic activity of bulbar respiratory neurones in decerebrate cats. *Neuropharmacology*, 35, 195–203.
- Haji, A., Takeda, R. & Okazaki, M. (2000) Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol. Ther.*, 86, 277–304.
- Jordan, D. & Spyer, K.M. (1981) Effects of acetylcholine on respiratory neurones in the nucleus ambiguus-retroambigualis complex of the cat. J. *Physiol. (Lond.)*, **320**, 103–111.
- Krejci, E., Minic, J. & Molgó, J. (2002) Acetylcholine hydrolysis at the mammalian skeletal neuromuscular junction: more than one enzyme. XIth Symposium on Cholinergic Mechanisms — Function and Dysfunction. St Moritz, Switzerland, May 5–9. L. Anglister et al., Jerusalem.
- Li, B., Stribley, J.A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L.M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinricks, S.H. & Lockridge, O. (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J. Neurochem., 75, 1320–1331.
- Li, B., Duysen, E.G., Volpicelli-Daley, L.A., Levay, A.I. & Lockridge, O. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 74, 977–986.
- Liste, I., Bernard, V. & Bloch, B. (2002) Acute and chronic acetylcholinesterase inhibition regulates *in vivo* the localization and abundance of muscarinic receptors m2 and m4 at the cell surface and in the cytoplasm of striatal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 20, 244–256.
- Mashimo, H. & Goyal, R.K. (1999) Lessons from genetically engineered animal models IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am. J. Physiol.*, 277 (*Gastrointest. Liver Physiol.*, 40), G745–G750.
- Meeter, E. & Wolthuis, O.L. (1968) The spontaneous recovery of respiration and neuromuscular transmission in the rat after an anticholinesterase poisoning. *Eur. J. Pharmacol.*, 2, 377–386.
- Melchers, B.P.C. & van der Laaken, A.L. (1991) On the mechanism of spontaneous recovery of neuromuscular transmission after acetylcholinesterase inhibition in the rat neuromuscular junction. *Brain Res.*, 563, 49–56.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G. & Lockridge, O. (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, **110**, 627–639.
- Minic, J., Chatonnet, A., Krejci, E. & Molgó, J. (2003) Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 177–187.
- Monteau, R., Morin, D. & Hilaire, G. (1990) Acetylcholine and central chemosensitivity: *in vitro* study in the newborn rat. *Respir. Physiol.*, 81, 241–253.
- Morin-Surun, M.-P., Champagnat, J., Denavit-Saubié, M. & Moyanova, S. (1984) The effects of acetylcholine on bulbar respiratory related neurones. Consequences of anaesthesia by pentobarbital. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.*, **325**, 205–208.
- Mortola, J.P. (1999) How newborn mammals cope with hypoxia. *Respir. Physiol.*, **116**, 95–103.
- Nattie, E.E. & Li, A. (1990) Ventral medulla sites of muscarinic receptor subtypes involved in cardiorespiratory control. J. Appl. Physiol., 69, 33–41.

- Norel, X., Angrisani, M., Labat, C., Gorenne, I., Dulmet, E., Rossi, F. & Brink, C. (1993) Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 914–919.
- Shao, X.M. & Feldman, J.L. (2000) Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in pre-Bötzinger complex inspiratory neurons. J. Neurophysiol., 83, 1243–1252.
- Shao, X.M. & Feldman, J.L. (2001) Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBötzinger complex. J. Neurophysiol., 85, 2461–2467.
- Shao, X.M. & Feldman, J.L. (2002) Pharmacology of nicotinic receptors in preBötzinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. J. *Neurophysiol.*, 88, 1851–1858.
- Svensson, L.-Å. (1991) Mechanism of action of bambuterol: a β-agonist prodrug with sustained lung affinity. In *New Drugs for Asthma Therapy*. Birkhäuser-Verlag, Basel, pp. 71–78.

- Tunek, A. & Svensson, L.-Å. (1988) Bambuterol, a carbamate ester prodrug of terbutaline, as inhibitor of cholinesterases in human blood. *Drug. Metab. Dispos.*, 16, 759–764.
- Van Dongen, C.J., Valkenburg, P.W. & Van Helden, H.P.M. (1988) Contribution of *de novo* synthesis of acetylcholinesterase to spontaneous recovery of neuromuscular transmission following soman intoxication. *Eur. J. Pharmacol.*, **149**, 381–384.
- Wright, P.G. (1954) An analysis of the central and peripheral components of respiratory failure produced by anticholinesterase poisoning in the rabbit. *J. Physiol. (Lond.)*, **126**, 52–70.
- Xie, W., Stribley, J., Chatonnet, A., Wilder, P.J., Rizzino, A., McComb, R.D., Taylor, P., Hinrichs, S.H. & Lockridge, O. (2000) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene targeted mice lacking acetylcholinesterase. J. Pharmacol. Exp. Ther., 293, 896–902.

Chapitre 5

Une approche pharmacologique de la segmentation du tronc cérébral : traitement des animaux par l'acide rétinoïque.

La troisième stratégie mise au point pour observer des modifications de la rythmogenèse respiratoire liées au développement du tronc cérébral consiste à injecter à des mères gestantes de l'acide rétinoïque, dont l'excès induit des altérations de la segmentation. En effet, au cours de la segmentation du rhombencéphale, l'expression spécifique des gènes dans certaines rhombomères, ainsi que la formation des frontières rhombomériques sont sous la dépendance d'un gradient dynamique d'acide rétinoïque (cf. introduction).

En raison des puissants effets tératogènes de l'acide rétinoïque, les doses utilisées ont été réduites d'un facteur 10 par rapport aux doses connues comme tératogènes. Nous avons traité 13 femelles gestantes avec des solutions diluées d'acide rétinoïque, administrant des doses finales de 0,5 mg/kg à 7,5 jours après l'accouplement, de 20 mg/kg au 7^e jour après l'accouplement ou des solutions sans acide rétinoïque (témoins). La survie est identique pour les trois groupes (cf. publication 5), en revanche, des femelles traitées avec 20 mk/kg à 7,5 jours après l'accouplement ne donnent pas naissance à des portées viables.

L'analyse anatomique des animaux traités par l'acide rétinoïque montre que ces individus possèdent des modifications au niveau du pont caudal, dans une région proche de la sortie du nerf facial. Ces défauts comprennent notamment une extension de la formation réticulée dérivée de r3/r4, située entre le noyau moteur trijumeau et le nerf facial, une disparition partielle des motoneurones du noyau abducens, un élargissement de la branche descendante du nerf facial, avec parfois une séparation en plusieurs faisceaux, et des anomalies au niveau de la partie antérieure du 4^e ventricule (cf. publication 5). Ces défauts affectent plus particulièrement la formation réticulée dérivée de r4, proche du noyau moteur facial, appelée par la suite région para-faciale.

L'étude pléthysmographique de ces animaux nouveau-nés *in vivo* montrent que les animaux ayant reçu de l'acide rétinoïque au cours de leur développement possèdent à la naissance un type de respiration anormal, appelé ventilation épisodique hyperpnéique (VEH). La VEH se caractérise par 5 à 8 cycles respiratoires, dont l'amplitude croît puis décroît graduellement. Entre ces épisodes, le volume minute des animaux traités est particulièrement bas. Les épisodes hyperpnéiques apparaissent et s'atténuent plus tôt dans le groupe 20 mg/kg, leur amplitude est aussi moindre que celle observée dans le groupe 0,5 mg/kg. Par ailleurs, les autres paramètres, tels que le poids à la naissance, la masse corporelle au cours du premier jour, les apnées à P0, la génération du rythme *in vitro* et la réponse des chémorécepteurs périphériques semblent normaux chez les animaux traités avec l'acide rétinoïque (cf. publication 5).

La VEH ressemble à des modes ventilatoires observés chez les enfants prématurés, en relation avec le poids à la naissance. Nous avons mis en évidence que le traitement avec l'acide rétinoïque retardait la maturation postnatale de la respiration : non seulement le volume inspiratoire reste faible et le Te est irrégulier plus longtemps, mais en plus, la relation entre le poids à la naissance et l'évolution du volume inspiratoire est modifiée. Un faible poids à la naissance, à nombre égal de nouveau-nés dans la portée, est signe d'un retard dans le développement. Nous avons ainsi observé que les animaux traités avec l'acide rétinoïque et présentant un faible poids à la naissance étaient incapables d'adapter leur volume inspiratoire à leur masse corporelle (cf. publication 5).

Enfin la préparation de tronc cérébral isolé *in vitro* a été utilisée pour détailler le fonctionnement du réseau respiratoire. La fréquence du rythme respiratoire est considérablement réduite dans le groupe 20 mg/kg. Elle est normale dans le groupe 0,5 mg/kg, qui montre par ailleurs une réponse anormale à l'injection d'AMPA dans la région para-faciale. Cette injection produit chez les animaux sauvages et traités une augmentation de l'activité respiratoire Pour les animaux traités, un phénomène supplémentaire, observé précédemment chez le mutant *Hoxa1*^{-/-} (Domínguez del Toro et al., 2001) et consistant en l'émission à haute fréquence de 10 à 20 bouffées suivies d'un silence, apparaît. Dans le groupe 20 mg/kg, cette réponse secondaire à l'AMPA est atténuée, en accord avec la diminution de la VEH observée *in vivo* dans ce groupe (cf. publication 5).

Ces résultats démontrent que les contrôles respiratoires internes au tronc cérébral sont modifiés chez les animaux traités par l'acide rétinoïque. L'analyse anatomique suggère que les modifications de la région para-faciale sont responsables d'un mode ventilatoire épisodique, observé à la fois in vivo et in vitro, semblable à la respiration dite « de Cheyne-Stokes », observée dans de nombreuses pathologies telles que le syndrome de Joubert. Ces résultats ont donc une implication clinique importante, l'observation de VEH chez des nourrissons devant conduire à l'examen minutieux de l'anatomie de la région para-faciale. Ces résultats montrent aussi qu'il ne semble pas y avoir de compensation fonctionnelle possible des troubles respiratoires d'origine segmentaire. À l'inverse du blocage de l'acétylcholine estérase, létal en aigu mais compensé au cours du développement, l'administration de faibles doses d'acide rétinoïque autorise la survie mais induit une phénotype respiratoire irréversible.

Publication 5

Guimarães L., Borday Birraux V., Domínguez del Toro E., Chatonnnet F., Monteiro L.S. and Champagnat J. (2003). Prenatal exposure to retinoic acid induces development of episodic breathing in newborn mice.

Prenatal Exposure to Retinoic Acid Induces

Development of Episodic Breathing in Newborn Mice

Laura Guimarães^{1,2}, Véronique Borday Birraux^{1,3}, Eduardo Domínguez del Toro^{1,4},

Fabrice Chatonnet¹, Luís S. Monteiro² and Jean Champagnat¹

¹Neurobiologie Génétique et Intégrative, UPR 2216, C.N.R.S., 1, av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

²Dept. Estudos de Populações, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Lg. Abel Salazar 2, 4009-003 Porto, Portugal.

³Present address: Population Génétique et Évolution, UPR 9034, C.N.R.S., 1, av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

⁴ Present address: Division de Neurociencias, Laboratorio Andaluz de Biologia, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla 41013, Spain.

Abbreviated title:	Rhythmoger	nesis after	retinoic a	icid treatment

Key words:Hindbrain, Rhombomeres, Respiration, Central pattern generators,
Cheyne-Stokes breathing, Joubert syndrome, Retinoic acid, Hox genes,

mouse

19 18 pages title: 91 characters abstract: 120 words whole manuscript: 4327 words 3 figures 1 table

Correspondence:	J. Champagnat, Institut Neurobiologie Alfred Fessard,
	C.N.R.S., UPR 2216 (bât. 33),
	91198, Gif-sur-Yvette, France
Phone:	33 (1) 69 82 34 06
Fax:	33 (1) 69 07 05 38
E-mail	Jean.Champagnat@iaf.cnrs-gif.fr

Abstract

Hyperpneic episodic breathing (HEB), a cyclic increase and decrease of respiratory amplitude interspersed with reduced breathing, has been widely reported in pre-term neonates, in patients with Joubert syndrome, and in adults (Cheyne-Stokes respiration) with congestive heart failure and brain-stem infarction. We provide here a mouse model of neonatal HEB associated with disrupted breathing/body weight relationship. We have used retinoic acid (RA) to alter *Hox* gene regulation of the respiratory neuronal network development at 7.5 days post-coitum. Because RA-response elements up-regulating *labial Hox* are the most sensitive sites at this stage of development, we reduced dosage by 1-2 orders of magnitude with respect to teratogenic doses. We produced viable neonates with rostral para-facial neuronal reorganizations, contributing probably to the HEB pattern.

Introduction

Segmentation, a general strategy by which developmental genes control the anteroposterior organization of the vertebrate neural tube, is crucial in the rhombencephalon for the establishment of rhythmic neuronal networks controlling the breathing behavior (Champagnat and Fortin, 1997; Fortin et al., 1999; Domínguez del Toro et al., 2001; Chatonnet et al., 2002a). Hindbrain segmentation (reviewed in Lumsden and Krumlauf, 1996) starts in mice embryos by 7-7.5 days post-coitum (dpc) through the segmentally restricted expression of transcription factors such as *Krox-20, kreisler/mafB* and *Hox* genes at the 3' ends of the *HoxA* and *HoxB* clusters. Thereafter, the hindbrain neural tube is transiently subdivided into a metameric series of rhombomeres (r) coincident with the domains defined by segmental gene expression. Primordial neuronal rhythm generators start activity in the segmented hindbrain (Champagnat and Fortin, 1997) and are organized in register with the rhombomeric pattern (Fortin et al., 1999), thereby providing the neurobiological substrate

upon which the fetal respiratory rhythmicity eventually develops at post-segmental stages (Abadie et al., 2000).

Hindbrain segmentation and segmental gene expression are regulated by retinoic acid (RA), constantly supplied over time from the paraxial mesoderm posterior to the hindbrain (reviewed by Maden et al., 2002). A dynamic temporal and spatial distribution of RA alongside the AP axis of the hindbrain, coupled with differential gene sensitivity to RA contributes to graded response to RA. For example, rostral Hox genes are more sensitive to RA so their induction require a lower RA concentration than posterior Hox genes. Thus, posterior rhombomeres, exposed to higher concentrations of RA during a longer period than anterior ones, express more posterior Hox genes. Similarly, posterior rhombomere boundaries are formed later than anterior ones under influence of a stronger and later RA signaling (Dupé and Lumsden, 2002; Gavalas, 2002; reviewed by Maden et al., 2002). At 7.5 dpc in mice, RAresponse elements controlling expression of anterior Hox genes in the rhombencephalon are the most sensitive sites to teratogenic RA administration (Morriss-Kay et al., 1991; Conlon et al., 1992; Marshall et al., 1992). Indeed, up-regulation of Hoxal, Hoxbl and Hoxb2 by RA administration has been described in the hindbrain of vertebrates such as chick (Gale et al., 1996; Dupé and Lumsden, 2001), zebrafish (Hill et al., 1995) and frog (Blumberg et al., 1996) embryos. However, nothing is known on potential pharmacological effects of RA on the development of rhythmogenic neuronal circuits because prenatal administration of 20-50 mg/kg RA is teratogenic, leading to abnormal embryonic morphogenesis and fetal death. The present study is an attempt to induce more selective effects and alleviate the lethal pathology by treating CD-1 mice at 7.5 dpc with 0.5 mg of RA per kg of maternal body mass. We obtained viable neonates exhibiting hyperpneic episodic breathing (HEB), resembling Chevne-Stokes respiration in adults (Cherniak and Longobardo, 1986) and periodic breathing in pre-term neonates (Glotzbach et al., 1989; Di Fiore et al., 2001; Weintraub et al., 2001).

Methods

Prenatal retinoic acid administration

We have used 140 CD-1 mice pups obtained by feeding orally 13 pregnant females with 200 μ l of a stock solution of 25 mg/ml of all-*trans* retinoic acid (Sigma) in dimethylsulphoxide diluted in vegetable oil prior to application (Conlon et al., 1992; Marshall et al., 1992). Final doses of 0.5 mg/kg or 20 mg/kg were administered, respectively, at 7.5 dpc or at 7.0 dpc. Control females were administered the same solution without RA. The 12h of the day of plug observation was considered as 0.5 dpc. Litter size, taken as an index for prenatal survival, was similar for control (n=6) and treated groups (0.5 mg/kg at 7.5 dpc group, n=10, 20 mg/kg at 7.0 dpc group, n=3). In contrast, no viable offspring was obtained from mice (n=3) treated with high doses (20 mg/kg) at 7.5 dpc, indicating fetal lethality. Postnatal mortality was 30% in the group treated with 20 mg/kg at 7.0 dpc, compared to 2.7% in control mice (*P*=0.0002 Fisher Exact Test). In the group treated with 0.5 mg/kg at 7.5 dpc, 106 neonates were born apparently normal, with no mortality observed either at birth or during the time of analysis. Birth weight (BW, see text and Table I) was correlated to litter size in control (r=-0.772, *P*<0.01) and 0.5 mg/kg (r=-0.804, *P*<0.01) groups.

Neonatal plethysmographic recording

We recorded over 10 (P0-P9) samples of 2 min of quiet breathing for each of 218 control and treated neonates, using a non-invasive barometric method (Chatonnet et al., 2002b). Neonates were placed in a plethysmographic chamber (20 ml) kept at 31°C, hermetically closed and connected to a reference chamber. A computer-assisted method was used to measure VT and the duration of inspirations and expirations from which respiratory frequency was derived. During hyperoxic tests carried out at P7, the chamber was flushed at a
rate of 0.3 l/min with humidified 100% O_2 gas for 40s. No alterations of oxygen-sensing mechanisms could be depicted in RA-treated mice.

Anatomical observation and immunochemistry

Mice aged either P0-P2 (n=30) or P14 (n=15) were intracardially perfused for 15 min with 0.1 M PBS (pH 7.4), followed by a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M PBS. The brain was removed, placed overnight in the same fixative and then rinsed in 0.1 M PBS containing 15% sucrose and stored at 4°C until used. Serial coronal, horizontal or parasagittal sections of 40 μ m were cut on a cryostat. Sets of four adjacent sections were processed using cresyl violet and polyclonal antibodies to tyrosine hydroxylase (TH), choline acetyltransferase (ChAT) or acetylcholinesterase (AChE), as described elsewhere (Domínguez del Toro et al., 2001; Chatonnet et al., 2002b).

Electrophysiology

We isolated brainstem-spinal cord preparations (Chatonnet et al., 2002b) from 20 deeply anaesthetized P1 mice through a ponto-mesencephalic section (PM, Fig. 3a) and a caudal section between cervical and thoracic levels to preserve integrity of the phrenic (C6) nerve rootlets. The preparation was pinned down with the ventral surface upwards in a 2 ml chamber bathed with artificial cerebrospinal fluid solution (ACSF) containing (in mM): KCl, 5.4; NaCl, 130; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 26; D-glucose, 30; CaCl₂, 0.8 equilibrated with a 10% CO₂ in O₂ gas mixture at 26°C, pH 7.0 and perfused at a rate of 1-2 ml/min. Rhythm was recorded from hypoglossal or cervical rootlets. Neurons located in the vicinity of the exit point of the facial nerve were stimulated by a 125 ms pressure application of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleproprionic acid (AMPA, 0.5 mM).

Respiration &	Controls	RA 0.5 mg/kg,	RA 20 mg/kg,
behaviour	(n=34)	7.5 dpc (n=61)	7.0 dpc (n=21)
BW (g)	1.48 ± 0.032	1.47 ± 0.026	1.55 ± 0.044
M (P5-P6) (g)	3.84 ± 0.170	3.83 ± 0.081	$4.55 \pm 0.072 **$
f (P5-P6) (min ⁻¹)	270 ± 7.9	$237 \pm 6.3*$	$225\pm5.9*$
VT/M (P5-P6) (µl/g)	10.33 ± 0.308	$7.30 \pm 0.225 ***$	$7.53 \pm 0.306^{***}$
VE (P5-P6) (ml/g/min)	2.46 ± 0.119	1.72 ± 0.079 ***	1.52 ± 0.043 ***
Apnoeas (P0) (%t)	2.1 ± 0.53	2 ± 1.02	1.4 ± 0.83
Suction (P0) (/30s)	35 ± 1.04	26 ± 1.12***	28 ± 1.52***
Motility (P1) (%t)	3.2 ± 1.11	17.4 ± 2.97 ***	$30.7 \pm 4.46^{***}$
Righting (P0) (s)	13 ± 1.02	7 ± 0.75 ***	8 ± 1.03**
Anatomical Parameters	Controls (n=10)	RA 0.5 mg/kg, 7.5 dpc (n=8)	RA 20 mg/kg, 7.0 dpc (n=8)
Width between facial and trigeminal nuclei (mm)	0.149 ± 0.006	$0.166 \pm 0.004*$	$0.175 \pm 0.008*$
Total width of facial root (mm)	0.031 ± 0.003	$0.041 \pm 0.005*$	$0.044 \pm 0.004*$
Number of abducens motoneurons (% of controls)	100 ± 5.6	48 ± 16.9***	27 ± 22.3***

Table I. Respiratory, behavioural and anatomical parameters in controls and low- and high

 dose groups.

M: body mass, BW: birth weight, f: respiratory frequency, VT/M: tidal volume corrected by body mass, VE: minute volume corrected by body mass, %t: % of the total time of plethysmographic recording. Suction activity was evaluated by counting the number (/30s) of jaw openings elicited by a peribuccal contact; motility corresponded to the duration of limb, neck or body movements in the plethysmographic chamber; righting reflex was assessed as the time (s) the animal took to roll over when placed on its back. *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05.

Statistical analysis

All values are reported as means \pm s.e. Correlation between birth weight and litter size was assessed by Pearson's product moment coefficient. Respiratory parameters, and neurobehavioral performance, were analyzed by repeated-measures ANOVA or MANOVA, to test for the effect of treatment, followed by Scheffé's multiple comparison procedure. For the allometric study of VT, we computed in each animal the equation relating VT to M from the daily values obtained during the first postnatal week. Exponents (b) and intercepts (a) relating the variables were derived from the linear least-squares regression analysis of the logtransformed equation VT=aM^b. To test for the effect of treatment, the estimated exponents were taken as dependent variable in a least squares analysis (Searle, 1971), using birth weight as covariate. Wilcoxon test for matched pairs was used to assess differences in respiratory parameters after hyperoxia, in hindbrain rhythmic activity *in vitro*, and in components of the biphasic response to AMPA stimulation. Statistical significance was accepted for P<0.05. Statistical procedures were carried out on LSMLMW (Harvey, 1985).

Results

RA treatment induces persistent HEB after birth

We treated CD-1 mice at 7.5 dpc with 0.5 mg of RA per kg of maternal body mass or with 20 mg/kg at 7.0 dpc (see Methods). HEB was observed during the second postnatal day (P1) and persisted during the first postnatal week in 64% of these animals, but not in controls (Fig. $1a_1$ - a_3). Episodes (Fig. $1a_2$, lower trace) starting and terminating gradually, and comprising 5-8 inspirations at constant frequency (f) with waxing and waning of respiratory amplitude (VT), were similar to Cheyne-Stokes episodes. In between episodes, respiratory minute volume (VE = f × VT, Table I, respiration) was abnormally weak (-25%, F(2,81)=28.09, P<0.001) at P3 and further decreased during the week (interaction



Figure 1. HEB (a), maturation (b) and allometry (c) of respiratory parameters in RAtreated mice. a_1 , Total duration of HEB (in % of the total time of respiratory recording) during the first 5 postnatal days in control (white, n=15) and treated with 0.5 mg/kg (black, n=15) animals; the same effect of RA is seen using 20 mg/kg at 7.0 dpc (stippled, n=14, see Methods). a_2 , Plethysmographic recording of control (top) and RA-treated (bottom) neonates: upward deflections indicate inspiration. a_3 , Average plethysmographic changes in control (n=15, empty circles), 0.5 mg/kg (n=15, triangles) and 20 mg/kg (n=14, squares) groups. Individual measurements in each animal are from 2 min recording samples (n= 4-5) showing HEB (after treatment) and basal activity. b, Evolution (from top to bottom) of breathing during the first week: each symbol represents an animal identified by averaged VT/M (µl/g, ordinate) and Te (s, abscissa); the diagonal (VT/M=40Te) separates normal immature (P1-P2, below the line) and mature (P3-P6, above the line) values. c, RA-induced disruption of the allometric growth of VT. c(left), Log-log presentation of VT (µl, ordinate) and M (g, abscissa) showing individual "b" exponents for a normal (dashed line) and a treated animal (continuous line) with low BW, previewed from the least-squares analysis. c(right), Estimated individual "b" exponents (µl/g, ordinate) were taken in a least-squares analysis to test for the effect of RA; BW (g, abscissa) was used as a covariate to allow for the animal early or retarded development at delivery (see Methods). After 0.5 mg/kg RA there was an abnormal growth of VT, which depended on BW: slope of the b/BW relationship is negative $(1.09\pm0.29 \ \mu l.g^{-2})$ for the control group (open circles, dashed line) and positive $(+1.11\pm0.24 \ \mu l.g^{-2})$ for the treated group(black triangles, continuous line). Low-BW (1.2-1.5 g) treated neonates exhibit changes in VT at a rate lower than M, in contrast to low-BW control mice.

age*treatment with F(4,160)=8.11, P<0.001) for the group treated with 0.5 mg/kg at 7.5 dpc. After RA treatment at 7.0 dpc, HEB was weaker (particularly at postnatal days P4-P5) and VE was consistently lower than after treatment at 7.5 dpc. Otherwise, survival, birth weight (BW), body mass (M) during the 1st week, apneas at P0, rhythm generation and activity of peripheral chemoreceptors tested with hyperoxia appeared normal (VE in hyperoxia in % of VE in normoxia: 81.2 ± 5.02 in controls, 70.8 ± 3.67 in 0.5 mg/kg group and 89.6 ± 9.99 in 20 mg/kg group, means \pm SEM).

RA treatment impairs the breathing/body mass relationship

Observations in pre-term infants (Glotzbach et al., 1989; Di Fiore et al., 2001; Weintraub et al., 2001) suggest a relation between HEB, early respiratory maturation and BW. This was the case in RA-treated mice. First, RA interfered with a breathing developmental step at P3 during which most controls crossed a critical VT/M vs Te ratio (Fig. 1b, above the diagonal). In contrast, 71% of the treated mice retained immature breathing with low values of VT (interaction age*treatment with F(4,160)=3.27, P=0.013), as well as greater variation of Te (coefficient of variation: 50% in treated mice vs 21% in controls, Fig. 1b, below the diagonal). Second, in the 0.5 mg/kg group, RA treatment also modified a relationship between early respiratory maturation and BW. The allometric evolution of VT was studied by computing for each of 85 normal and treated mice the equation of logVT as a function of logM derived from the linear least-squares regression fitted to daily values between birth and P7 (see Methods). The estimated exponents (b, Fig. 1c) were taken as dependent variable in a least-squares analysis, using BW as a covariate (low BW indicating retarded development at delivery given the size of the litter). We found that the effect of RA treatment on b was influenced by the animals' BW (b= $\pm 1.11 \pm 0.24$ for RA treated vs b= $\pm 1.09 \pm 0.03$ for controls, P<0.001). Thus, in contrast to controls, the increase of VT per unit change of M was



Figure 2. Parasagittal anatomical sections showing control $(c_1 - e_1)$ and RA-treated $(c_2 - e_2)$ r3r5-derived para-facial areas. *a*, Schematic presentation combining lateral and medial brainstem structures to show territories affected by RA (grey area) and location of Fig. 2*c* (7n) and Fig. 2*d* (Mo6); 5, Mo6, 7: trigeminal, abducens, facial motor nuclei; 7n: facial nerve; c: caudal, d: dorsal. *b*, Average respiratory in controls (white) and treated animals (with 0.5 mg/kg (black) and 20 mg/kg (stippled) RA doses as in Fig. 1) and showing at least unilaterally, hypoplasia of abducens nucleus of 50% or over (Mo6, like in *d*) and/or a 25% change in the ventral pontine phenotype (7n, like in *c*). *c*, Descending root of the facial nerve stained by cresyl violet at P7.5 separation into two distinct roots (see dotted lines) and increased width of the facial nerve (arrow); c_2 : 0.5 mg/kg RA. *d*, Abducens motor nucleus processed with an antibody against choline acetyltransferase at P7; d_2 0.5 mg/kg RA. *e*, Ependymal epithelium stained by cresyl violet at the rostral end of the 4th ventricle, medially to the trigeminal motor nucleus; e_2 20 mg/kg RA; see Ref. 19 showing the same phenotype in *Hoxa1*^{-/-} mutant mice.

lower in small RA-treated newborns than in larger ones (Fig. 1*c* right), suggesting that retarded treated neonates were unable to provide a VT adequate to their size.

Respiratory-related anatomical para-facial defects in RA-treated mice

Anatomical anomalies were found rostral to the facial motor nucleus (Fig. 2a) in RA treated mice, which were otherwise apparently normal. Ventrally, in the vicinity of the facial nerve root exit point (rhombomere (r) 4-derived), the r3-r5-derived (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001; Chatonnet et al., 2002b) reticular formation between facial and trigeminal motor nuclei was larger after RA treatment (Table I, anatomical defects). Within this hyperplasic reticular formation, axonal fasciculi of r4-derived intra-cranial descending facial root were more widely dispersed than normal (see total width of facial root in Table I, Fig. $2c_1-c_2$) and occasionally led to two distinct facial nerve roots (Fig. $2c_2$). These ventral pontine traits, often unilateral, were observed in 65% of the cases, pointing out animals with extremely low ventilation during P0 (25% lower than normal VE; 7n in Fig. 2b). Dorsally, the abducens nucleus (Mo6 in Fig. 2b) was hypoplasic (Fig. $2d_2$; Table I) and additionally, in the 20 mg/kg group, the anterior fourth ventricle morphology indicated anomalies in r4 (Domínguez del Toro et al., 2001) (Fig. 2e₂). Dorsal defects were nevertheless unrelated to respiratory deficits. Abnormal breathing parameters during RA-induced HEB thus correlate with modified ventral para-facial reticular populations, in a location compatible with a r3-r5 origin and with significant changes in respiration (Onimaru and Homma, 2003), suction (Jacquin et al., 1996) and righting (Chatonnet et al., 2002b) behaviors (Table I).

Increased efficacy of para-facial stimulation on rhythm generation in vitro

We thus investigated respiratory function of the rostral para-facial neurons in a preparation isolated *in vitro* from one-day old treated animals. Rhythm generation in the



Figure 3. Rhythmic activity generated by control and RA-treated isolated brainstemspinal cord preparations. *a*, Integrated nerve recordings during a pressure (125 ms) AMPA application (arrowhead): an upward deflection indicates a burst of motor activity. *b*, Average changes in rhythm frequency induced by AMPA in control (n=7, empty circles), 0.5 mg/kg (n=5, triangles) and 20 mg/kg-dose (n=5, squares) groups. In keeping with *in vivo* observations (Fig. 1a3), phasic increase of the rhythm is associated with a reduced basal activity that becomes prominent after higher RA dose treatment. *Inset*, Schematic presentation: PM, PB: ponto-mesencephalic, pontobulbar sections; AMPA: location of pressure application; 12n: recorded hypoglossal nerve.

medulla (caudal to PB in Fig. 3*a*) was normal (n=10 recordings, data not shown). Para_facial neurons stimulation with pressure application of the glutamatergic agonist α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleproprionic acid (AMPA, caudal to 7n in Fig. 3*a*) increased the rhythm frequency in both control and treated mice. However, after treatment with RA at 7.5 dpc, AMPA induced an additional response comparable to that observed after a lethal disruption of the *Hox* network in *Hoxa1* homozygous mutants (Domínguez del Toro et al., 2001): 10-20 respiratory bursts were elicited and followed, in the 0.5 mg/kg group, by a period of weaker activity (Fig. 3*b*-*c*), revealing modified respiratory control mechanisms. After treatment at 7.0 dpc with 20 mg/kg, this response was reduced by an overall decrease of the rhythm frequency, in keeping with the decrease of HEB pattern induced *in vivo* by the same treatment. Altogether, observations at P1-P5 suggest that novel rostral para-facial properties promote generation of the HEB pattern, which becomes evident at P1 *in vivo*.

Discussion

Effects of 0.5 mg/kg RA treatment raise further concerns about the danger of exposure to non-teratogenic doses of retinoids during pregnancy. They also provide pharmacological support to studies of human syndromes (Abadie et al., 1996; Shea, 1997; Gozal, 1998) and loss-of-function animal models (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001; Chatonnet et al., 2002b) demonstrating that disruption of the genetic program orchestrating hindbrain development causes aberrant neonatal breathing.

Relations between r3/r4-derived territories and the para-facial respiratory group

We have found that abnormal breathing parameters during RA-induced HEB correlate with anatomo-functional modification of ventral para-facial reticular structures. Anomalies have been localized in the vicinity of the facial nerve exit point, a r4-derived structure controlled by the pattern of *Hoxa1* and *Hoxb1* expression during embryonic development (Gavalas et al., 1998; Domínguez del Toro et al., 2001). These results are therefore consistent with an effect of RA on response elements regulating anterior Hox gene patterning in the hindbrain (Morriss-Kay et al., 1991; Conlon et al., 1992; Marshall et al., 1992) and suggest that *Hox* patterning of the para-facial region of the hindbrain during embryonic development plays a major role in establishing a normal breathing behavior after birth. In keeping with this hypothesis, previous observations in the chick embryo have established at the r3-r4 level of the neural tube, a rhombomeric code that is required for the maturation of GABAergic inhibition, a major step in the maturation of rhythmic patterns (Fortin et al., 1999). Furthermore, in neonates, optical imaging of respiratory neuron activity in neonates has recently shown that, before the onset of inspiration, rhythmic activity starts in the parafacial neuronal group, located immediately ventral to the branchiomotor facial nucleus (Onimaru and Homma, 2003). Loss-of-function studies on Krox-20 and Hoxal homozygous mutant mice have revealed the importance of r3 and r4 to avoid a lethal apneic breathing behavior during the first days after birth (Jacquin et al., 1996; Domínguez del Toro et al., 2001). Although some qualitative differences were observed between RA treatments at 7.0 and 7.5 dpc, our work further extends the results of loss-of-function studies by indicating that the RAinduced up-regulation of anterior Hox genes expression at 7.5 dpc may promote, during the first postnatal week, appearance of hyperpneic episodes resembling those described in preterm human neonates (Glotzbach et al., 1989; Di Fiore et al., 2001; Weintraub et al., 2001). On the whole, data available in mice demonstrate the vital role of para-facial neuronal structures during the neonatal development of the breathing behavior.

Central origin of HEB and consequences for clinical observations

Our study also suggests early development and central origin of mechanisms contributing to the generation of neonatal HEB. Hyperpneic episodes (Cheyne-Stokes respiration, see Cherniak and Longobardo, 1986) have been widely reported in patients with Joubert syndrome (Joubert et al., 1969; Maria et al., 1999), and in adults with congestive heart failure (Sin et al., 2000) and brain-stem infarction (Lee et al., 1976). Involvement of brain structures in the para-facial Pons is particularly relevant for Joubert syndrome, a clinico-pathological condition, whose patients show neonatal HEB (in 60-80% of patients), abnormal eye movements (75%), ataxia and mental retardation, together with hypoplasia of the cerebellar vermis, abnormalities of the fourth ventricle and less-well-defined malformations of the brainstem described mainly on the basis of radiologic studies (Joubert et al., 1969; Saraiva et al., 1992; Maria et al., 1999). According to our findings, observing HEB in young infants may be a sign of brainstem dysfunction indicating the need for careful examination of anatomy and function of r3-r5-derived territories, particularly the facial nerve and the abducens nucleus.

Acknowledgments

This work was supported by HFSP (Research Grant 101/97), Ministère de la Recherche (ACI BDP#57), the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and UE contract QLG2-CT-2001-01467. L.G. was supported by training grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PRAXIS XXI, BD/11299/97), Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (FLAD, Proc. 3.L/A.11/P.281/94) and Embassade de France au Portugal (Convention de Coopération Scientifique, 236 C1). E.D.T. was supported by The European Community (BIO4-CT975-096) and FRM (EP001227/1) training grants. We thank G. Fortin for valuable discussions and comments on this manuscript.

References

Abadie V, Champagnat J, and Fortin G (2000) Branchiomotor activities in mouse embryo. Neuroreport 11[1]:141-145.

Abadie V, Depondt E, Farriaux JP, Lepercq J, Lyonnet S, Maurin N, Ogier de Baulny H, Vidailhet M. (1996) Le dysfonctionnement néonatal isolé du tronc cérébral. Arch Pediatr 3:130-136.

Blumberg B, Bolado J Jr, Derguini F, Craig AG, Moreno TA, Chakravarti D, Heyman RA, Buck J, Evans RM. (1996) Novel retinoic acid receptor ligands in Xenopus embryos. Proc Natl Acad Sci USA 93:4873-4878.

Champagnat J and Fortin G (1997) Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. Trends Neurosci 20[3]:119-124.

Chatonnet F, Thoby-Brisson M, Abadie V, Dominguez, del Toro E, Champagnat J and Fortin G (2002a) Early development of respiratory rhythm generation in mouse and chick. Respir Physiolo Neurobiol 131[1-2]:5-13.

Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Voiculescu, O., Charnay, P. Champagnat, J. (2002b) Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous kreisler mutant mice. Eur J Neurosci 15:684-692.

Cherniack, N.S. Longobardo, G.S. (1986) Abnormalities of the respiratory rhythm. In: Handbook of Physiology, The respiratory system, Mechanics of breathing, sect. 3 vol. II (Cherniak NS, Widdicombe JG, Eds), pp729-749. Bethesda, MD: The American Physiological Society.

Conlon, R.A. Rossant, J. (1992) Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. Development 116:357-368.

Di Fiore JM, Arko MK, Miller MJ, Krauss A, Betkerur A, Zadell A, Kenney SR, Martin RJ (2001) Cardiorespiratory events in preterm infants referred for apnoea monitoring studies. Pediatrics 108:1304-1308.

Domínguez del Toro E, Borday V, Davenne M, Neun R, Rijli FM, Champagnat J (2001) Generation of a novel functional neuronal circuit in Hoxa1 mutant mice. J Neurosci 21:5637-5642.

Dupé V, Lumsden A (2001) Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. Development 128(12):2199-2208.

Fortin G, Jungbluth S, Lumsden A, Champagnat J (1999) Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. Nat Neurosci 2:873-877.

Gale E, Prince V, Lumsden A, Clarke J, Holder N, Maden M (1996) Late effects of retinoic acid on neural crest and aspects of rhombomeres identity. Development 122, 783-793.

Gavalas A (2002) ArRAnging the hindbrain. Trends Neurosci 25[2]:61-64.

Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R (1998) Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. Development 125:1123-1136.

Glotzbach SF, Baldwin RB, Lederer NE, Tansey PA, Ariagno RL (1989) Periodic breathing in preterm infants: incidence and characterization. Pediatrics 84:785-792.

Gozal, D. (1998) Congenital central hypoventilation syndrome: an update. Pediatr Pulmonol 26:273-282.

Harvey, W.R. (1985) User's guide for LSMLMW. Mixed model least-squares and maximum likelihood program. Ohio University, OH.

Hill J, Clarke JD, Vargesson N, Jowett T, Holder N (1995) Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron. Mech Dev 50:3-16.

Jacquin TD, Borday V, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Ghilini G, Kato F, Charnay P, Champagnat J (1996) Reorganization of pontine Rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. Neuron 17:747-758.

Joubert M, Eisenring JJ, Robb JP, Andermann F (1969) Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnoea, abnormal eye movements, ataxia and retardation. Neurology 19:813-825.

Lee MC, Klassen AC, Heaney LM, Resch JA (1976) Respiratory rate and pattern disturbances in acute brain stem infarction. Stroke 7, 382-385.

Lumsden A and Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. Science 274:1109-1115.

Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. Nat Rev Neurosci 3:843-853.

Maria BL, Boltshauser E, Palmer S, Tran TX (1999) Clinical features and revised diagnostic criteria in Joubert syndrome. J Child Neurol 14:583-590.

Marshall H, Nonchev S, Sham MH, Muchamore I, Lumsden A, Krumlauf R (1992) Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. Nature 360:737-741.

Morriss-Kay G, Murphy P, Hill RE, Davidson DR (1991) Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. EMBO J 10:2985-2995.

Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. J Neurosci 23:1478-1486.

Saraiva JM, Baraitser M (1992) Joubert syndrome: a review. Am J Med Genet 43:726-731.

Searle SR (1971) Linear Models. New York: John Wiley & Sons.

Shea SA (1997) Life without ventilatory chemosensitivity. Respir Physiol 110:199-210.

Sin DD, Logan AG, Fitzgerald FS, Liu PP, Bradley TD (2000) Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular outcomes in heart failure patients with and without Cheyne-Stokes respiration. Circulation 102:61-66.

Weintraub Z, Cates D, Kwiatkowski K, Al-Hathlol K, Hussain A, Rigatto H (2001) The morphology of periodic breathing in infants and adults. Respir Physiol 127:173-184.

Chapitre 6

Du développement embryonnaire à la fonction physiologique : exemple de la région para-faciale et importance du contrôle néonatal par les opioïdes endogènes.

Le contrôle moléculaire de la mise en place des segments r3 et r4 est assez bien connu. Il semble que le rhombomère 4 soit le premier formé et agisse ensuite comme un centre organisateur local, induisant les cascades moléculaires présidant au développement ultérieur des rhombomères 3 et 5 adjacents. Les gènes paralogues *Hox* du groupe 1, *Hoxa1* et *Hoxb1* jouent un rôle prédominant dans cette fonction de r4. Toutefois, le gène *Krox20*, dont l'expression débute peu de temps après celle d'*Hoxa1* et *Hoxb1*, est particulièrement déterminant pour la genèse de r3 et r5. Les interactions de tous ces gènes mènent à la formation des différents territoires rhombomériques de façon coordonnée. Si l'origine rhombomérique des populations de motoneurones est bien connue, celle des neurones réticulaires formant les différents groupes respiratoires disséminés dans le tronc cérébral reste inconnue ou hypothétique.

L'observation du comportement respiratoire de différents mutants pour des gènes impliqués dans la segmentation et leur comparaison a permis de mettre en évidence l'existence d'un « système anti-apnéique », actif à la naissance, excitateur du rythme respiratoire et sensible aux neuromodulateurs opioïdes. Chez certains mutants, tels que les animaux $Krox20^{-/-}$ et $Hoxa1^{-/-}$, ce système est complètement ou partiellement détruit, ce qui conduit à une faible fréquence respiratoire à la naissance associée à une mort précoce des animaux (au cours du premier jour post-natal). L'analyse des mutants kr/kr, chez qui r5 est éliminé et des mutants $Hoxa2^{-/-}$, qui ont un r2 largement modifié, montre que ce système à pour origine principale les rhombomères 3 et 4. La mutation +/kr, qui modifie partiellement l'identité du rhombomère 3 entraîne à la naissance une hyperactivité respiratoire d'origine pontique, apparemment liée à une hyperactivité du système anti-apnéique, qui est renforcée par l'administration de naloxone. De plus, le traitement de mères gestantes avec l'acide rétinoïque à un moment bien précis du développement embryonnaire entraîne à la naissance des troubles respiratoires dont l'origine a pu être localisée dans des populations neuronales proches de la sortie du nerf facial, donc dans des territoires issus de r3 à r5.

Une étude récente a permis la découverte d'un nouveau groupe respiratoire, situé à proximité du noyau moteur facial et appelé groupe respiratoire para-facial ou pFRG (para-<u>Facial Respiratory G</u>roup, cf. introduction, (Onimaru & Homma, 2003). Ce groupe constitué de neurones pré-inspiratoires serait en relation étroite avec le générateur central du rythme respiratoire, situé dans le complexe de pré-Bötzinger (pBC), pour coordonner la génération d'un rythme stable. D'autres expériences montrent que les opioïdes endogènes jouent *in vitro* un rôle différent sur les neurones pré-inspiratoires et les neurones pacemaker du pBC (Mellen et al., 2003), ainsi les relations entre le pFRG et le pBC seraient particulièrement sensibles aux puissants inhibiteurs de la respiration que sont les neurotransmetteurs opiacés. L'étude *in vitro* de l'activité respiratoire des mutants *Hoxa1*^{-/-} nous a permis de mettre en évidence des irrégularités disparaissent en présence de naloxone. Nous concluons que l'efficacité de la naloxone est un indice important des dysfonctionnements du couple pFRG / pBC et du système anti-apnéique.

L'hypothèse formulée grâce à la synthèse de toute ces données est que le système antiaphéique altéré par l'élimination de r3 ou r4 représente une partie fonctionnellement importante du pFRG. En effet, 1) les effets de l'élimination du système anti-apnéique ou du pFRG sont similaires et résultent en une diminution du rythme respiratoire, 2) l'emplacement du pFRG chez le rongeur à la naissance correspond avec des territoires dérivés de r4, 3) la naloxone inhibitrice des opiacés augmente la survie des animaux présentant des défauts du système anti-apnéique, ou renforce une hyperactivité de ce système. Une autre hypothèse peut être formulée au regard des résultats de Homma & Onimaru : en effet, les populations neuronales rythmiques ne s'étendent pas jusqu'aux territoires dérivés de r3. Ainsi, ce ne serait plus les neurones de r3 qui seraient impliqués, mais la signalisation en provenance de r3, qui au cours du développement pourrait influencer la mise en place de systèmes neuronaux en r4, par exemple grâce aux signalisations établissant la frontière entre les deux rhombomères. Ce mécanisme ne semble pas être impliqué à la frontière entre r5 et r6, puisque l'absence de r5 ne produit pas de défauts dramatiques en r6. Il semble donc que les processus développementaux présidant à la mise en place du générateur respiratoire bulbaire, le pBC, et de son système régulateur enképhalinergiques soient différents.

L'implication clinique de ces études chez les souris mutantes pour divers gènes de développement est évidente pour la détection précoce de syndromes affectant la respiration à la naissance. En effet, les mutations de gènes de développement sont associées à des défauts d'arcs réflexes particuliers : mastication pour $Krox20^{-/-}$, retournement pour kr/kr et $Hoxa1^{-/-}$,

chemosensibilité pour d'autres mutants. En testant ces réflexes chez les enfants, des mutations susceptibles de modifier la génération du rythme respiratoire pourraient être détectées, facilitant par la suite la prise en charge du déficit respiratoire.

Publication 6

Chatonnet F., Domínguez del Toro E., Thoby-Brisson M., Champagnat J., Fortin G., Rijli F.M., and Thaeron-Antónô C. (2003). From hindbrain segmentation to breathing after birth: developmental patterning in rhombomeres 3 and 4. Molecular Neurobiology, sous presse.

From Hindbrain Segmentation to Breathing After Birth

Developmental Patterning in Rhombomeres 3 and 4

Fabrice Chatonnet,¹ Eduardo Domínguez del Toro,² Muriel Thoby-Brisson,¹ Jean Champagnat,¹ Gilles Fortin,¹ Filippo M. Rijli,³ and Christelle Thaëron-Antôno^{*,1}

¹UPR 2216 Neurobiologie Génétique et Intégrative, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, 1, av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ²División Neurociencias, Laboratorio Andaluz de Biología, Universidad Pablo de Olavide, Ctra. de Utrera Km1, 41013, Sevilla, Spain; ³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, BP 10142 -67404 Illkirch Cedex, CU de Strasbourg, France

Abstract

Respiration is a rhythmic motor behavior that appears in the fetus and acquires a vital importance at birth. It is generated within central pattern-generating neuronal networks of the hindbrain. This region of the brain is of particular interest since it is the most understood part with respect to the cellular and molecular mechanisms that underlie its development. *Hox* paralogs and *Hox*-regulating genes *kreisler/mafB* and *Krox20* are required for the normal formation of rhombomeres in vertebrate embryos. From studies of rhombomeres r3 and r4, the authors review mechanisms whereby these developmental genes may govern the early embryonic development of para-facial neuronal networks and specify patterns of motor activities operating throughout life. A model whereby the regional identity of progenitor cells can be abnormally specified in r3 and r4 after a mutation of these genes is proposed. Novel neuronal circuits may develop from some of these misspecified progenitors while others are eliminated, eventually affecting respiration and survival after birth.

Index Entries: Hindbrain; rhombomeres; development; respiration; central pattern generators; transcription factor; *kreisler; Krox20; Hoxa-1*.

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: Christelle. Thaeron-Antono@ iaf.cnrs-gif.fr

Received February 27, 2003; Accepted June 11, 2003

Introduction

How the respiratory rhythm is generated is a fascinating problem that has interested cellular neurobiologists, medical scientists, and comparative physiologists (1). The rhythmic respiratory-related neuronal network has been located within the hindbrain, in the pons, and the medulla. It is active before birth and controls respiratory-like rhythmic movements that are among the earliest detectable behaviors of the mammalian fetus. It becomes vital after birth and its impairment may contribute to sudden infant death syndromes that is the primary cause of death between 1 mo and 1 yr of age in developed countries (2). The analysis of human diseases with aberrant control of ventilation led to the hypothesis of a genetic control of breathing which, however, remains difficult to differentiate from confounding environmental factors. Genetic mechanisms postulated from studies of human twins (3), familial aggregation (4), and inbred mice strains (5) remain to be elucidated. The basis of variation of respiratory parameters in mammalian species is also unknown (6). This review specifically examines genes that affect respiratory parameters such as frequency, by controlling the organization of the central rhythmic neuronal network. Studies of the early stages of development in vertebrate evolution indicate that the respiratory circuit may be under the same genetic constraints and factors that are involved in early-hindbrain patterning.

In all vertebrates, the hindbrain is one of the vesicles that appears towards the anterior end of the neural tube. The hindbrain neuroepithelium becomes partitioned into an iterated series of cellular compartments along the antero-posterior axis, which are called rhombomeres (r1–r8). Segmentation is transient. It appears during the second half of the first month in humans, between E8 and E12 in mice, between stages 9 and 24 in chicks, and influences later differentiation and spatial distribution of neuronal patterns. For instance, the branchiomotor neurons of the cranial nerves conform to the rhombomeric pattern with a two-segment periodicity (7). However, because segmentation is followed by the reconfiguration of neurons and synapses during fetal and postnatal stages, the impact of early rhombomeric patterns on the function of mature neuronal circuits remains to be established. Transcription factors that are expressed in rhombomere-specific patterns and are required for hindbrain segmentation and development have been identified. Among these are the homeobox genes of the *Hox* family and their regulators *Krox20* and *kreisler/mafB*.

Here, the authors first summarize available data on the molecular control of r3, r4, and adjacent rhombomeres and the involvement of the above transcription factors in hindbrain development. These data suggest that, according to the initial hypothesis of Lumsden (8), the spatially-restricted patterns of developmental gene expression encode segment-specific positional information that is in turn translated into specific neuronal fates. Following an overview of the fetal and postnatal development of breathing, the authors present results indicating that the r3–r4 rhombomeric pair is required for the specification of neuronal circuits, breathing patterns, and survival.

Rhombomere-Specific Expression and Function of *Hox, kreisler/mafB,* and *Krox20* During Hindbrain Development

The *Hox* genes provide cells with positional information and identity along the antero-posterior axis of the embryonic body. Vertebrates display variable, species-specific numbers of *Hox* gene clusters originated by successive duplications of a single ancestral complex. Each cluster, in turn, contains variable numbers of tandemly organized transcriptional units, numbered from 1–13. *Hox* genes located in analogous position, but in different complexes, are named paralogs (i.e., *Hox* paralog group 1–13). They display similar, though not identical, expression patterns



Fig. 1. Cranial nerve and gene expression patterns in the segmented hindbrain. The drawing shows a schematic flatmount representation of the mouse hindbrain and branchial arches at E10.5. The organization of cranial nerve motor nuclei and their projections is indicated on the left side. The segmental expression of Krox20 (r3 and r5), kreisler (r5–r6), and Hoxb1 (r4) is indicated on the right side. The rostrocaudal expression domains of Hox paralog group 1-4 are shown as bars, adjacent to the hindbrain diagram. Each gene domain extends from the posterior end of the neural tube up to a sharp rostral boundary that maps precisely at rhombomere borders. However, Hox expression levels may not be homogenous along the rostrocaudal axis, displaying higher levels in some rhombomeres (black shading). Note that Hoxa1 expression is only present at earlier stages up to the presumptive r3/r4 border, though not any longer at the segmentation stage (dashed bar). R, rhombomere; BA, branchial arch; ov, otic vesicle; mV–XI, motor component of cranial nerve V–XI; gV–X, sensory ganglia of cranial nerve V–X.

and partially redundant functions. In the hindbrain, Hox genes from paralog group 1–4 show rhombomere-restricted expression (9,10; see Fig. 1). Hox expression is activated in the hindbrain before segmentation, neuroepithelium in response to inductive signals such as retinoic acid (11-13), and maintained through later developmental stages in neuronal progenitors and some postmitotic neurons (14-17). Analysis of loss- and gain-of-function mutations in mouse and chick embryos revealed an important role for Hox genes in the establishment of rhombomeric territories, the assignment of segmental identities, and rhombomere-specific neuronal patterns (9,10,16–31). Molecular and cellular analysis indicated also that neuronal differentiation is affected, or that the fate of certain neuronal progenitors is diverted to other subtype identities. Morphological analysis has focused mainly on the branchiomotor neurons of the facial and trigeminal subtypes. In Hoxa2 mutants, r2-r3 derived trigeminal branchiomotor neurons show abnormal axonal projections and branchial arch target selection (23). In contrast, in the absence of Hoxb1 and Hoxb2 functions, the development of the r4-derived facial nerve is impaired (16,17,20,21), and the fate of r4 facial branchiomotor progenitors is switched to serotonergic instead of cholinergic (32).

Interestingly, the initial establishment of the rhombomeric pattern does not follow a strict More specific rostro-caudal order. Recent work established that the presumptive r4 territory, in the center of the hindbrain neuroepithelium, is the first to be generated (33). In turn, the r4 territory acts as a local organizing center, signaling to adja-

AU: time frame for "recent work"?

cent territories and starting a molecular cascade leading to the further partitioning into the r3, r5, and r6 segments (33,34). The expression of Hox paralog group 1 genes, Hoxa1, and *Hoxb1* is central to this process providing the earliest sign of r4 regionalization (10 and refs. therein). These genes are both expressed up to the presumptive r3/r4 boundary well before morphological segmentation. Subsequently, Hoxa1 expression is downregulated whereas *Hoxb1* signal is maintained at high levels in r4 through an auto-regulatory loop. On the basis of analysis in zebrafish embryo, it could be suggested that the cooperative activity of *Hox* with their *Pbx* cofactors results in the upregulation of Fibroblast Growth Factor 3 (Fgf3) and *Fgf8* in r4, which in turn induce *kreisler/mafB* and Krox20 in r5-r6 (33-36). Hoxa1 function in r4 also contributes to the regulation of *Krox20* in r3, possibly via the activity of Fgf molecules from r4 (25,34). Indeed, this model is consistent with the analysis of single and compound *Hoxa1* and *Hoxb1* knockout mice (18–21,24,26). Specific hindbrain defects were observed, ranging from segmentation abnormalities to misspecifications of neurons. In particular, the Hoxa1 single and Hoxa1/Hoxb1 compound knockout mice resulted in abnormal rhombomere specification from r3 to r6. Altogether, these studies highlight the requirement of *Hox* genes and the dependence on inter-rhombomeric signaling for normal hindbrain segmentation and development.

The *kreisler* mutants were generated by X-ray mutagenesis. The homozygous mutant animals are hyperactive and their behavior is characterized by head-tossing, running in circles, and deafness due to absence of a functional inner ear (37–39). The kreisler mutation affects a mafB-related transcription factor, present in r5, r6, and in the roof plate along the hindbrain. Kreisler/mafB upregulates the expression of *Hoxa3* in both r5 and r6, and of *Hoxb3* in r5 (40,41). This is required for r5 formation since this rhombomere fails to form in kreisler homozygous mutants.

Within the yet unsegmented hindbrain, the *Krox20* gene is transiently expressed in two

Chatonnet et al.

stripes with sharp edges corresponding to the future rhombomeres r3 and r5 (42). Krox20 protein acts as a direct transcriptional activator of other r3- and r5-related genes belonging to the homeobox clusters (43,44) and participates in rhombomere boundaries formation (45). The anatomical organization of the hindbrain and the expression patterns of rhombomere-specific genes demonstrate that the inactivation of *Krox20* in transgenic mice eventually eliminates r3 and r5 (46-48).

Respiratory Behavioral Patterns at Different Stages of Development

The vertebrate hindbrain displays variable, species-specific, reticular circuits producing rhythmic motor behaviors linked to the respiratory function in agnathian fishes (49), teleostean fishes (50), lungfishes (51), amphibians (52,53), reptiles (54), and birds (55). The rhythm can be episodic or permanent (56,57). In mammals, the postnatal respiratory rhythm characterizes permanent, bilaterally synchronized, and coordinated activities in spinal motor axons that innervate the diaphragm, inter-costal, and abdominal pump muscles as well as in cranial motor neurons that determine the flow resistance of the airways.

The generator responsible for the balanced sequence of inspiration, postinspiration (that slows lung deflation), and expiration (58,59) comprises a network of rhythmic "respiratory" reticular neurons, all located within the brainstem, which sequentially activate motoneurons during inspiration (e.g., phrenic motoneurons), postinspiration (e.g., expiratory recurrent laryngeal motoneurons), and expiration (e.g., internal intercostals motoneurons). The required neuronal patterns emerge from the interplay between synaptic relationships and electrical membrane properties that are identifiable by electrophysiological recording on rhythmically active preparations isolated in vitro (60–63). The regulatory loops for breathing involve sensory inputs from, for example, peripheral lung

AU: genes are ital and protein roman



Fig. 2. Schematic representation of brainstem nuclei, ventral respiratory groups, and rhombomeres origin of branchiomotor nuclei and nerves. Schematic drawing of an horizontal section of the neonatal mouse brainstem. (A) Localization and name of the brainstem nuclei. 4Va: anterior part of the 4th ventricle; 5: trigeminal motor nucleus; 5n: trigeminal nerve; 6: abducens motor nucleus; 7: facial motor nucleus; 7n: facial nerve; AMB: ambiguus nucleus; DVMN: dorsal motor nucleus of the vagus; Pn: pons nucleus; Rpc- α : parvocellular reticular formation; ts: tractus solitarius; VCo: vestibular-cochlear nuclei; VLL: ventro-lateral lemniscus. (B) Localization of the ventral respiratory groups active in vitro. A5: pontine catecholaminergic group A5 (inhibitor of respiratory rhythm); pBC (star): preBötzinger complex; pFRG: para-facial respiratory group (67); VRG: ventral respiratory group. Rhombomeric origins of branchio-motor nuclei in mice are indicated: trigeminal motor nucleus is derived from r2/r3; facial motor nucleus and nerve are derived from r4, glossopharyngian nucleus originates in r6/r7.

mechanoreceptors, carotid body chemoreceptors, and intracranial chemosensors.

An antero-posterior (AP) organization of the respiratory network was already recognized physiologically in 1923 (1) with the identifica-

tion of the most rostral Pontine Respiratory Group (PRG) in mammals, in vivo. Available data are interesting to confront with adult anatomical features that are specified by the AP pattern of *Hox* gene expression. For example, branchiomotor nuclei conform to the rhombomeric pattern (7,8). Trigeminal motoneurons originate from r2 and r3 and send their axons (5n in Fig. 2) to an exit point in r2. In mammals, the facial branchial nucleus originates in r4. The ventral (ambiguus, AMB in Fig. 2) and dorsal (DVMN in Fig. 2) motor nuclei of glossopharyngeal-vagal nerves derive from r6-r8. AP anatomical features are less obvious in the reticular formation. Nevertheless, the electrophysiological analysis of rhythm generation in vitro has been performed on rodent neonates and revealed respiratory-related systems in register with the general organization of branchiomotor nuclei. Caudally, at the vagal level, the neonatal inspiratory rhythm is generated in a subdivision of the ventral respiratory group (VRG in Fig. 2), the pre-Bötzinger complex (56; pBC in Fig. 2), and persists in coronal brainstem slices of newborn rodents, isolated in vitro (64,65). At the trigeminal level, ventral pontine controls of the rhythm (66) includes noradrenergic neurons of the A5 group exerting a depressant effect upon the caudal VRG (62). At the facial level, a distinct neonatal rhythm generator has recently been delineated by activity-dependent imaging and called the para-facial respiratory group (67; pFRG in Fig. 2). In contrast to the inspiratory pBC, the pFRG is characterized by a pre-inspiratory pattern of neuronal activity stopping during inspiration and resumed afterward by a postinhibitory rebound. It seems that potent respiratory depressants such as opioids (68–70) act in neonates by disrupting the balanced pFRG-pBC interaction that is required for permanent rhythm generation in the hindbrain isolated in vitro. (67,71). The respiratory network is also organized along the dorso-ventral axis. The pFRG, the pBC, and the A5 group (Fig. 2) lie ventrally. There is no respiratoryrelated neuronal groups lying dorsally in the trigeminal and facial domains of the hindbrain (see Generation of a Novel Functional Circuit in

the Dorsal Pons of *Hoxa1* Mutant Mice 4). The dorsal part of the network contains rostrally, the PRG (at a r1-derived position) and caudally, part of the nucleus tractus solitarius where r6–r8-derived sensory afferents of the tractus solitarius (ts in Fig. 2) terminate. This dorsal part of the network plays a role in vivo in the transition from inspiration to postinspiration, but it does not function normally in vitro (72). Thus, this review concentrates on ventral respiratory groups, particularly those located within the r3/r4-derived domains.

Fetal Breathing

In the late fetal period, such an organization of the respiratory networks forming discrete cell groups is also found. Analysis of fetal lamb in vivo has revealed powerful rostral pontine inhibitory mechanisms that are brought into play by maturation of sleep states and causes periodic breathing until birth (73). Differences between fetal and adult breathing behavior in mammals reveal the extent of maturational changes that continue after birth (74,75). Fetal breathing is part of a global stereotyped movement pattern including startle, hiccuping, limb movements, and head retroflexion. In humans, this pattern starts at the beginning of the third month of pregnancy and increases in complexity and frequency afterward (76). In mice, coordinated rhythmic movements of the rib cage, opening of the mouth, and flexion of the neck and body start at E15.5 (77). However, before E18 in rats, typical features of the rhythmic hindbrain in vitro are lacking, particularly the predominance of hindbrain over spinal rhythms, the effect of the A5 group, and the central sensitivity of the hindbrain to CO₂ (62,78). Therefore, although there are major maturational steps at mid-fetal stages, rhythm generation itself starts much earlier.

Primordial Rhythm Generation

Electrophysiological recordings performed on an isolated preparation of chick embryo hindbrain revealed that by the end of the segmentation period (stage 24), the hindbrain neuronal network starts to exhibit a consistent and organized activity in the form of recurring episodes composed of burst discharges that occur simultaneously in the different cranial nerves (79). At this stage the neuronal network is already organized with distinct reticular and motor neurons. Cross-correlation analysis of primordial activities recorded in the trigeminal, facial, and glossopharyngeal rootlets demonstrate that the different motoneuronal pools along the AP axis are coactivated through multisynaptic reticular relationships (80). When intersegmental relationships are interrupted by transverse sectioning of the hindbrain rostral and caudal to the exit of the branchiomotor nerve, the ability to generate the rhythmic pattern is preserved in each transverse slice. Thus, each pair of rhombomeres, particularly the para-facial segment originating from r4-r5, contains its own rhythm generator (80).

Hoxa1, kreisler/mafB, and Krox20 Control Rhombomere-Specific Regional Identity of Neural Precursors

Neurons in different rhombomeres probably differ in membrane electrical properties or network organization, in agreement with the proposed role of segmentation in the supply for neurobiological substrates with both redundant elements and discrete variations in local properties. At stage 18 in chick, a set of 8 reticular neuronal phenotypes has been characterized in chick rhombomeres from their pattern of axonal trajectories (81), providing an anatomical basis for the coactivating system. Clonal analysis after intracellular labeling of single cells at stages 7-8 revealed that determination of ultimate neuronal phenotypes may occur already in precursor cells, before the end of mitotic divisions (82). Such early phenotypic choices would also be determinant in conferring electrophysiological properties, such as the ability to generate a rhythm.

Within the yet unsegmented hindbrain, cells can be characterized by selective expression patterns of rhombomere-specific molecular markers. Evidence for early phenotypic choices during development came recently from the analysis of mutation-induced discrepancies between the actual location of precursor cells and their genetically-specified regional identity. For example, in *Hoxa1*^{-/-} mutants, ectopic patches of cells displaying an r2-like identity were found at the r4 axial level (83). This is remarkably similar to what is also observed in *Hoxb1*^{-/-} mice (20) and in the compound Hoxa1/Hoxb1 double mutant (84), congruent with the notion that Hoxb1 is a downstream target of Hoxa1 (12,85,86). In addition, patches of r2-like cells were also present at the level of r3 in *Hoxa1-/-* mutants (25,83). Thus, in the absence of Hoxa1, some neural precursors at the presumptive r3-r4 level acquire an r2 identity, whereas others maintain their appropriate molecular programs. This partial anteriorization of the cellular phenotype could be induced by lack of Hoxb1 activation in pre-r4 cells.

Misspecification of cell positional identity has been also observed after the inactivation of Hox-regulating factors. For example, in heterozygous (+/kr) and homozygous (kr/kr) *kreisler* mutant embryos, posteriorization of the cellular phenotype is observed in r3. This is probably due to the ectopic expression of kreisler/mafB itself and of its target Hoxa3 in r3, both normally expressed posterior to the r4/r5boundary (41,87,88). Moreover, in Krox20-null mutant embryos, analysis of even-numbered rhombomere molecular markers demonstrated that r3 cells acquire r2 or r4 identity, and r5 cells acquire r6 identity (89). Initial activation of Krox20 in a few cells leads to the segregation, homogenization, and possible expansion of territories to which Krox20 confers an oddnumbered identity (45).

Interestingly, populations of misspecified progenitor cells are not necessarily eliminated during later developmental stages. To investigate the developmental fate of ectopic r2-like precursors in *Hoxa1^{-/-}* mutants, cell-migration

patterns were examined (83). In wild-type E11.5 embryos, facial motoneurons born in r4 migrate caudally through r5 into r6 to form the facial motor nucleus, whereas trigeminal motoneurons migrate dorso-laterally in r2 and r3. In the *Hoxa1^{-/-}* mutant r4 region, a reduced number of facial motoneurons migrate caudally and an abnormal trigeminal-like dorsolateral migration of r4 cells is detected at E11.5 and completed at about E12.5. Remarkably, lack of caudal migration of facial motoneurons and lateral trigeminal-like migration are also observed in Hoxb1-/- mice (20). Thus, neurons with an anteriorized trigeminal-like phenotype appear to survive at the facial level of *Hoxa1* mutant hindbrains. These observations give insights into some of the mechanisms underlying early phenotypic choices that affect neuronal progeny at later developmental stages. They also provide animal models to evaluate after birth the physiological significance of these phenotypic choices in rhythm-generating neuronal networks of the hindbrain reticular formation.

Generation of a Novel Functional Circuit in the Dorsal Pons of *Hoxa1* Mutant Mice

Analysis of the breathing pattern using plethysmographic methods in vivo, revealed an abnormal behavioral control in Hoxa1-/- and +/kr mutant neonates that might result from abnormal specification of r3 and r4 cells during early development (83,90). Rhombomere (r4) elimination in Hoxa1-/- mutants correlates with a low neonatal respiratory frequency and death within 2.5 h (see Vital Role of a Para-Facial Anti-Apneic Neuronal System). However, *Hoxa1*^{-/-} newborns exhibiting a higher frequency at birth and major respecifications in r3 and r4, progressively increased their respiratory rate to normal values and survived for about 18 h (see Fig. 6B/C in ref. 83). Furthermore, comparison between wild-type and +/krmutant mice provided the first description of



Fig. 3. Anatomical location of the dorsal pontine $Hoxa1^{-/-}$ supernumerary neuronal structure (SNS) at birth. Rhombomeres are polyclonal developmental units in which a large variety of neuronal types develop. Therefore the $Hoxa1^{-/-}$ mutation not only affects reticular neurones: motoneurons provide important landmarks for the localization of anatomical deficits. (**A**,**B**) Horizontal sections of the dorsal pons showing cholineacetyltransferase immunoreactive pontine neurons in WT (**A**) and $Hoxa1^{-/-}$ (**B**) in the dorso lateral (5dl) and ventro medial (5vm) trigeminal motor nucleus and adjacent areas. Supernumerary motor nuclei nos. 1, 2, and 3 (from top [anterior] to bottom [posterior]) arrowheads in (B) are localized in the extended Rpc- α , at the level of the eliminated intracranial facial nerve (7n) and preganglionic facial neurons (7pgg). (**C**) Adjacent horizontal sections from dorsal (top) to ventral (bottom), showing retrograde Dil labelling the SNS motor nucleus no. 2 in an $Hoxa1^{-/-}$ mutant mouse. More ventral views (bottom) show a supernumerary dorso-ventral fasciculus (star) located laterally in subnucleus no. 2 and distinct from the WT-like trigeminal root located more rostrally (not shown).

an increased respiratory frequency congruent with abnormal cell specifications in r3 that are not associated with rhombomere elimination and lethality (90). Thus, one possibility is that misspecification of neuronal fates in mutant r3 and r4 might lead to rhythm controlling neuronal circuits that enhance survival rates by significantly increasing frequency values. Identification of these circuits in *Hoxa1*^{-/-} mutants required a combination of anatomical and in vitro physiological approaches.

In keeping with the abnormalities of the r3–r4 region at early developmental stages, the $Hoxa1^{-/-}$ mutation reorganized the anatomy of the Parvocellular Reticular Formation pars alpha (Rpc- α in Figs. 2 and 3A), which was

extended along the A-P axis. In addition, radial stripes of reticular formation and ectopic motoneurons alternate, forming a compound reticular and motor supernumerary neuronal structure (SNS in Fig. 3A). Ectopic motoneurons formed 3 distinct subnuclei (arrowheads in Fig. 3B) and a distinct dorso-ventral motor fasciculus running laterally, caudal to the normal trigeminal root (Fig. 3C). Therefore, abnormal cell specification in r3 and r4 leads, in the *Hoxa1*^{-/-} dorsal pontine domain, to the formation of 3 motor subnuclei alternating with stripes of reticular formation at the same location as the wild-type Rpc- α .

To identify the function of these reticular neurons, the hindbrain was isolated in vitro during the first postnatal days (P0–P1) and the dorsal pons was exposed in a thick horizontal slice, and made accessible to dorsal approach under microscopic control (83). This slice preparation also included the bilateral pBC (stars in Fig. 4) that generates a persisting rhythmic activity propagating to cranial (e.g., trigeminal) motor neurons from which it can be recorded. The SNS was stimulated by pressure application of the glutamatergic agonist α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleproprionic acid (AMPA). The contralateral trigeminal nerve (5n in Fig. 4) was recorded to avoid direct stimulation of motoneurons.

The Rpc- α is a dorsal pontine structure normally lacking respiratory-related functions (91; see Respiratory Behavioral Patterns at Different Stages of Development). Therefore, AMPA applications had no effect on rhythm frequency in the wild-type preparations. By contrast, in the mutant SNS, AMPA induced a robust increase in rhythm frequency, followed in all cases by a transient inhibition of the rhythm (Fig. 4). In the mutants, labeling the VRG with Dil revealed a robust axonal pathway, not present in the wild-type, and running laterally in the mutant pons (83). These results strongly suggest the presence of supernumerary functional efferent connections of the SNS to the rhythm generator (83). Moreover, rhythmic activity recorded from single neurons in the SNS area also indicated afferent connec-



Fig. 4. Functional connectivity of reticular neurons in the Hoxa1-/- supernumerary neuronal structure (SNS) at birth. (A) Schematic presentation of the slice preparation. Arrows: supernumerary connections in mutants from SNS (rectangle) to the rhythm generator (star); rectangle shows the approximate extent of the area affected by AMPA (a-amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleproprionic acid) applications (arrowhead, more medial applications were ineffective). (B) Modification of the contralateral trigeminal nerve activity (5n) induced by excitating SNS neuronal cell bodies using brief (25 ms) pressure applications of AMPA in *Hoxa1^{-/-}* hindbrain slices in vitro. Burst (upward deflections) frequency is significantly increased and decreased indicating a functional connection to the rhythm generator in Hoxa1-/-. This response is not seen in WT mice (83). 5n: trigeminal nerve; 5Mo: trigeminal motor nucleus; 9: glossopharyngian nucleus; 10: vagus nucleus; Pn: Pontine nucleus; VRG: ventral respiratory group.

tions from the rhythm generator. Thus, in $Hoxa1^{-/-}$ mutant mice, the SNS exhibits a novel relationship with the respiratory rhythm generator, while preserving premotor Rpc- α connections with the trigeminal system.

Altogether, the anatomo-functional analysis indicates that the *Hoxa1* mutation reorganizes the dorsal pons where a neuronal circuit, originating from the mutant r3–r4 region, is incorporated into the hindbrain neuronal network. As a consequence, the animal acquires a novel in vitro respiratory-promoting function, enhancing survival for several hours, although unable to abolish lethality of the *Hoxa1-/-* phenotype.

Vital Role of a Para-Facial Anti-Apneic Neuronal System

As shown above, phenotypic choices in r3 and r4 seem to initiate development of reticular circuits that stimulate respiratory rhythm generation. Respiratory consequences of the elimination of r3 and r4 in different mutants confirmed that these circuits are of vital physiological significance in mice during the first days after birth. Life-threatening deficiency of a central rhythm promoting system has been first described after the elimination of r3 and r5 in *Krox20^{-/-}* mice (92). This system, named "the anti-apneic system," has been located in the caudal pontine reticular formation by recording rhythmic activity from the isolated hindbrain.

Integrity of r3 and r4 Is Required for Survival After Birth

In vivo, Krox20^{-/-} neonates with impaired anti-apneic function show an abnormally low respiratory frequency and apneas lasting 10× longer than normal. Most of the animals die during the first 2 d after birth. The Krox20^{-/-} mutants do not allow to distinguish between r3 and r5. Nevertheless, observations of kr/kr mice indicate that the fate of neurons greatly differs in r3 and r5. In contrast to Hoxa1^{-/-} and Krox20^{-/-} mutants, kr/kr mice exhibit no life-threatening apneic pattern of breathing despite elimination of r5 and dramatic hypoplasia of the pontine reticular formation leading to an abnormal positioning of the ambiguus nucleus (90). Therefore, the anti-apneic system specified in r3 and r4 retain a vital importance for breathing after birth, while neurons specified in r5 do not.

All *Hoxa1*^{-/-} mutants die from central respiratory deficits and terminal apnea and the morphological analysis indicates a rather extensive cellular reorganization affecting ventrally the size of the reticular formation (*83*). A 40% reduction of the length of the ventral pons results from the hypoplasia of r4- and r5-derived structures (SO, 7Mo in Fig. 5), including the pFRG which, therefore, seems to be

essential for a stable, high frequency rhythm generation. Thus, comparison with *kr/kr* mutants suggests that apneas and lethality in *Hoxa1-/-* and *Krox20-/-* mutants results from the elimination of para-facial reticular structures originating from r4 and r3 respectively.

Naloxone Administration Improves Survival of Krox20^{-/-} and Hoxa1^{-/-} Mutants

In an attempt to improve survival of Krox20-/mutants, CO₂ and naloxone were used to respectively increase chemosensory stimulation or decrease opioid inhibition of the respiratory rhythm during the first postnatal day. The partial pressure of CO_2 in the arterial circulation, sensed by peripheral and central chemoreceptors, is a major chemical drive of respiration. Thus, *Krox20*^{-/-} animals were exposed to a CO₂enriched (4%) atmosphere during the severe apneic syndrome. The respiratory frequency was increased only for the duration of the CO₂ exposure and no stable improvement of the breathing pattern was obtained (92). Naloxone is an antagonist for μ and δ receptors through which opioid peptides exert a depressant modulatory control of respiratory rhythm (58) and impair interactions between pFRG and pBC respiratory oscillators (71). Subcutaneous naloxone administration to Krox20^{-/-} and Hoxa1^{-/-} animals increased the respiratory frequency for several hours. Furthermore, naloxone treatment definitively suppressed the occurrence of apneas and eliminated lethality during the first postnatal week (83,92). An apneic-like rhythmic activity is characterized in vitro by long periods during which the *Hoxa1*^{-/-} slice preparation is inactive. Naloxone administration suppresses selectively these silent periods (see Fig. 6). Observations in vivo and in vitro therefore indicate that neuromodulation by endogenous opioids contributes to the generation of life-threatening apneas that develop after impairment of the anti-apneic system, and that antagonists of the opioid neuro-transmission might provide effective pharmacological tools to be used when the neonatal anti-apneic function is disrupted.



0.5mm

Fig. 5. Ventral pontine hypoplasia in $Hoxa1^{-/-}$ mutants shown in sagittal sections of the hindbrain. Parasagittal sections of the hindbrain at PO in WT (left) and $Hoxa1^{-/-}$ (right) littermates. (A) Drawings of the entire hindbrain. (B) Lateral sections showing the ventral half of the pons extending from the rostral pole of the superior oliva (SO) to the caudal pole of the facial motor nucleus (7Mo). Note the dramatic hypoplasia of the ventral pons along the antero-posterior axis, affecting the area of the pFRG. Drawings, including the analysis of 5 $Hoxa1^{-/-}$ mice, include both lateral and medial structures; medial sections (in gray) show dorsal group of anomalies affecting the ventricular surface and the supernumerary neuronal structure. 4V: fourth ventricule; 4Va: anterior part of the fourth ventricule; 5Mo: trigeminal motor nucleus; 6Mo: abducens motor nucleus; 7Mo: facial motor nucleus; 12: hypoglossal nucleus; Amb: ambiguus nucleus; IO: inferior olive; IP: interpeduncular nucleus; mlf: medial longitudinal fasciculus; Nts: nucleus tractus solitarius; pBC (star): preBötzinger complex; pFRG: para-facial respiratory group; Pn: pontine nucleus; PnC: caudal pontine nucleus; scp: superior cerebellar peduncle (brachium conjunctivum).

Rhythm Controlling Systems Deriving from the r3–r4 Hindbrain Level

Assembling a Rhythm-Promoting Neuronal Network in Chick r3 and r4

As described above, a modification of the *Hox* expression pattern in r3 and r4 is sufficient to incorporate a novel neural control in the

mature hindbrain, suggesting that regulatory changes in adjacent rhombomeres r3 and r4 may be required for the generation of parafacial circuits controlling the respiration rhythm. Interestingly, assembling of a rhythmpromoting respiratory network also requires the two-segment functional unit r3–r4 in the chick (93). From the close of the segmental period in the chick embryo, (stage 24) until stage 28 (E4.5–5.5), the isolated hindbrain gen-



Fig. 6. Naloxone alleviates the apneic-like pattern of rhythmic activity generated by an $Hoxa1^{-/-}$ hindbrain isolated in vitro. Same experimental procedure as in Fig. 4; abnormal rhythmic pattern characterized by long inter-burst intervals alternating with periods of higher frequency during perfusion of the slice with a naloxone-free medium. Average changes in frequency (in ordinates) around peak-burst frequencies (taken as time zero in the abscissa) are shown on the right. This pattern resembles the periodic respiratory pattern described in the lamb fetus *in utero (84)*. Bath application of naloxone (1 μ *M*, 5 min) eliminates long interburst intervals. This mechanism is probably responsible for the naloxone-induced elimination of apneas in vivo. 5n: trigeminal nerve.

erates a low frequency primordial rhythmic pattern, with inter-burst intervals of more than 1 min. This is also seen in mice at E12. These frequencies are one order of magnitude lower than fetal and neonatal rhythms. A more mature activity with high frequency episodes appears at around E6 in chick and E13.5 in mouse (94). Electrophysiological analysis in chick revealed that onset of this episodic pattern coincides with the appearance of rhythmic inhibitions (93) resembling those recorded in pFRG neurons (63,67). The early establishment of this episodic central pattern prompted investigation of its origin in relation to hindbrain segmentation. This was done by recording activities at E7–7.5, from brain territories deriving from individual or pairs of rhombomeres isolated in situ at the time of their formation (E2). The r3r4 pair developed a normal episodic rhythm, while isolated r2, r4, and r2r3, r4r5 pairs did not. Therefore, r3 appears to be required for the generation of an episodic neuronal pattern in the caudal para-facial neighbor r4 or r4r5 (93). Altogether, experiments in mouse and chick show that perturbations of the rhombomeric patterning in r3 and r4 irreversibly alter the function of the parafacial neuronal network and can be reflected at birth by respiratory deficits.

Relevance for Life-Threatening Congenital Syndromes Affecting Respiration In Infants

Experiments on the sheep fetus *in utero* (95,96) demonstrate regular continuous breathing during early fetal development. In later stages fetus exhibits sleep apneas typical of the irregular respiratory pattern at birth. Because pontine surgical lesions restore continuous breathing, apneas were attributed to the development of a rostral control. Thus, para-facial anti-apneic neurons affected by the *Krox20* and *Hoxa1* mutations may counteract this control by turning the respiratory rhythm from intermittent to more continuous breathing in an opioid-sensitive manner. Such a role appears to be of vital importance at birth during a pre-

cise time window, extending in mice during the first 2 d after birth.

Therefore, the Hoxa1 and Krox20 mutant mice are of potential interest as animal models for pathophysiological studies. In humans lifethreatening apneas during early infancy result from a number of to date poorly understood etiologies including dysfunction of brainstem mechanisms (97,98) and patterns of segmental, homeobox-like, brainstem lesions (99). Distinct reflex reactions generated at different levels of the brainstem and observed in mice models point out at least 3 distinct syndromes indicative of abnormal embryonic development of hindbrain circuits. They might be detectable in human by scoring simple reflex reactions such as chemosensory reflexes affected in human congenital central hypoventilation syndrome (100,101) or the righting reflexes affected by *kr/kr* or *Hoxa1*^{-/-} syndromes (102). A failure of airways protective and startle reflexes during sleep of human infants in a prone position, is also suspected in the sudden death syndrome (103). Defects of the startle reflex may be part of the kr/kr or Hoxa1-/- syndromes or result from the elimination of r3-derived giant pontine reticular neurons eliminated by the *Krox20*^{-/-} mutation (92). Suction involves trigeminal premotor interneurons located in the Rpc- α (91). These dorsal pontine neurons are likely derived from r3, since Rpc- α is eliminated in *Krox20^{-/-}* mutants, which in addition exhibit an abnormal suction behavior after birth (92). In contrast, abnormalities of r4 in *Hoxa1*^{-/-} animals do not affect suction, indicating that developmental processes in r3 and r4 differentially affect the feeding behavior. These findings have considerable significance both on developmental and evolutionary grounds, indicating that hindbrain segmentation, particularly at the r3/r4 level, is essential for the normal development of adaptive behaviors controlled by the brainstem. The evolution of neural networks of multisegmental origin may be facilitated by the partitioning of the early hindbrain in a number of rhombomeric units initially developing as independent modules (8,81,104). Furthermore, because transcription

factors orchestrating hindbrain segmentation are organized in a regulatory network, a single mutation may have several consequences, so that prediction of neuronal deficits in patients is not straightforward. A point mutation may not necessarily eliminate function of neurons. Genetic abnormalities of hindbrain segmentation are potentially able to suppress (kr/kr, *Krox20*^{-/-}) or enhance (+/*kr*, *Hoxa1*^{-/-}) the function of respiration controlling neuronal system.

Acknowledgment

Work in Jean Champagnat's and Filippo M. Rijli's laboratories are supported by grant "Brainstem QLG2-CT-2001-01467 Genetics." Eduardo Dominguez del Toro was supported by CEE (BIO4-CT975-096) and FRM (EP001227/1) training grants.

References

- 1. Lumsden T. L. (1923) Observation on the respiratory centres in the cat. J. Physiol. 57, 153–160.
- 2. Harper R. M., Kinney H. C., Fleming P. J., and Thach B. T. (2000) Sleep influences on homeostatic functions: implications for sudden infant death syndrome. Respir. Physiol. 119(2–3), 123-132
- 3. Kobayashi S., Nishimura M., Yamamoto M., Akiyama Y., Kishi F., and Kawakami Y. (1993) Dyspnea sensation and chemical control of breathing in adult twins. Am. Rev. Respir. Dis. **139**, 1192–1198.
- 4. Redline S. R. and Tishler P. V. (2000) The genetics of sleep apnea. *Sleep Med. Rev.* **4**, 583–602.
- 5. Tankersley C. G., Fitzgerald R. S., Levitt R. C., Mitzner W. A., Ewart S. L., and Kleeberger S. R. (1997) Genetic control of differential baseline breathing pattern. J. Appl. Physiol. 82, 874–881.
- 6. Mortola J. P. (1987) Dynamics of breathing in newborn mammals. Physiol. Rev. 67, 187–234.
- 7. Lumsden A. and Keynes R. (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**, 424–428.
- 8. Lumsden A. (1990) The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. TINS 13, 329-335.

Molecular Neurobiology

Volume 28, 2003

- 9. Lumsden A. and Krumlauf R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109–1115.
- 10. Rijli F. M., Gavalas A., and Chambon P. (1998) Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the *Hox* selector genes. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 393–401.
- Dupe V., Davenne M., Brocard J., Dolle P., Mark M., Dierich A., Chambon P., and Rijli F. M. (1997) In vivo functional analysis of the *Hoxa-1 3'* retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124(2), 399–410.
- Studer M., Gavalas A., Marshall H., Ariza-McNaughton L., Rijli F. M., Chambon P., and Krumlauf R. (1998) Genetic interactions between *Hoxa1* and *Hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125, 1025–1036.
- 13. Gavalas A. and Krumlauf R. (2000) Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10(4)**, 380–386.
- 14. Graham A., Maden M., and Krumlauf R. (1991) The murine *Hox-2* genes display dynamic dorsoventral patterns of expression during central nervous system development. *Development* **112(1)**, 255–264.
- Tiret L., Le Mouellic H., Maury M., and Brulet P. (1998) Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of *Hoxc-8* deficient mice. *Development* **125**, 279–291.
- Davenne M., Maconochie M. K., Neun R., Pattyn A., Chambon P., Krumlauf R., and Rijli F. M. (1999) *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* 22, 677–691.
- Gaufo G. O., Flodby P., and Capecchi M. R. (2000) *Hoxb1* controls effectors of sonic hedgehog and *Mash1* signaling pathways. *Development* 127, 5343–5354.
- 18. Mark M., Lufkin T., Vonesh J. L., et al. (1993) Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development* **119**, 319–338.
- Carpenter E. M., Goddard J. M., Chisaka O., Manley N. R., and Capecchi M. R. (1993) Loss of *Hoxa1 (Hox-1.6)* function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* 118, 1063–1075.
- Studer M., Lumsden A., Ariza-McNaughton L., Bradley A., and Krumlauf R. (1996) Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking *Hoxb-1*. *Nature* 384, 630–634.

- 21. Goddard J. M., Rossel M., Manley N. R., and Capecchi M. R. (1996) Mice with targeted disruption of *Hoxb-1* fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* **122**, 3217–3228.
- 22. Barrow J. R. and Capecchi M. R. (1996) Targeted disruption of the *Hoxb-2* locus in mice interferes with expression of *Hoxb-1* and *Hoxb-4*. *Development* **122(12)**, 3817–3828.
- 23. Gavalas A., Davenne M., Lumsden A., Chambon P., and Rijli F. M. (1997) Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**, 3683–3691.
- 24. Gavalas A., Studer M., Lumsden A., Rijli F. M., Krumlauf R., and Chambon P. (1998) *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* **125**, 1123–1136.
- Helmbacher F., Pujades C., Desmarquet C., Frain M., Rijli F. M., Chambon P., and Charnay P. (1998) *Hoxa1* and *Krox-20* synergize to control the development of rhombomere 3. *Development* 125, 4739–4748.
- 26. Rossel M. and Capecchi M. R. (1999) Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* **126**, 5027–5040.
- 27. Jungbluth S., Bell E., and Lumsden A. (1999) Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual *Hox* genes. *Development* **126**, 2751–2758.
- 28. Bell E., Wingate R. J., and Lumsden A. (1999) Homeotic transformation of rhombomere identity after localized *Hoxb1* misexpression. *Science* **284**, 2168–2171.
- 29. Barrow J. R., Stadler H. S., and Capecchi M. R. (2000) Roles of *Hoxa1* and *Hoxa2* in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* **127(5)**, 933–944.
- Pasqualetti M., Neun R., Davenne M., and Rijli F. M. (2001) Retinoic acid rescues inner ear defects in *Hoxa1* deficient mice. *Nat Genet.* 29(1), 34–39.
- 31. Pasqualetti M. and Rijli F. M. (2001) Homeobox gene mutations and brain-stem developmental disorders: learning from knockout mice. *Curr Opin Neurol.* **14(2)**, 177–184.
- 32. Pattyn A., Vallstedt A., Dias J. M., Samad O. A., Krumlauf R., Rijli F. M., Brunet J. F., and Ericson J. (2003) Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotoner-gic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev.* **17(6)**, 729–737.

290

- 33. Maves L., Jackman W., and Kimmel C. B. (2002) FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* **129**, 3825–3837.
- 34. Walshe J., Maroon H., McGonnell IM., Dickson C., and Mason I. (2002) Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Curr. Biol.* **12**, 1117–1123.
- 35. Marin F. and Charnay P. (2000) Hindbrain patterning: FGFs regulate *Krox20* and *mafB/kr* expression in the otic/preotic region. *Development* **127**, 4925–4935.
- Waskiewicz A. J., Rikhof H. A., and Moens C. B. (2002) Eliminating zebrafish PBX proteins reveals a hindbrain ground state. *Dev. Cell* 3, 723–733.
- Hertwig P. (1942) Sechs neue Mutationen bei der Hausmaus in ihrer Bedeutung für allgemeine Vererbungsfragen. YX. Menschl. Vererbgslehre 26, 1–21.
- Hertwig P. (1944) Die Genese der Hirn- und Gehörorganmiβbildungen bei röntgenmutierten Kreisler-Maüsen. Zeit. Konstlehre 28, 327–354.
- 39. Deol M. S. (1964) The abnormalities of the inner ear in *kreilser* mice. J. Embryol. Exp. Morphol. **12**, 475–490.
- Manzanares M., Cordes S., Kwan C. T., Sham M. H., Barsh G. S., and Krumlauf R. (1997) Segmental regulation of *Hoxb3* by *kreisler*. *Nature* 387, 191–195.
- 41. Manzanares M., Cordes S., Ariza-McNaughton L., Sadl V., Maruthainar K., Barsh G. S., and Krumlauf R. (1999) Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development* **726(4)**, 759–769.
- 42. Wilkinson D. G., Bhatt S., Chavrier P., Bravo R., and Charnay P. (1989) Segment-specific expression of a zinc finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* **337**, 461–464.
- 43. Sham M. H., Vesque C., Nonchev S., et al. (1993) The zinc finger gene *Krox20* regulates *Hoxb-2* (*Hox 2.8*) during hindbrain segmentation. *Cell* **72(2)**, 183–196.
- 44. Nonchev S., Maconochie M., Vesque C., et al. (1996) The conserved role of *Krox20* in directing *Hox* gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(18)**, 9339–9345.
- 45. Giudicelli F., Taillebourg E., Charnay P., and Gilardi-Hebenstreit P. (2001) *Krox20* patterns

the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev.* **15(5)**, 567–580.

- 46. Schneider-Maunoury S., Topilko P., Seitandou T., et al. (1993) Disruption of *Krox20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* **75(6)**, 1199–1214.
- Schneider-Maunoury S., Seitanidou T., Charnay P., and Lumsden A. (1997) Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of *Krox-*20 mouse mutants. *Development* **124**, 1215–1226.
- Swiatek P. J. and Gridley T. (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in *Krox20^{-/-}* mice for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20. Genes Dev.* 7(11), 2071–2084.
- 49. Rovainen C. M. (1996) Feeding and breathing in lampreys. *Brain Behav. Evol.* **48(5)**, 297–305.
- 50. Wild J. M. (1993) The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. *Brain Res.* **606**, 319–324.
- Pack A. I. (1993) In: *Respiratory Control* (Speck, D. F., Dekin, M. S., Revelette, W. R. and Frazier, D. T., eds). Univ. Press of Kentucky, Lexington, pp. 52–57.
- McLean H. A., Perry S. F., and Remmers J. E. (1995) Two regions in the isolated brainstem of the frog that modulate respiratory-related activity. *J. Comp. Physiol.* **177(2)**, 135–144.
- 53. Wilson R. J., Vasilakos K., Harris M. B., Straus C., and Remmers J. E. (2002) Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *J. Physiol.* **540(2)**, 557–570.
- 54. Takeda R., Remmers J. E., Baker J. P., and Farber J. P. (1986) Postsynaptic potentials of bulbar respiratory neurons of the turtle. *Respir. Physiol.* **64**, 149–160.
- Fortin G., Foutz A. S., and Champagnat J. (1994) Respiratory rhythm generation in chick hindbrain: effects of MK-801 and vagotomy. *NeuroReport* 5(9), 1137–1140.
- 56. Milsom W. K. (1991) Intermittent breathing in vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 87–105.
- Perry S. F., Wilson R. J., Straus C., Harris M. B., and Remmers J. E. (2001) Which came first, the lung or the breath? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **129(1)**, 37–47.
- Bianchi A. L., Denavit-Saubié M., and Champagnat J. (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* 75, 1–45.

- 59. Richter D. W. and Spyer K. M. (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci.* **24(8)**, 464–472.
- 60. Suzue T. (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.* **354**, 173–183.
- 61. Smith J. C., Ellenberger H. H., Ballanyi K., Richter D. W., and Feldman J. L. (1991) Pre-Bötzinger complex: a region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726–729.
- 62. Di Pasquale E., Monteau R., and Hilaire G. (1992) *In vitro* study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp. Brain Res.* **89**, 459–464.
- 63. Onimaru H. and Homma I. (1987) Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* **403(2)**, 380–384.
- 64. Gray P. A., Rekling J. C., Bocchiaro C. M., and Feldman J. L. (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* **286**, 1566–1568.
- 65. Lieske S. P., Thoby-Brisson M., Telgkamp P., and Ramirez J. M. (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat. Neurosci.* **3(6)**, 600–607.
- 66. Borday V., Kato F., and Champagnat J. (1997) A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. *NeuroReport* **8**, 3679–3683.
- 67. Onimaru H. and Homma I. (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J. Neurosci.* **23(4)**, 1478–1486.
- 68. Denavit-Saubie M., Champagnat J., and Zieglgansberger W. (1978) Effects of opiates and methionine-enkephalin on pontine and bulbar respiratory neurones of the cat. *Brain Res.* **155(1)**, 55–67.
- 69. Morin-Surun M.-P., Boudinot E., Gacel G., Champagnat J., Roques B. P., and Denavit-Saubie M. (1984) Different effects of mu and delta opiate agonists on respiration. *Eur. J. Pharmacol.* **98(2)**, 235–240.
- Morin-Surun M.-P., Boudinot E., Dubois C., et al. (2001) Respiratory function in adult mice lacking the mu-opioid receptor: role of deltareceptors. *Eur. J. Neurosci.* 13(9), 1703–1710.

- Mellen N. M., Janczewski W. A., Bocchiaro C. M., and Feldman J. L. (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37(5), 821–826.
- 72. Morin-Surun M. P., Boudinot E., Kato F., Foutz A. S., and Denavit-Saubié M. (1995) Involvement of NMDA receptors in the respiratory phase transition is different in the adult guinea pig in vivo and in the isolated brainstem preparation. *J. Neurophysiol.* 74, 770–778.
- 73. Blanco C. E. (1994) Maturation of fetal breathing activity. *Biol. Neonate* **65**, 182–188.
- 74. Jansen A. H. and Chernick V. (1983) Development of respiratory control. *Physiol. Rev.* 63, 437–483.
- Ramirez J. M., Quellmalz U. J., and Richter D. W. (1996) Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J. Physiol.* 491, 799–812.
- DeVries J. I. P., Visser G. H. A., and Prechtl H. F. R. (1982) The emergence of behavior. I. Qualitative aspects. *Early Hum. Dev.* 7, 301–322.
- 57. Suzue T. (1994) Mouse fetuses in late gestation maintained *in vitro* by transplacental. *Neurosci. Res.* 21, 173–176.
- 78. Greer J. J., Smith J. C., and Feldman J.. (1992) Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brainstem-spinal cord *in vitro*. *J. Neurophysiol.* **67**, 996–999.
- 79. Fortin G., Champagnat J., and Lumsden A. (1994) Onset and maturation of branchiomotor activities in the chick hindbrain. *NeuroReport* **5(9)**, 1149–1152.
- Fortin G., Kato F., Lumsden A., and Champagnat J. (1995) Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J. Physiol.* 486(3), 735–744.
- 81. Clarke J. D. and Lumsden A. (1993) Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development* **118**, 151–162.
- 82. Lumsden A., Clarke J. D. W., Keynes R., and Fraser S. (1994) Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of chick embryo hindbrain. *Development* **120(6)**, 1581–1589.
- 83. Domínguez del Toro E., Borday V., Davenne M., Neun R., Rijli F. M., and Champagnat J. (2001) Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J. Neurosci.* **21(15)**, 5637–5642.

- 84. Gavalas A., Trainor P., Ariza-McNaughton L., and Krumlauf R. (2001) Synergy between *Hoxa1* and *Hoxb1*: the relationship between arch patterning and the generation of cranial neural crest. *Development* **128(15)**, 3017–3027.
- 85. Popperl H., Bienz M., Studer M., Chan S. K., Aparicio S., Brenner S., Mann R. S., and Krumlauf R. (1995) Segmental expression of *Hoxb-1* is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell* 81(7), 1031–1042.
- 86. Di Rocco G., Mavilio F., and Zappavigna V. (1997) Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific *Hox-Pbx* complex. *EMBO J.* **16(12)**, 3644–3654.
- 87. Giudicelli F., Gilardi-Hebenstreit P., Mechta-Grigoriou F., Poquet C., and Charnay P. (2003) Novel activities of *Mafb* underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Dev. Biol.* **253**, 150–162.
- 88. Manzanares M., Trainor P. A., Nonchev S., et al. (1999) The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. *Dev. Biol.* **211**, 220–237.
- Voiculescu O., Taillebourg E., Pujades C., Kress C., Buart S., Charnay P., and Schneider-Maunoury S. (2001) Hindbrain patterning: *Krox20* couples segmentation and specification of regional identity. *Development* 128, 4967–4978.
- Chatonnet F., Domínguez del Toro E., Voiculescu O., Charnay P., and Champagnat J. (2002) Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 15, 684–692.
- Lund J. P., Kolta A., Westberg K. G., and Scott G. (1998) Brainstem mechanisms underlying feeding behaviors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 718–724.
- 92. Jacquin T. D., Borday V., Schneider-Maunoury S., Topilko P., Ghilini G., Kato F., Charnay P., and Champagnat J. (1996) Reorganisation of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox-20* knockout mice. *Neuron* **17**, 747–758.
- Fortin G., Jungbluth S., Lumsden A., and Champagnat J. (1999) Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat. Neurosci.* 2, 873–877.

- 94. Abadie V., Champagnat J., and Fortin F. (2000) Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport* **11(1)**, 141–145.
- Dawes G. S., Gardner W. N., Johnston B. M., and Walker D. W. (1983) Breathing in fetal lambs: the effect of brainstem section. *J. Physiol.* 335, 535–553.
- 96. Hanson M. A. (1988) The importance of baroand chemoreflexes in the control of the fetal cardiovascular system. *J. Dev. Physiol.* **10(6)**, 491–511.
- Kinney H. C., Filiano J. J., Sleeper L. A., Mandell F., Valdes-Dapena M., and Frost White W. (1995) Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Science* 269, 1446–1450.
- 98. Vert P., Aranda J. V., Catz C., and Yaffe S. (1994) Control of breathing during development, Apnea of the newborn, and in Sudden Infant Death Syndrome: In *Biol. Neonate* (J. P. Relier, ed.). Karger, Basel, Switzerland, pp. 133–280.
- 99. Cortez S. C. and Kinney H. C. (1996) Brainstem tegmental necrosis and olivary hypoplasia: a lethal entity associated with congenital apnea. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 841–849.
- 100. Erickson J. T., Conover J. C., Borday V., Champagnat J., and Katz D. M. (1996) Mice lacking BDNF exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. J. Neurosci. 16, 5361–5371.
- 101. Gozal D. and Harper R. M. (1999) Novel insights into congenital central hypoventilation syndrome. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **5(6)**, 335–338.
- 102. Abadie V., Champagnat J., Fortin G., and Couly G. (1999) Sucking-deglutition-respiration and brain stem development genes. *Arch. Pediatr.* **6**, 1043–1047.
- 103. Lijowska A., Reed N., Chiodini B., and Thach B. (1995) Sequential reflex behavior leading to airway defense maneuvers and arousal from sleep in infants. *Respirat. Crit. Care Med.* 151, A151.
- 104. Champagnat J. and Fortin G. (1996) Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *TINS* **20**, 119–124.

DISCUSSION GÉNÉRALE


Fig. 21. Phénotypes fonctionnels liés aux divers défauts de segmentation embryonnaire étudiés.

À gauche sont indiqués les différents contextes étudiés, ainsi que les troubles de la segmentation embryonnaire qu'ils provoquent (voir Figure 17).

À droite sont indiqués les comportements respiratoires typiques de chaque contexte, observés à la naissance.

Notons que les mutations $Hoxa2^{-}$ et kr/kr qui affectent respectivement r2 et r5 n'induisent pas de modifications de la fréquence respiratoire, suggérant que les territoires dérivés de ces rhombomères ne participent pas au contrôle de la fréquence chez les souris nouveau-nées.

Par contre, tous les contextes modifiant le segment r3/r4 entraînent des altérations de la fréquence respiratoire et / ou des apnées à la naissance. Ainsi, la comparaison des ces différents phénotypes nous permet de délimiter une zone réduite à r3/r4, à l'origine d'un système "antiapnéique" para-facial, actif dans les premiers jours postnataux et vital à la naissance chez la souris. Ce système est distinct et séparé anatomiquement du générateur respiratoire médullaire.

Discussion générale

Mise en place du réseau neuronal respiratoire : l'importance des mécanismes de segmentation.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que la perturbation des phénomènes de segmentation du tronc cérébral a des conséquences directes sur la rythmogenèse respiratoire à la naissance. Notre objectif était d'établir un lien entre un processus développemental, la segmentation, et la physiologie ventilatoire à la naissance. La description de phénotypes anatomo-fonctionnels distincts pour chacun des groupes d'animaux comparés à leurs congénères sauvages nous a permis d'identifier plusieurs mécanismes conduisant à la transformation du réseau neuronal respiratoire (Figure 21). La comparaison des phénotypes fonctionnels des mutants *Hoxa2^{-/-}* (publication 1) et des mutants homozygotes *kreisler* (publication 2) avec ceux de mutants étudiés précédemment, *Krox20^{-/-}* (Jacquin et al., 1996) et *Hoxa1^{-/-}* (Domínguez del Toro et al., 2001), nous a permis de faire l'hypothèse d'une structure modulaire du réseau neuronal respiratoire (publication 3), en particulier concernant l'existence d'un système anti-apnéique, issu de r3/r4 et distinct du groupe rythmogène médullaire.

L'analyse des animaux portant l'invalidation du gène de l'acétylcholine estérase (publication 4) a mis en évidence des phénomènes de compensation tandis que les défauts d'origine segmentaire paraissent irréversibles. En effet, l'étude des mutants hétérozygotes *kreisler* (publication 2) et l'approche pharmacologique par traitement avec de faibles doses d'acide rétinoïque (publication 5) montrent que de faibles perturbations du programme segmentaire induisent des modifications irréversibles du comportement respiratoire. Ces résultats permettent de prédire le rôle prédominant de la région para-faciale du tronc cérébral et du contrôle opioïde médullaire dans la génération d'un rythme respiratoire stable et régulier (publication 6). Ces résultats démontrent aussi que les mécanismes de segmentation du rhombencéphale interviennent dans la mise en place du réseau neuronal responsable de la rythmogenèse respiratoire à la naissance.

1. Contrôle du comportement respiratoire pendant la première semaine postnatale par les systèmes neuronaux issus de r3/r4.

Les travaux présentés dans cette étude montrent qu'il existe plusieurs comportements respiratoires chez les souris nouveau-nées normales. Par exemple, au cours de la première journée après la naissance, la fréquence respiratoire est très variable, des épisodes de respiration apnéique et des phases de respiration épisodique sont observés, contribuant à une grande irrégularité du comportement respiratoire. Chez l'animal normal, un stade de régularisation qui se situe au cours de la deuxième journée postnatale est observé. Nous avons trouvé que les irrégularités respiratoires néonatales sont exagérées par des anomalies touchant sélectivement les mécanismes de segmentation embryonnaire responsables de la mise en place du domaine r3/r4.

1.1 La fréquence respiratoire au repos.

Au cours de la première semaine postnatale, la respiration calme dans des conditions de normoxie évolue pour suivre les besoins du nouveau-né. Ainsi, la fréquence respiratoire *in vivo* augmente avec l'âge, passant de 100 cycles / min à la naissance à environ 220 cycles / min à P7. Chez certains mutants présentant des anomalies dans la formation de r3 ou de r4, tels que $Krox20^{-/-}$ (Jacquin et al., 1996) ou $Hoxa1^{-/-}$ (Domínguez del Toro et al., 2001), la fréquence respiratoire de base est très réduite, produisant une insuffisance respiratoire observée jusqu'à la mort prématurée des animaux dans les premières 48 heures suivant la naissance.

Au contraire, d'autres mutants que nous avons étudiés ne paraissent pas affectés par les défauts de développement en ce qui concerne leur fréquence respiratoire. Ainsi, les mutants homozygotes *kreisler* (*kr/kr*) et *Hoxa2^{-/-}* montrent à la naissance une fréquence respiratoire proche de celle de leurs congénères sauvages, malgré des atteintes sérieuses au niveau du tronc cérébral, concernant respectivement l'élimination des territoires dérivés de r5 et la re-spécification de r2 en un territoire proche de r1. Ces résultats montrent que le contrôle de la fréquence à la naissance pourrait dépendre d'un système accélérateur du rythme impliquant r3/r4, mais non pas r2 (affecté par la mutation *Hoxa2^{-/-}*), ni r5 (éliminé par la mutation *kr/kr*).

La mise en évidence de ce système accélérateur s'est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, un groupe de neurones ectopiques et accélérateurs du rythme respiratoire a été identifié chez les mutants $Hoxa1^{-/-}$, dans un contexte physiologique très anormal. Ensuite, nos travaux sur les mutants hétérozygotes *kreisler* (+/*kr*) ont montré pour la première fois qu'une modification de la segmentation qui n'entraîne pas de déficit anatomique majeur peut induire une fréquence respiratoire plus grande que la normale à la naissance. Aucune diminution du volume inspiratoire ne vient compenser cette augmentation de fréquence, conduisant à un volume minute plus élevé chez les souris +/*kr*. Ces animaux présentent donc une respiration qui correspond à des stades plus matures. La différence de fréquence de ces animaux +/*kr* avec leurs congénères sauvages s'estompe à la fin de la première semaine postnatale, suggérant que la mutation augmente l'efficacité d'un contrôle accélérateur du rythme respiratoire actif pendant les premiers jours après la naissance.

Ainsi, la première semaine postnatale est une période critique de maturation de la fréquence respiratoire chez les rongeurs. Le fait que ces animaux naissent relativement immatures et que leur croissance est rapide fournit une explication raisonnable des phénomènes d'adaptation allométrique de la fréquence respiratoire aux modifications de l'organisme (Mortola, 1984,1987). Mais par ailleurs, la fréquence respiratoire est aussi fixée en partie génétiquement, puisque les processus de développement du tronc cérébral, en particulier la segmentation embryonnaire du rhombencéphale au niveau de r3/r4, contrôlent la physiologie du rythme ventilatoire à la naissance.

1.2 La respiration apnéique.

1.2.1 Occurrence des apnées dans les différents contextes mutants.

L'existence d'épisodes d'apnées au cours de la respiration des rongeurs pendant les premiers jours postnataux est un phénomène normal (Mortola, 1984,1987; Borday, 1997). Ces apnées sont présentes surtout pendant le premier jour, elles participent alors à l'irrégularité du rythme respiratoire. Elles se dissipent ensuite et vers le troisième jour suivant la naissance, les apnées deviennent rares puis inexistantes chez les individus sauvages.

Chez un certain nombre de mutants de gènes de développement, au contraire, ces épisodes apnéiques sont beaucoup plus nombreux, et représentent une fraction plus importante des temps d'enregistrements. C'est le cas chez les mutants $Krox20^{-/-}$ ou $Hoxa1^{-/-}$. Pour les premiers, il a été mis en évidence (cf. résultats, chapitre 1) que ces épisodes d'apnées étaient beaucoup plus fréquents et aussi que leur durée était plus grande que celle des

événements apnéiques de leur congénères sauvages. Cette déficience respiratoire conduit finalement à la mort prématurée des animaux $Krox20^{-/-}$ autour de 18 heures après la naissance. Cette caractéristique a été retrouvée chez les mutants $Hoxa1^{-/-}$, qui présentent aussi une mortalité accrue au cours de leur premier jour de vie (cf. résultats, chapitre 1).

Dans tous les cas où l'occurrence et la durée des épisodes apnéiques augmentent (*Krox20^{-/-}, Hoxa1^{-/-}*), ce phénomène est associé à une faible fréquence respiratoire. Cette observation suggère que le système accélérateur du rythme respiratoire possède aussi des propriétés anti-apnéiques. À l'appui de cette hypothèse, il est important de noter que dans le cas des animaux +/*kr*, chez lesquels la fréquence respiratoire est anormalement élevée, la durée des apnées est particulièrement faible (cf. publication 2). L'analyse de la respiration *in vivo* et *in vitro* nous a permis de conclure à une hyperactivité du système anti-apnéique. En effet les animaux +/*kr* possèdent un phénotype en « image miroir » de celui des animaux *Krox20^{-/-}*. De plus, la région concernée par les modifications du développement est la même (r3). Ces observations suggèrent qu'un mécanisme commun élimine les apnées et augmente la fréquence respiratoire au cours des premiers jours après la naissance.

1.2.2 Effets des neuromodulateurs opioïdes.

Les expériences utilisant la naloxone montrent que le système neuronal contrôlant les apnées et la fréquence respiratoire n'est physiologiquement significatif que pendant les premiers jours postnataux. Chez les animaux mutants présentant beaucoup d'apnées, l'injection de naloxone in vivo permet de réduire la force de l'inhibition pontique enképhalinergique (Arvidsson et al., 1995). L'injection doit être réalisée dans une fenêtre de temps très précise pour être efficace : suffisamment tôt au cours du premier jour de vie pour que l'animal ne présente pas de troubles physiologiques irréversibles dus à l'hypoventilation, et suffisamment tard pour que la stimulation respiratoire permette à l'animal d'atteindre un stade développemental au cours duquel la ventilation se régularise. Ce traitement augmente la fréquence respiratoire et réduit l'occurrence des apnées chez les animaux Krox20^{-/-}, qui franchissent ainsi le cap décisif et survivent jusqu'à trois semaines après la naissance, étant ensuite victimes de défauts de myélinisation des axones à partir de la deuxième semaine postnatale (Topilko et al., 1994). Chez les animaux Hoxa1^{-/-}, le même type de traitement produit des effets similaires, entraînant aussi une meilleure survie (cf. publication 6). L'injection de naloxone chez les mutants +/kr, augmente encore plus une fréquence respiratoire déjà anormalement haute. Il semble donc que le système de contrôle respiratoire

par les neuromodulateurs opioïdes joue une rôle déterminant dans les premières heures de vie postnatale.

En revanche, les animaux mutants $Hoxa2^{-/-}$ présentent un nombre d'apnées un peu plus important que leurs congénères sauvages, mais sans toutefois atteindre l'intensité des épisodes apnéiques observées chez les souris $Krox20^{-/-}$. De plus, ces animaux sont eux aussi soumis à une mort précoce entre 12 et 18 heures après la naissance. Cependant, l'injection de naloxone *in vivo* n'a pas d'effet sur la survie de ces animaux, traduisant probablement des problèmes autres que respiratoires. En effet, les souris $Hoxa2^{-/-}$ présentent de nombreux défauts du squelette maxillo-facial (Rijli et al., 1993 ; Couly et al., 1998 ; Creuzet et al., 2002) et ne semblent pas capable de s'alimenter correctement par eux-mêmes (cf. publication 1).

Au total, nos résultats suggèrent qu'un système neuronal issu de r3/r4 augmente la fréquence respiratoire et diminue les apnées. Dans la mesure où ce sont les apnées qui affectent le plus dramatiquement le volume d'air inspiré et qu'elles sont donc responsables des insuffisances respiratoires létales, nous proposons de nommer ce système « anti-apnéique ».

1.3 La respiration épisodique.

Ce système anti-apnéique semble jouer un rôle vital pendant les premiers jours après la naissance, puis son importance décroît par la suite. Les observations réalisées après l'administration d'acide rétinoïque suggèrent cependant qu'il continue à être fonctionnel pendant la première semaine postnatale.

En effet, le traitement par l'acide rétinoïque exagère un type particulier de comportement respiratoire observé spontanément à la naissance lors des études pléthysmographiques et consistant en épisodes de polypnées, caractérisés par une grande amplitude qui s'accroît puis décroît, leur donnant une forme particulière. Ces événements de respiration polypnéique ou « épisodique » sont parfois suivis ou précédés d'une apnée plus ou moins longue, amenant peut-être à une compensation du volume inspiré. Cette respiration épisodique est normalement observée entre le premier jour et le troisième jour postnatal environ, puis ce phénomène disparaît rapidement, même si de rares moments de respiration épisodique peuvent encore être observés jusqu'à la fin de la première semaine postnatale.

Cette respiration épisodique n'est pas sans rappeler la respiration décrite dans un certain nombre de pathologies humaines affectant l'adulte (respiration dite de « Cheyne-

Stokes ») ou le nourrisson (Cherniack & Longobardo, 1986 ; Di Fiore et al., 2001 ; Weintraub et al., 2001 ; Strohl, 2003). Nous avons observé que le traitement pré-natal des embryons avec des doses non-tératogènes d'acide rétinoïque entraînait une augmentation de la fréquence de ces moments de respiration épisodique, ainsi que la persistance de ce comportement au cours de toute la première semaine suivant la naissance. Cette respiration épisodique est associée à des modifications anatomiques et électrophysiologiques localisées dans la région pontique para-faciale, en particulier autour du point de sortie du nerf facial, situé dans les territoires dérivés de r4. Il peut donc paraître surprenant que ce type de comportement respiratoire n'ait pas été observé chez des animaux mutants pour des gènes de développement affectant aussi cette région et qui sont partiellement sous le contrôle de l'acide rétinoïque, comme les animaux *Hoxa1^{-/-}*. Cependant, les animaux *Hoxa1^{-/-}* meurent très rapidement et n'ont peut-être pas le temps de mettre en place ce type de respiration épisodique. En fait, les anomalies importantes du système anti-apnéique sont létales avant l'apparition de ces épisodes de respiration de grande amplitude. Par contre, chez les animaux traités avec de faibles doses d'acide rétinoïque, la durée et la fréquence des apnées ne diffèrent pas de celles des animaux non traités, montrant que le système anti-apnéique est fonctionnel chez ces animaux pendant la période critique des premiers jours postnataux. Ces résultats suggèrent que la respiration épisodique pourrait résulter d'un anomalie du stade de maturation qui marque la fin du rôle vital du système anti-apnéique.

1.4 Le contrôle chémosensoriel.

Les anomalies respiratoires décrites ci-dessus sont tout à fait différentes de celles observées chez les animaux déficitaires pour le contrôle chémosensoriel réflexe tels que les mutants $bdnf^{\prime-}$ (Erickson et al., 1996), $gdnf^{\prime-}$ (Erickson et al., 2001), $Ret^{\prime-}$, $phox2b^{+\prime-}$ (voir Amiel et al., 2003). Lors de la maturation normale de la respiration et de son contrôle chez les animaux sauvages, la régulation chémosensorielle périphérique évolue pendant la vie postnatale. Au cours des premières semaines postnatales, le contrôle chémosensoriel périphérique se développe et les réponses aux stimulus hypoxique et hyperoxique sont modifiées (cf. introduction).

L'analyse de la respiration *in vivo* chez les mutants +/kr et chez les individus traités à l'acide rétinoïque ne montre pas de différence dans les réponses au stimuli gazeux, ce qui paraît normal puisque les niveaux touchés ne concernent pas les zones impliquées dans le contrôle chémosensoriel, mais des territoires beaucoup plus antérieurs (r3-r4). Au contraire,

chez les mutants kr/kr, le rhombomère 6 subit des modifications partielles d'identité (Manzanares et al., 1999b), affectant en particulier au niveau de l'expression de *phox2b*, un gène de neurogenèse fortement impliqué dans le développement de l'arc chémoréflexe (Goridis & Brunet, 1999 ; Pattyn et al., 2000b). Or nous avons montré que ces mutants kr/kr possédaient des défauts dans la réponse tardive aux stimuli hypoxique et hyperoxique (cf. publication 2). Ainsi, des modifications de l'expression de gènes de développement exprimés postérieurement à r5 peuvent avoir des conséquences sur le contrôle chémosensoriel de la respiration. Il s'agit sans doute d'une anomalie de la chémosensibilité centrale car l'analyse anatomique de ces mutants montre que le tractus solitaire est toujours présent et que le volume du NTS reste inchangé. En revanche, la région rostrale de la medulla, qui dérive probablement de r5/r6, est déjà connue pour contenir des neurones en relation avec le réseau neuronal respiratoire, tels que les neurones du noyau rétrotrapézoïde, qui interviennent dans la médiation de la chémosensibilité (Nattie, 2001 ; Bodineau et al., 2000c ; Bodineau et al., 2001, cf. introduction).

Chez les mutants $Hoxa1^{-/-}$, les ganglions sensoriels des nerfs vague et glossopharyngien sont fortement réduits, ce qui entraîne une absence d'afférentation du NTS par les axones des neurones chémosensoriels (Lufkin et al., 1991 ; Mark et al., 1993). Ces animaux mourrant très précocement au cours de leur premier jour de vie, il n'est pas possible de tester leur système de réponse chémosensoriel. Cependant ces résultats nous informent sur un autre mode d'intervention des gènes de développement sur la construction du système chémosensoriel. En effet, la segmentation du rhombencéphale, à laquelle participe Hoxa1 (cf. introduction, Mark et al., 1993 ; Rossel & Capecchi, 1999 ; Barrow et al., 2000), concerne aussi les crêtes neurales qui participent à l'élaboration des ganglions sensoriels crâniens et donc à la spécification des neurones chémosensoriels. Si ces populations neuronales sont modifiées, il s'ensuit des anomalies au niveau non plus de la génération du rythme respiratoire mais de son contrôle par les chémorécepteurs périphériques, responsables de l'adéquation de la ventilation aux paramètres environnementaux.

Nos résultats et les études antérieures montrent que le système de contrôle chémosensoriel central ou périphérique peut être affecté par les mutations des gènes de développement touchant r5 ou r6, mais que ces anomalies peuvent apparaître indépendamment d'une atteinte du système anti-apnéique issu de r3/r4.

1.5 Modification sélective du volume inspiratoire chez les mutants Hoxa2^{-/-}.

Le volume inspiratoire augmente rapidement au cours des premières heures postnatales et suit ensuite l'évolution de la masse corporelle, de sorte que le volume inspiratoire rapporté à la masse corporelle (V_T/M) est à peu près constant au cours de la première semaine. Des anomalies du V_T/M associées à des modifications de fréquence sont souvent liées à des anomalies du contrôle réflexe de la ventilation. C'est le cas des animaux *bdnf*^{-/-} chez lesquels une diminution de l'amplitude et de la fréquence respiratoires est corrélée à l'élimination d'une population de neurones chémoafférents (Erickson et al., 1996). Le traitement des animaux avec l'acide rétinoïque diminue aussi le volume inspiratoire et perturbe les relations allométriques, provoquant des différences dans l'évolution du volume inspiratoire au cours de la première semaine postnatale entre les animaux traités ou non avec l'acide rétinoïque.

En revanche, les anomalies du volume inspiratoire à fréquence respiratoire constante sont beaucoup moins fréquentes. Nous en avons retrouvées chez les mutants $Hoxa2^{-/-}$ qui présentent à la naissance un volume inspiratoire deux fois supérieur à celui de leurs congénères hétérozygotes ou sauvages, sans variation de la fréquence respiratoire. Cette caractéristique disparaît ensuite, puisqu'au contraire des animaux sauvages ou hétérozygotes, aucune augmentation du volume inspiratoire n'est observée pendant les premières heures de vie chez les mutants $Hoxa2^{-/-}$. Il s'agit là d'une modification respiratoire radicalement différente de celles observées chez les autres animaux dont le processus de segmentation embryonnaire est perturbé. Il est possible que le phénotype $Hoxa2^{-/-}$ résulte d'un défaut des corrélations entre les besoins de l'organisme et l'adaptation des fonctions physiologiques pour satisfaire ces besoins. En effet, des perturbations semblables du volume inspiratoire à fréquence respiratoire constante sont observées chez les animaux mutants homozygotes pour le gène de l'AChE, traduisant une consommation d'oxygène plus importante et des modifications du métabolisme (Emery et al., non publié).

Le phénotype respiratoire des animaux *Hoxa2^{-/-}* fait aussi probablement intervenir une anomalie du groupe respiratoire pontique (PRG) qui contrôle les mécanismes inspiratoires, sans affecter significativement la durée de l'expiration. La rampe d'activité motrice respiratoire et la transition entre l'inspiration et l'expiration résulte de l'interaction de deux mécanismes : les afférences sensorielles sensibles à l'étirement d'origine pulmonaire (réflexe d'Héring-Breuer) et le PRG ou « centre pneumotaxique » localisé au niveau des noyaux parabrachial médian et Kölliker-Fuse, impliquant la mise en jeu de récepteurs de type NMDA

(Lumsden 1923a,b ; Foutz et al., 1988a,b, cf. introduction). Il est donc possible que le phénotype $Hoxa2^{-/-}$ résulte d'une modification du PRG, issu de r1/r2. La localisation très restreinte des effets de la mutation $Hoxa2^{-/-}$, pratiquement centrés sur r2, contraste avec le domaine d'expression très étendu de ce gène, et peut s'expliquer par des phénomènes dus à la redondance fonctionnelle entre les gènes paralogues des complexes Hox. Dans les rhombomères postérieurs à r2, Hoxb2 est co-exprimé avec Hoxa2; il est donc possible qu'Hoxb2 reprenne tout ou partie des rôles d'Hoxa2, expliquant ainsi que les mutants $Hoxa2^{-/-}$ ne présentent pas de défaillance du système anti-apnéique. Cette redondance fonctionnelle au sein des complexes paralogues Hox a été mise en évidence, en particulier pour les gènes paralogues du groupe 3 (Greer et al., 2000).

En résumé, différentes anomalies respiratoires résultent d'une modification du processus de segmentation en r3/r4, et en particulier une faible fréquence respiratoire in vivo et une augmentation létale des apnées pendant les premiers jours après la naissance, ainsi qu'une ventilation épisodique qui se prolonge pendant toute la première semaine postnatale. En revanche, les syndromes affectant la chémosensibilité réflexe et centrale résultent plutôt d'anomalies postérieures à r4, et un phénotype original touchant le contrôle du volume inspiratoire pendant l'inspiration a été mis en évidence par modification de r1/r2.

2. Deux ensembles neuronaux distincts contrôlent la rythmogenèse respiratoire à la naissance.

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence ou confirmer l'existence de différents groupes neuronaux liés à la rythmogenèse respiratoire et à sa régulation. Ces systèmes ont été localisés *in vitro* à différents niveaux antéro-postérieurs du tronc cérébral, en particulier dans le pont autour du noyau facial, et dans le bulbe. Ainsi, les différentes altérations de la segmentation, éliminant ou touchant des populations différemment réparties selon l'axe antéro-postérieur, ont des conséquences diverses selon qu'elles affectent l'un ou l'autre de ces groupes neuronaux respiratoires.

La mutation d'un gène de segmentation conduit souvent à l'élimination totale ou partielle de territoires où s'exprime normalement le gène concerné. Ces éliminations ont été observées chez les souris *Krox20^{-/-}*, chez qui r3 et r5 sont éliminés (Schneider-Maunoury et

al., 1993 ; Swiatek & Gridley, 1993) ; chez les individus $Hoxa1^{-/-}$ dont le rhombomère 4 est partiellement absent et r5 totalement éliminé (Lufkin et al., 1991 ; Carpenter et al., 1993 ; Mark et al., 1993) et chez les mutants kr/kr dont le rhombomère 5 est totalement éliminé, sans que r6 ne soit touché par ces disparitions cellulaires (Manzanares et al., 1999b).

De telles éliminations ne sont pas compensée par des phénomènes de croissance ou de prolifération cellulaire, et persistent jusqu'à la naissance. Ainsi, l'étude des mutants $Krox20^{-/-}$ et $Hoxa1^{-/-}$ montre que ces animaux présentent un phénotype anatomique consistant en l'absence de territoire pontiques ventro-caudaux, correspondant aux populations dérivées de r3 et r4 (Jacquin et al., 1996 ; Domínguez del Toro et al., 2001). Cette élimination suggère qu'il existe une population réticulaire pontique, accélératrice du rythme respiratoire et contribuant au système anti-apnéique. Notons dès à présent une interprétation alternative. Une anomalie dans un rhombomère entraîne aussi des anomalies dans les rhombomères voisins, par exemple lors de la formation de la frontière. Ces interactions rhombomériques sont nécessaires à la mise en place de circuits rythmiques chez l'embryon (Fortin et al., 1999), et peuvent donc être impliquées dans la genèse des phénotypes respiratoires observés sur les souris transgéniques. Ces interactions sont discutées plus loin (paragraphe 4.2).

Notons enfin que l'élimination massive de populations neuronales dans le tronc cérébral ne conduit pas forcément à des phénotypes respiratoires, puisque les mutants *kr/kr* montrent très peu de modifications des paramètres respiratoires en ventilation calme en normoxie. Les expériences de section et de stimulation du tronc cérébral isolé *in vitro* ont permis de localiser dans le système nerveux central les territoires éliminés ou affectés par les mutations. Ces expériences, discutées ci-dessous, montrent que l'élimination de populations neuronales, conséquences de l'absence d'expression de gènes de segmentation affecte différemment le comportement respiratoire à la naissance selon que les population neuronales concernées participent ou non au réseau neuronal respiratoire.

2.1 Le niveau para-facial.

Nous avons identifié *in vitro* des anomalies fonctionnelles dans la région para-faciale du tronc cérébral sur tous les animaux présentant *in vivo* un dysfonctionnement du système anti-apnéique. Une fréquence respiratoire anormale est observée *in vitro* quand la région para-faciale connecte le générateur médullaire chez les animaux $Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr et les animaux traités avec l'acide rétinoïque. Dans tous les cas, cette anomalie est éliminée par une section ponto-bulbaire, ce qui montre que le centre rythmique médullaire est fonctionnel.



Fig. 22. Identification de neurones respiratoires dans la région parafaciale.

En haut, des travaux réalisés sur le chat *in vivo* montrent l'existence de neurones expiratoires dans une zone de la médulla rostrale et ventrale proche du noyau moteur facial (7Mo). Le neurone illustré ici, dont l'arborisation a été retracée, présente un profil de décharge montrant une inhibition pendant l'activité phrénique, suivie d'un rebond post-inhibition (d'après Grélot et al., 1988).

En bas, des expériences sur des préparations de rat néonatal *in vitro* ont permis d'identifier dans la médulla ventrale et rostrale des neurones préinspiratoires. À gauche, les photos montrent en vert les neurones actifs, la courbe décrivant le décours de la décharge phrénique, les neurones rouges et bleus sont les motoneurones faciaux. La première photo montre de nombreux neurones actifs, 120 ms avant le pic de la décharge phrénique, il s'agit des neurones pré-inspiratoires para-faciaux (localisés à proximité des territoires dérivés de r4). La seconde photo, 60 ms après le pic de la décharge inspiratoire, ne montre plus que quelques neurones actifs dans cette zone. À droite, les potentiels de membrane (MP) de trois neurones pré-I sont indiqués, ainsi que leur moyennage (average) et la décharge phrénique (C4). Noter le profil de décharge de ces neurones, inhibés pendant l'activité phrénique puis montrant un rebond postinhibition (d'après Homma & Onimaru, 2003).

À ce niveau para-facial, le tronc cérébral des rongeurs pourrait donc contenir des neurones liés à la rythmogenèse respiratoire dont certains pourraient exercer un contrôle particulièrement important. En effet, chez les animaux Hoxa1^{-/-}, les territoires rhombomériques éliminés pendant le développement embryonnaire comprennent r5 et une partie de r4, tandis que certaines cellules de r3 et r4 sont re-spécifiées. La déficience du système anti-apnéique chez ces mutants, provenant probablement de l'élimination des populations et entraînant la mort précoce des individus mutants, suggère donc que les cellules dérivées de r4 participent au réseau neuronal respiratoire (Domínguez del Toro et al., 2001). L'analyse des mutants $Hoxa2^{-/-}$, pour lesquels aucune modification majeure de la fréquence respiratoire n'a été observée, montre que les populations neuronales participant au système anti-apnéique sont limitées antérieurement. En effet, chez ces mutants, c'est r2 qui est principalement affecté par l'absence d'expression d'*Hoxa2*. De même, l'étendue du système anti-apnéique est limitée postérieurement : les territoires dérivés de r5 sont totalement éliminés chez le mutant kr/kr sans induire de phénotype respiratoire, en particulier au niveau des apnées, ce qui suggère qu'ils ne participent pas à l'élaboration de ce système. Une conséquence importante de ces résultats est la démonstration d'une séparation anatomique entre le système para-facial rostral et le groupe du pBC en arrière.

Des neurones liés à la respiration ont été identifés dans la zone du noyau moteur facial in vivo chez le chat (Grélot et al., 1988). Il s'agit de neurones expirateurs, inhibés pendant la décharge du nerf phrénique, mais montrant un profil caractéristique de rebond post-inhibition (Figure 22). In vitro, un nouveau groupe de neurones respiratoires pré-inspiratoire (pré-I), le groupe respiratoire para-facial (pFRG), a récemment été identifié chez le rongeur dans la région correspondant aux territoires dérivés de r3/r4, grâce à une technique de marqueurs luminescents voltage-dépendants (Onimaru & Homma, 2003). Ces neurones pré-I présentent eux aussi un profil de décharge alliant une inhibition pendant l'activité phrénique, suivie d'un rebond qui déclenche leur décharge (Figure 22). Une lésion partielle et bilatérale du pFRG produit une diminution de la fréquence respiratoire *in vitro* comparable à celle induite par les dysfonctionnements du système anti-apnéique. Il semble que ces neurones constituent un deuxième oscillateur autonome, couplé au complexe pré-Bötzinger (pBC). Ainsi, les oscillations coordonnées de ces deux groupes neuronaux conduisent à l'élaboration d'un rythme stable et régulier. D'autres travaux récents montrent que ce couplage nécessaire à la stabilité du rythme exprime une sensibilité à l'action des opioïdes endogènes dans le pBC (Mellen et al., 2003). En effet, ces neuromodulateurs exercent un effet différent sur les neurones pré-I du pFRG et sur les neurones inspiratoires du pBC, produisant un découplage

des deux oscillateurs et entraînant alors la génération d'un rythme irrégulier et instable. À l'appui de cette hypothèse, nous avons effectué des expériences *in vitro* suggérant qu'une dérégulation de ce système pourrait expliquer la fréquence anormale des apnées chez les mutants $Krox20^{-/-}$ et $Hoxa1^{-/-}$, ainsi que leur réduction par l'administration de naloxone.

En effet, nos expériences de stimulation neuronale ont permis la mise en évidence de réponse respiratoires anormales du pBC induites à proximité du noyau facial dans la région du pFRG. Nous avons montré par exemple que le traitement des animaux avec l'acide rétinoïque entraînait des perturbations du comportement respiratoire néonatal, en liaison avec des modifications anatomiques localisées au niveau antéro-postérieur correspondant à la sortie du nerf facial, c'est-à-dire les territoires dérivés de r4. À ce niveau, la stimulation des neurones *in vitro* induit une accélération du rythme respiratoire qui n'est pas observée sur les troncs cérébraux de souris non traitées par l'acide rétinoïque. De même, une stimulation neuronale localisée à ce même niveau antéro-postérieur du tronc cérébral induit une accélération anormale du rythme respiratoire chez les mutants $Hoxa1^{-/-}$. Chez ces animaux, une voie anatomique directe connectant le groupe ectopique para-facial et le pBC a d'ailleurs été identifiée. Nous concluons donc que les anomalies respiratoires observées chez les mutants $Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr et les animaux traités avec l'acide rétinoïque résultent bien d'une dérégulation des relations entre le pFRG et le pBC.

2.2 Le niveau médullaire.

Les différentes mutations de la segmentation que nous avons étudiées ne semblent pas affecter la génération du rythme respiratoire par le pBC, mis à part pour les mutants kr/kr chez lesquels une fréquence respiratoire légèrement plus faible est observée *in vitro*, dans la préparation de bulbe isolé. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que des modifications géniques sont observées (Manzanares et al., 1999b) dans la zone qui donne naissance aux neurones du pBC (r6-r8). Toutefois, il n'est pas à exclure que l'élimination de r5 chez les mutants kr/kr réduit l'étendue du pFRG, induisant ainsi cette baisse de fréquence *in vitro*. Cependant, l'absence de phénotype respiratoire chez les mutants kr/kr *in vivo* semble favoriser une faible atteinte du pBC, en absence de tout syndrome apnéique. Ce résultat est particulièrement important pour démontrer que le pFRG et le pBC sont des systèmes anatomiquement différents. Le rhombomère r5 constitue un territoire qui n'est impliqué ni dans la formation du pFRG ni dans celle du pBC. Ce résultat est en accord avec les travaux en cours chez l'embryon montrant que le développement du pFRG et du pBC fait intervenir des

territoires et des mécanismes distincts. Toutes les autres mutations ($Krox20^{-/-}$, $Hoxa1^{-/-}$, +/kr et $Hoxa2^{-/-}$) et le traitement à l'acide rétinoïque concernent surtout la partie antérieure du cerveau postérieur (r2-r4).

Des études ont montré que les neurones du pBC sont capables de générer plusieurs types de comportements respiratoires : respiration normale, soupirs, gasps hypoxiques, apnées (Lieske et al., 2000). Les apnées observées chez les diverses souches étudiées et les anomalies de la fréquence respiratoire peuvent peut-être s'expliquer par des modifications des propriétés des neurones inspiratoires du pBC, tout particulièrement au niveau des afférences qui contrôlent la rythmogenèse à ce niveau.

En effet, le pBC néonatal in vitro est une cible privilégiée de différentes neuromodulations qui régulent le rythme respiratoire. Il existe des systèmes dépresseurs du rythme respiratoire et nous avons montré qu'ils sont distincts du contrôle anti-apnéique. C'est le cas des neurones catécholaminergiques du groupe A5 (Errchidi et al., 1991) ainsi que des neurones enképhalinergiques (Ardvisson et al., 1995). Ainsi, chez les animaux $Krox20^{-/-}$ et Hoxa1^{-/-}, la forte fréquence d'épisodes apnéiques in vivo a été liée à une force accrue de l'inhibition pontique. Il s'agit en fait d'un déséquilibre de la balance inhibition / excitation au sein du pont, qui serait du à l'élimination sélective par la mutation de la population de neurones réticulaires excitateurs dérivés de r3 et r4 située à proximité du groupe catécholaminergique A5, préservé par la mutation (Jacquin et al., 1996). De plus, les animaux +/kr, chez lesquels des re-spécifications cellulaires ont été remarquées en r3 chez l'embryon (Manzanares et al., 1999b; Giudicelli et al., 2003), sont caractérisés par leur forte fréquence respiratoire à la fois in vivo et in vitro. Cette hyperactivité ventilatoire, qui constitue un phénotype en «image miroir» de celui des mutants $Krox20^{-/-}$, semble donc due à un déséquilibre de la balance pontique dans le sens inverse, c'est-à-dire celui de l'excitation (cf. publication 2).

Les afférences enképhalinergiques produisent une dépression respiratoire par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes de type μ situés au niveau du pBC (Denavit-Saubié et al., 1978). Il semble qu'en revanche, le groupe para-facial soit relativement peu sensible aux opioïdes (Mellen et al., 2003). Toutes les observations que nous avons faites en utilisant la naloxone *in vivo* et *in vitro* montrent qu'effectivement les mutations qui affectent le niveau para-facial du réseau neuronal respiratoire ne suppriment pas l'activité des neurones enképhalinergiques. L'efficacité avec laquelle la naloxone améliore la respiration apnéique suggère même que les neurones enképhalinergiques jouent un rôle important dans le contrôle des afférences en provenance du système anti-apnéique. De plus, nous apportons dans cette

thèse la preuve *in vitro* que la naloxone régularise le comportement respiratoire et élimine les apnées par action sur le tronc cérébral (cf. publication 6). Cette hypothèse est confortée par l'observation que l'injection précoce de naloxone, qui augmente la fréquence respiratoire et la survie chez les animaux dont le système anti-apnéique est déficient, rend la fréquence respiratoire des mutants +/kr encore plus forte, tandis qu'elle n'a aucun effet chez les sauvages, ni chez les mutants kr/kr. Des expériences récentes confirment que les agonistes opiacés affectent les interactions entre le pFRG et le pBC (Mellen et al., 2003). De plus, l'efficacité accrue de la naloxone chez les mutants +/kr indique qu'il s'est produit un ajustement compensatoire des synapses enképhalinergiques induit par l'hyperactivité du système anti-apnéique para-facial stimulant le rythme respiratoire. Ces observations suggèrent bien que les contrôles anti-apnéique et enképhalinergiques sont fonctionnellement associés dans le pBC, ce qui fait de la naloxone un outil pharmacologique de choix pour traiter les apnées néonatales d'origine pontique.

La base biologique des modifications du système récepteur opioïde au niveau du pBC reste à étudier en détail. Cependant, cette régulation existe et a été montrée lors de l'invalidation du gène codant pour du récepteur μ aux opioïdes, qui entraîne l'inactivation des récepteurs δ actifs sur le rythme respiratoire (Morin-Surun et al., 2001).

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence que l'excès permanent d'acétylcholine entraînait la régulation négative des récepteurs membranaires cholinergiques sur les neurones respiratoires. D'autres études sur les mutants AChE^{-/-} ont démontré que les récepteurs muscariniques m2 étaient internalisés (Bernard et al., 2003), ainsi que chez des individus sauvages exposés à des inhibiteurs de l'AChE (Liste et al., 2002). Il est cependant possible que la régulation négative emprunte d'autres mécanismes, tels que la diminution de l'expression des récepteurs (régulation génique), dégradation préférentielle des ARN messagers des récepteurs cholinergiques (régulation post-transcriptionnelle), réduction du trafic intracellulaire de ces récepteurs (régulation post-traductionelle), modification des seuils d'activation des récepteurs ou de la force de leur réponse à l'acétylcholine (régulation fonctionnelle). Cette régulation négative affecte vraisemblablement les neurones du pBC, qui possèdent plusieurs types de récepteurs muscariniques et nicotiniques (Shao & Feldman, 2000,2001,2002), bien que nos résultats ne nous permettent pas de conclure à ce sujet. En effet, la régulation négative peut aussi bien concerner des neurones qui sont en aval du générateur central du rythme respiratoire, tels que les pré-motoneurones bulbo-spinaux et les motoneurones phréniques. Ces résultats montrent que les altérations d'un système

neurotransmetteur vital peut entraîner à long terme des compensations post-synaptiques qui permettent la survie de l'animal.

D'autres systèmes neuromodulateurs contrôlent l'activité rythmogène du pBC et peuvent être impliqués au cours du développement, comme les récepteurs de la substance P (NK1-R), ou le récepteur du BDNF, TrkB (Thoby-Brisson et al., 2003). L'élimination des neurones NK1-R positifs, considérés comme le support majeur de l'activité rythmogène du pBC (Gray et al., 1999), entraîne in vivo l'arrêt de la respiration régulière (Gray et al., 2001). Une autre étude, portant sur des animaux knockout pour le gène MafB/kreisler démontre une réorganisation des récepteurs NK1-R du pBC. Ces résultats sont très différents de ceux que nous avons trouvés avec les mutants kreisler. En effet, les mutants MafB^{-/-} meurent très tôt après la naissance de déficience respiratoire. Ces problèmes sont liés à l'existence d'une population neuronale du pBC co-exprimant NK1-R et MafB à E18,5, qui est sévèrement touchée par la mutation $MafB^{-/-}$ (Blanchi et al., 2003). Les différences entre nos deux travaux ne sont pas surprenantes, puisque la mutation naturelle kreisler ne constitue pas une mutation nulle (Eichmann et al., 1997), mais qu'elle ne touche que l'expression précoce de MafB en r5 et r6 (Cordes & Barsh, 1994). Les expressions de MafB dans les autres territoires (système hématopoïétique, plaque du toit) et plus tardives ne sont donc pas affectées par la mutation naturelle. Ainsi, il semble que l'atteinte du pBC soit suivie de troubles respiratoires trop importants pour que les animaux puissent survivre, renforçant l'hypothèse de la localisation du noyau du générateur central du rythme respiratoire dans le pBC (Smith et al., 1991; Koshiya & Smith, 1999; Lieske et al., 2000). De plus, les mouvements respiratoires fœtaux, qui semblent eux aussi générés par le pBC (Abadie et al., 2000), sont responsables de l'extension des tissus pulmonaires et de la sécrétion du surfactant pulmonaire. L'absence de ces mouvements pourrait donc aussi avoir des répercussions sur le développement des structures effectrices de la commande respiratoire, qui fonctionnent en aval de la rythmogenèse centrale.

Les expériences concernant l'acétylcholine, les opioïdes et la substance P démontrent que les systèmes neuromodulateurs du pBC ne sont pas de simples accessoires du réseau neuronal respiratoire mais qu'ils participent pleinement, avec le système para-facial, à l'élaboration d'un rythme stable, régulier et compatible avec le maintien de l'homéostasie et la vie des individus.

L'organisation fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire le long de l'axe antéropostérieur peut être déduite des différents phénotypes anatomo-fonctionnels observés chez les différentes souches que nous avons étudiées. Le niveau para-facial, nouvellement caractérisé, semble participer in vivo à la stabilisation et à la régularité du rythme respiratoire. À ce niveau, nos résultats démontrent que le système anti-apnéique est limité aux territoires dérivant de r3/r4. Il fait intervenir des groupes neuronaux qui ont été localisés in vitro à proximité du noyau moteur facial et est fonctionnellement distinct du niveau médullaire, qui contient les groupes indispensables à la rythmogenèse et au contrôle chémosensoriel. Le réseau neuronal respiratoire est donc construit selon une organisation modulaire, deux modules ayant pu être identifiés grâce aux mutations montrant des phénotypes particuliers.

3. Des modifications légères du programme de segmentation entraînent des défauts permanents du comportement respiratoire.

3.1 La plasticité neuronale limite les conséquences de l'invalidation du gène codant pour l'acétylcholine estérase.

Il paraît clair au vu de nos résultats que la segmentation du rhombencéphale est un processus précoce dont les altérations entraînent irrémédiablement des conséquences sur l'anatomie, les connexions, la mise en place et les inter-relations des populations neuronales motrices et réticulaires du tronc cérébral.

D'autres mutations cependant semblent produire des effets moins irréversibles, telle l'invalidation du gène de l'acétylcholine estérase (AChE), malgré l'importance toute aussi vitale du système neurotransmetteur cholinergique. Dans ce cas, le phénotype observé comprend des mécanismes de régulation négative des récepteurs cholinergiques au niveau des neurones respiratoires centraux, introduisant une adaptation à l'hyper-cholinergie permanente induite par cette mutation, un phénomène similaire à ce qui est observé chez le poisson-zèbre mutant pour l'AChE (Behra et al., 2002). De plus, il semble qu'une enzyme proche de l'acétylcholine estérase, la butyrylcholine estérase agisse en périphérie pour combler l'absence d'AChE. Cette compensation physiologique a pu se mettre en place au cours du développement, alors que l'organisme a détecté l'excès d'acétylcholine. Cependant, il est plus probable que la régulation négative des effets de l'acétylcholine résulte d'un effet à court terme de la concentration du ligand sur les récepteurs post-synaptiques, et en particulier d'une modification du processus d'internalisation des récepteurs (Bernard et al., 2003 ; Liste et al., 2002). En effet, au cours de notre étude, nous avons observé, chez les individus sauvages, une désensibilisation rapide des récepteurs lors de l'application des agonistes cholinergiques, menant à l'arrêt de l'activité tonique (cf. publication 4).

Ces mécanismes de plasticité synaptique qui régulent la transmission en fonction de la concentration d'agonistes semblent suffisants pour expliquer les anomalies de la réponse postsynaptiques observées chez les mutants homozygotes $AChE^{-/-}$. De plus, dans le cas des mutants hétérozygotes, aucun défaut des effets muscarinique ou nicotinique n'a été détecté. Il semble donc qu'aucune altération irréversible du fonctionnement synaptique ne résulte d'une diminution partielle de la synthèse d'AChE. Il n'en est pas de même des phénotypes obtenus en modifiant l'activité des gènes de segmentation.

3. 2 Dose-dépendance et irréversibilité des effets liés aux troubles de la segmentation.

Une des souches utilisées au cours de nos expériences présente un phénotype hétérozygote : il s'agit des mutants kreisler. Lors de l'étude de cette population de souris, nous avons porté notre attention sur les individus +/kr, sachant que ceux-ci avaient été décrits comme comportant une expression anormale de Hoxa3 en r3 (Manzanares et al., 1999b). Nous avons alors pour la première fois identifié un phénotype consistant en une augmentation de la fréquence respiratoire basale, lié à une hyperactivité du système anti-apnéique observée à la fois *in vivo* et *in vitro*. De plus, ces anomalies physiologiques ne sont aucunement liées avec des modification anatomiques visibles. Le plus surprenant fut de constater que la mutation kr/kr ne produisait non pas un phénotype similaire et renforcé, mais au contraire qu'elle éliminait complètement les traits caractéristiques de la mutation +/kr. Ceci est lié au fait que les perturbations embryonnaires sont très différentes : chez les souris +/kr, la quantité de protéine MafB produite suffit à l'induction et au maintien de r5, tout en introduisant l'expression par certaines cellules de r3 de marqueurs postérieurs (Manzanares et al., 1999b; Giudicelli et al., 2003). Chez les mutants kr/kr, l'absence de la protéine MafB entraîne l'absence de r5, ainsi que la même expression anormale de marqueurs postérieurs en r3, mais plus intense. Ainsi, la quantité de protéine peut être limitante et des effets peuvent se produire dès que la quantité est réduite, sans nécessairement que l'absence de protéine ne soit totale.

Un autre exemple d'effets dose-dépendant est illustré avec le traitement des embryons par l'acide rétinoïque. Dans ce cas, la dose forte (20 mg/kg) appliquée au même moment (E7,5) que la dose faible (0,5 mg/kg) entraîne une mortalité totale des embryons. La même dose forte, utilisée à E7 autorise la survie des animaux, bien qu'une forte mortalité soit observée. Les effets sur la physiologie respiratoire néonatale des deux traitements ne sont pas tout à fait identiques, dénotant ici aussi des effets de dose. Les caractéristiques de ventilation épisodique sont plus marquées et plus soutenues dans le cas des animaux traités avec 0,5 mg/kg, même si les animaux traités avec 20 mg/kg montrent des valeurs plus fortes de temps passé en respiration épisodique à des instants donnés. De même, la rythmogenèse respiratoire analysée *in vitro* n'est pas identique : pour le groupe 0,5 mg/kg, la fréquence basale paraît normale, le phénotype n'apparaissant qu'après injection d'AMPA dans la région para-faciale ; tandis que pour le groupe 20 mg/kg la rythmogenèse respiratoire paraît sévèrement atteinte, à l'instar de ce qui est observé chez les mutants *Krox20^{-/-}* ou *Hoxa1^{-/-}*. Dans ce cas, il n'est pas à exclure que les effets différentiels ne soient dus non seulement à la différence de dose, mais aussi à la différence de date d'injection. En effet, il a été démontré que la sensibilité des futurs territoires rhombomériques à l'acide rétinoïque était finement régulée dans le temps (Dupé & Lumsden, 2001 ; Gavalas, 2002 ; Maden, 2002).

Par comparaison avec les résultats obtenus sur les mutants du gène de l'acétylcholine estérase, ces observations suggèrent que les gènes de segmentation contrôlent de façon irréversible l'organisation fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire. Un défaut même léger du processus de développement entraîne des anomalies qui ne peuvent pas être compensées malgré la grande plasticité des réseaux synaptiques pendant la vie fœtale et postnatale.

4. La signalisation impliquée dans la mise en place des réseaux neuronaux rythmiques au niveau r3/r4.

4.1 La re-spécification des territoires embryonnaires et ses conséquences.

Dans de nombreux contextes mutants concernant les gènes impliqués dans la segmentation du rhombencéphale, des re-spécifications cellulaires sont observées. Il s'agit le plus souvent de cellules d'un territoire qui expriment des marqueurs ne correspondant pas à leur position. C'est en particulier le cas pour les animaux $Krox20^{-/-}$ dont les cellules de r3 et r5 prennent transitoirement des identités paires (Voiculescu et al., 2001) avant d'être éliminées par des processus d'apoptose qui régulent la taille des territoires, pour les mutants $Hoxa1^{-/-}$ dont certaines cellules de r3 et r4 forment des « taches », exprimant un marqueur de r2 de

façon anormale, pour les mutants $Hoxa2^{-/-}$ chez qui r2 semble partiellement re-spécifié en r1 (Gavalas et al., 1997 ; Davenne et al., 1999) et enfin pour les mutants +/kr et kr/kr, qui possèdent en r3 des cellules qui expriment Hoxa3 et MafB/kreisler, normalement exprimés en arrière de la frontière r4/r5 (Manzanares et al., 1999b ; Giudicelli et al., 2003).

Les re-spécifications de territoires n'entraînent pas nécessairement une élimination des territoires touchés, mais peut induire l'apparition de nouvelles connexions neuronales, voire même la conservation au cours du développement d'une population neuronale surnuméraire. Ces éléments supplémentaires du circuit neuronal peuvent s'intégrer au réseau neuronal respiratoire et jouer un rôle fonctionnel à la naissance. L'emploi de la respiration comme fonction physiologique de référence nous a ainsi permis d'identifier au sein du tronc cérébral les transformations induites par ces re-spécifications.

Chez les mutants *Hoxa1*^{-/-}, les cellules mal spécifiées de r3/r4 donnent naissance dans le pont caudal à un groupe neuronal surnuméraire, comprenant à la fois des motoneurones et des neurones réticulaires et qui s'insère au sein du circuit respiratoire (Domínguez del Toro et al., 2001). Cette population supplémentaire est conservée au cours du développement jusqu'à la naissance, et envoie des projections directes vers le générateur central du rythme respiratoire, son excitation *in vitro* conduit à une augmentation de la fréquence des bouffées respiratoires. De plus, cette étude a montré que les individus qui survivaient le mieux correspondaient à ceux dont le pont présentait le plus de modifications, c'est-à-dire les animaux qui avaient le mieux conservé le groupe neuronal surnuméraire.

Au contraire, chez les souris +/kr, l'existence de modifications embryonnaires en r3, lié à un phénotype en « image miroir » de celui des animaux $Krox20^{-/-}$ et sans défauts anatomiques, nous a conduit à poser l'hypothèse d'une reconfiguration du système antiapnéique, excitateur du rythme respiratoire et précédemment identifié comme provenant de r3/r4. Cette reconfiguration peut s'exprimer sous plusieurs formes : augmentation du nombre de connexions vers le générateur central du rythme respiratoire, augmentation de la force des synapses excitatrices, augmentation du nombre de neurones réticulaires de ce système. L'émergence de cellules exprimant MafB/kreisler en r3 pourrait conduire à l'élaboration préférentielle de projections entre ces cellules exprimant des gènes identiques établissent des connexions de façon préférentielle, même si elles sont distantes de plusieurs largeurs de rhombomères. De plus, l'expression de MafB/kreisler en r3 pourrait permettre à ces projections de traverser r4/r5, à la manière des motoneurones faciaux lors de leur migration postérieure vers r6 (Garel et al., 2000). Un autre indice favorisant cette hypothèse consiste en l'élimination des traits phénotypiques de la mutation +/kr par la mutation homozygote kr/kr, qui élimine aussi tous les territoires dérivés de r5.

Ces résultats révèlent l'existence de deux types de contrôles respiratoires induits par la spécification anormale ou ectopique de progéniteurs neuronaux, l'un agissant directement sur le pBC, dans le cas de la mutation $Hoxa1^{-/-}$ et l'autre présentant un effet indirect nécessitant la présence de r5, dans le cas de la mutation +/kr.

4.2 Les perturbations des relations inter-rhombomériques.

En plus des effets produits à l'intérieur des rhombomères, les re-spécifications perturbent aussi les relations entre les populations cellulaires progénitrices en créant des contacts inhabituels (par exemple contact r2/r4 chez Hoxa1^{-/-} ou Krox20^{-/-} ou contact r3/r5 chez +/kr). Or les contacts et les communications sont facilités par l'appartenance à la même parité d'identité, à cause de l'expression différentielle des molécules d'attraction / répulsion telles que les ephrines et leurs récepteurs Eph (Xu et al., 1999; Mellitzer et al., 1999). En effet, les rhombomères pairs expriment généralement des ephrines et les impairs expriment des récepteurs Eph. Ce système permet entre autre l'établissement des frontières interrhombomériques et la ségrégation cellulaire des populations cellulaires de chaque rhombomère grâce à l'alternance pair / impair. Cependant, si des cellules de deux rhombomères différents de même parité sont mélangées, la ségrégation ne s'effectue pas ou mal. Des anomalies de frontières, liées aux modifications des patrons d'expression géniques, ont été largement décrites chez les différents mutants de gènes de segmentation. Les perturbations des relations inter-rhombomériques peuvent expliquer la conservation au cours du développement du groupe neuronal surnuméraire observé chez les mutants Hoxal^{-/-}. De même, ces modifications fournissent une hypothèse complémentaire pour expliquer la reconfiguration du réseau neuronal respiratoire, impliquant r3 et r5 chez les mutants +/kr.

De plus, les observations similaires concernant le mutant $Krox20^{-/-}$, chez lequel r3 est éliminé après re-spécification, et le mutant $Hoxa1^{-/-}$, chez lequel manque des territoires issus de r4, permettent de proposer une hypothèse alternative à l'élimination de cellules en r3 pour expliquer les défauts du système anti-apnéique. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'aucun neurone rythmique en phase avec la respiration n'est observé au niveau des territoires issus de r3 (Onimaru & Homma, 2003). De plus, chez les animaux traités à l'acide rétinoïque, les défauts embryonnaires sont localisés dans r2/r3 (cf. introduction), alors que les défauts anatomo-fonctionnels observés sont concentrés au niveau de r4. De même, les re-



Fig. 23. La maturation des activités rythmiques de l'embryon de poulet au niveau de r3/r4 : un circuit para-facial embryonnaire ?

À gauche, la photo montre le résultat d'une expérience d'isolement de la paire de rhombomères r3/r4 réalisée à E1,5, c'est-à-dire au tout début de la segmentation. Le rhombomère r3 est repéré grâce à l'expression de *Krox20* et r4 grâce à l'expression d'*Hoxb1*. Ce segment isolé donne naissance à un générateur rythmique local (voir introduction et Figure 16) dont les activités maturent sous certaines conditions. La maturation dépend en particulier de la présence de *Krox20* en avant (identité impaire) et de la polarité du segment postérieur d'identité paire. Cette maturation nécessite la mise en place de synapses GABAergiques qui sont actives sur des neurones dont la fonction au sein du réseau émerge à cet instant : les neurones réticulaires inhibés (IRN, à droite). Ceux-ci, au contraire des neurones liés à la décharge (BRN) qui sont actifs pendant la bouffée «inspiratoire», présentent un profil semblable à celui des neurones pré-I du pFRG : une inhibition pendant la bouffée suivie d'un rebond post-inhibition (d'après Fortin et al., 1999).

Ces caractéristiques du réseau embryonnaire sont-elles conservées au cours du développement ?

spécifications en r3 des mutants +/kr n'entraînent pas de modifications anatomiques visibles, alors qu'elles induisent un phénotype fonctionnel.

Ces observations suggèrent donc qu'aux stades précoces du développement, lors de la mise en place des rhombomères, le futur r3 contiendrait une signalisation nécessaire à l'établissement correct en r4 de populations neuronales stimulatrices du rythme respiratoire. La perturbation de cette signalisation, que ce soit par des modification d'identité cellulaire en r3 ou des problèmes lors de la formation de la frontière entre r3 et r4 entraînerait alors des perturbations dans les territoires dérivés de r4. La frontière et les relations inter-rhombomériques entre r3 et r4 apparaissent particulièrement importante pour la mise en place du système anti-apnéique. Au niveau de la frontière entre r5 et r6, les mécanismes semblent différents, puisque la disparition de r5 chez les animaux kr/kr n'induit pas d'effet dramatique en r6, en particulier au niveau du pBC.

Les expériences effectuées chez le poulet suggèrent en effet qu'une voie de signalisation induite par l'expression de *Krox20* en r3 aboutit à la mise en place d'un système rythmique épisodique mature en r4 (Fortin et al., 1999). Cette étape de développement est probablement importante chez la souris lors de la mise en place du système neuronal parafacial. (1) L'expression de Krox20 est essentielle. En effet, toutes les configurations rhombomériques dans lesquelles Krox20 n'est pas exprimé sont incapables d'induire la formation du réseau rythmique épisodique. Chez la souris, il serait donc intéressant de rechercher les anomalies du pFRG chez les mutants Krox20^{-/-}. (2) Par ailleurs, l'intégrité de r4 est aussi nécessaire. Une modification de la position relative de r4 par rapport à r3, obtenue en inversant l'orientation antéro-postérieure de r4 (voir Figure 16) abolit aussi la maturation des activités rythmiques en activités épisodiques. Cette situation expérimentale est peut-être comparable à celle de la mutation Hoxa1^{-/-}, dans laquelle r4 est modifié sans abolir l'expression de Krox20 en r3. Il semble que les anomalies qui résultent chez le poulet d'un dysfonctionnement de cette voie de signalisation ne s'accompagnent pas de déficits anatomiques majeurs, tels que l'élimination de populations cellulaires. La maturation des activités normales résulterait seulement d'une évolution dans le fonctionnement des synapses GABAergiques par regroupement des récepteurs post-synaptiques ou modification du gradient transmembranaire d'ions chlorures (Fortin et al., 1999). Il est à noter que lors de cette maturation, l'action des synapses GABAergiques est synchrone avec l'apparition au sein du réseau de « neurones respiratoires inhibés » qui présentent eux aussi un profil de décharge similaire aux neurones respiratoires du pFRG, groupant inhibition pendant la décharge motrice et rebond post-inhibition (Figure 23, voir discussion chapitre 2.1). Il est donc

possible, chez la souris, que des troubles respiratoires importants résultent d'anomalies du développement para-facial sans modification anatomique majeure. Cette thèse propose différents modèles expérimentaux (mutation +/kr, traitement par de faibles doses d'acide rétinoïque) pour aborder cette hypothèse. Une étude du développement embryonnaire des activités rythmiques serait nécessaire à l'avenir pour aborder plus avant cette hypothèse.

Les anomalies respiratoires d'origine para-faciale semblent liées à des défauts du développement embryonnaire impliquant deux mécanismes :

- des spécifications rhombomériques anormales entraînant l'émergence de type neuronaux nouveaux ou mal localisés,
- une signalisation inter-rhombomérique anormale, particulièrement à la frontière entre r3 et r4, nécessaire à la mise en place du système antiapnéique.

5. Importance de l'étude des relations entre le développement du cerveau postérieur et la physiologie ventilatoire.

5.1 Implications cliniques de l'étude du développement du tronc cérébral.

La segmentation embryonnaire du cerveau postérieur est en étroite relation avec la formation des arcs branchiaux et la régionalisation des crêtes neurales crâniennes, qui sont conjointement à l'origine de la majorité des tissus qui forment la face et le cou. De plus, il existe de nombreuses pathologies humaines, remarquées en particulier chez les nourrissons qui affectent le développement maxillo-facial et qui sont dénommées « syndromes d'arcs branchiaux », tels que le syndrome de Di George ou le syndrome de Moebius. Ces pathologies sont le plus souvent associées à des troubles de comportements contrôlés par le tronc cérébral, tels que la mastication, la succion, la déglutition et la respiration (Abadie et al., 1999). Nos études fournissent une base pour rechercher des facteurs possibles pouvant causer ces différents syndromes : les syndromes du 1^{er} arc pourraient être lié à des mutations du gène *Hoxa2*, ceux du 2nd arc, aux mutations de *Krox20* et *Hoxa1*, ceux du 3^e arc aux mutations *kreisler* ; l'acide rétinoïque déjà connu comme tératogène puissant, peut aussi causer des altérations du développement à des doses dix à vingt fois plus faibles que les doses tératogènes.

Les différents comportements respiratoires anormaux observés dans les différentes souches de mutants étudiées sont aussi présents chez l'humain. Ainsi des apnées néonatales liées à des dysfonctionnement du tronc cérébral, aux causes mal connues sont reportées (Vert et al., 1994; Kinney et al., 1995). La respiration épisodique est observée dans diverses situations, telles que la congestion cardiaque (respiration dite de « Cheyne-Stokes »), les apnées obstructives du sommeil (revu par Strohl, 2003). Ces défaillances, bien que souvent multi-factorielles, résultent souvent de prédispositions génétiques, mais il semble qu'un grand nombre de mutations dans différents gènes soit impliqué. Nos études permettent donc d'identifier non seulement une partie de ces facteurs, mais aussi de localiser les aires anatomiques du tronc cérébral affectées par ces anomalies de développement. Ceci revêt un intérêt particulier car les troubles respiratoires semblent jouer un rôle prépondérant dans l'occurrence des phénomènes de mort subite du nourrisson (Strohl, 2003). La recherche de perturbations de réflexes modifiés spécifiquement par chaque mutation pourrait faciliter le diagnostic. Par exemple, la mastication est particulièrement atteinte par les mutations de Krox20 (Jacquin et al., 1996) ou Hoxa2, le réflexe de retournement par la mutation kr/kr (cf. publication 2), les réflexes chémosensibles dans la mutation des gènes des neurotrophines BDNF et NT-4 (Erickson et al., 1996). Si de tels défauts dans les réflexes sont observés, il faudrait alors réaliser l'étude anatomique de la région habituellement associée à ce trouble et ainsi détecter une éventuelle mutation d'un gène de développement.

5.2 Implications phylogénétiques et évolutives.

Parmi les vertébrés, la capacité des neurones réticulaires du tronc cérébral à générer des rythmes liés à l'activité respiratoire a été remarquablement bien conservée au cours de l'évolution, puisqu'elle est retrouvée chez les agnathes, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (cf. publications 3 et 6). Or, la segmentation du tronc cérébral, qui répartit ces neurones réticulaires dans différents compartiments clonaux et géniques, est elle aussi conservée dans tout le phylum des vertébrés, ainsi que ses acteurs. Les pressions de sélection exercées sur ces deux systèmes ont donc du jouer conjointement. La respiration embryonnaire des mammifères ou des oiseaux, qui fait intervenir tous les étages du tronc cérébral est très différente de celle observée plus tard chez les individus adultes, pour lesquels le générateur central de rythme est localisé dans une zone très précise du bulbe. Cette situation contraste avec la localisation antérieure du générateur rythmique chez les vertébrés inférieurs, chez lesquels il se situe au niveau trigéminal (Rovainen, 1996). Au cours de

l'évolution et du développement, les populations neuronales capables de générer ce rythme subissent donc une régression qui limite le nombre de neurones constituant le générateur et leur emplacement.

De plus, les activités respiratoires des différents groupes de vertébrés sont elles aussi très variables : la respiration épisodique, caractéristique de la respiration pulmonaire des amphibiens adultes *in vitro* (McLean et al., 1995), est retrouvée au stade embryonnaire *in vitro* après maturation chez les mammifères (Abadie et al., 2000) et les oiseaux (Fortin et al., 1995). Ceci peut être la marque d'un passage obligé par un stade auquel les générateurs ne sont capables de fournir qu'un rythme épisodique, réminiscent des stades évolutifs antérieurs. La diversification et la multiplication des gènes intervenant dans le contrôle de la segmentation embryonnaire du rhombencéphale est corrélée à l'apparition d'une diversité de groupes neuronaux exerçant différentes régulations sur la rythmogenèse respiratoire. Au cours de l'évolution, certains de ces modules ont été sélectionnés, le gène contrôlant leur mise en place devenant alors absolument déterminant dans la mise en place du circuit neuronal respiratoire.

L'étude conjointe des troubles du développement du tronc cérébral et de la rythmognèse respiratoire à la naissance nous a permis d'identifier plusieurs mutations du programme de segmentation embryonnaire susceptibles de modifier le comportement respiratoire des souris nouveau-né. Ces facteurs peuvent être partiellement responsables de syndromes malformatifs humains impliquant des défauts du contrôle respiratoire néonatal. De plus, la pression de sélection évolutive a conduit à l'élaboration d'un circuit complexe au sein duquel deux modules, dont le développement dépend de gènes spécifiques, sont connectés l'un à l'autre pour former le circuit neuronal respiratoire fonctionnel et cohérent.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et Perspectives

La segmentation embryonnaire du rhombencéphale établit un plan d'organisation fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire.

Le générateur du rythme respiratoire, un réseau neuronal situé dans le tronc cérébral, est particulièrement intéressant pour l'étude des liens entre l'expression des gènes de développement et la physiologie postnatale. Le tronc cérébral subit un processus embryonnaire de segmentation, strictement contrôlé génétiquement et conduisant à la mise en place de compartiments neuro-épithéliaux, les rhombomères. Cette thèse avait pour but de délimiter dans le tube neural segmenté de la souris les territoires importants pour le maintien du comportement respiratoire vital à la naissance.

Les résultats reposent sur la comparaison de différents animaux homozygotes mutants pour les gènes de segmentation. L'étude du mutant $HoxaI^{-/-}$ a montré que des apnées centrales léthales sont dues à l'élimination de r4 étaient améliorées par un traitement à la naloxone (Domínguez del Toro et al., 2001 ; publication 6). L'analyse du mutant $Hoxa2^{-/-}$ suggère que r2 ne participe pas à la genèse de ces apnées. La comparaison des mutants $Krox-20^{-/-}$ (Jacquin et al., 1996) avec les mutants homozygotes *kreisler* montre que r3 est impliqué dans la genèse de ces apnées, mais non pas r5. Nous définissons donc une région restreinte à r3/r4 qui conduit à la mise en place d'un système « anti-apnéique » (i) actif et vital chez la souris pendant le premier jour post-natal, (ii) antagoniste des mécanismes dépresseurs du rythme respiratoire, en particulier opioïdes, (iii) distinct du générateur rythmogène respiratoire médullaire.

Les compensations fonctionnelles au sein du générateur médullaire ont été étudiées sur les mutants du gène de l'acétylcholine estérase. Ces animaux, constamment soumis à un excès d'acétylcholine, ont mis en place des mécanismes respiratoires de survie au niveau des centres médullaires et de la périphérie. En revanche, des modifications même légères du programme génétique de segmentation en r3/r4 (mutation *kreisler* hétérozygote, acide rétinoique à faible dose) ne peuvent pas être compensées. Elles entraînent des anomalies permanentes du réseau neuronal para-facial et du comportement respiratoire.

En conclusion, nous subdivisons le générateur respiratoire en deux régions, l'une parafaciale, l'autre médullaire, conformément à un plan d'organisation établi dès le début du stade embryonnaire de segmentation. L'oscillateur para-facial assurerait la stabilité et la régularité du rythme néonatal, en relation avec la neuromodulation opioïde du générateur médullaire.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons donc lié certains mécanismes de développement embryonnaire à la mise en place du réseau rythmogène respiratoire. Les bases biologiques de ce lien se résument en trois étapes. Les gènes de segmentation agissent comme des gènes sélecteurs qui coordonnent le devenir de différentes lignées neuronales (étape 1) dirigeant ainsi la mise en marche chez l'embryon du réseau neuronal rythmique (étape 2) qui mature et évolue ensuite jusqu'au moment où le comportement respiratoire devient vital : la naissance (étape 3).

Etape 1. Mécanismes moléculaires fixant le devenir neuronal : le plan d'organisation fonctionnelle du réseau respiratoire.

Au cours du développement embryonnaire, le devenir des progéniteurs dans le rhombencéphale est en grande partie déterminé par la combinaison des facteurs de transcription exprimés aux étapes précoces de prolifération cellulaire. De cette façon, la fonction des circuits neuronaux, de même que les propriétés anatomiques et neurochimiques des neurones, sont déterminées précocement par la position du progéniteur au sein du tube neural. Les études clonales de Lumsden et al. (1994) montrent bien qu'un progéniteur unique au stade de segmentation donne naissance à une population neuronale homogène du point de vue de sa trajectoire axonale. Il en résulte l'idée d'une autonomie cellulaire des mécanismes qui fixent le devenir des lignées cellulaires en fonction d'une combinaison particulière de marqueurs géniques. Il existe aussi des mécanismes non autonomes du point de vue de la cellule : gradients de morphogènes antéro-postérieurs (acide rétinoïque) ou dorso-ventraux interactions inter-rhombomériques par molécules de (sonic hedgehog), surface (Eph/ephrines), contrôle de la survie neuronale au moment de l'insertion dans le réseau neuronal (neurotrophines). Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les facteurs de transcription et les morphogènes spécifiant la position antéro-postérieure des progéniteurs. Il serait également intéressant de considérer à l'avenir les marqueurs de position dorso-ventrale, importants pour fixer un sous-type neuronal (moteur, interneurone) au sein d'un rhombomère, et d'étudier comment ils interagissent avec les marqueurs segmentaires pour spécifier le devenir de populations clés du réseau respiratoire (cf. introduction, chapitre 2.1).

Les résultats de cette thèse vérifient certaines prédictions de l'hypothèse selon laquelle l'émergence des différents types neuronaux et la formation de circuits fonctionnels sont régulées et coordonnées au cours du développement embryonnaire. (1) Les gènes de segmentation du rhombencéphale sont intéressants de ce point de vue car ils agissent comme des gènes sélecteurs qui organisent le devenir de plusieurs des lignages neuronaux (moteurs, réticulaires, etc.) à un niveau donné du tube neural. Et, de fait, les modifications anatomiques que nous avons observées après modification du programme de segmentation impliquent invariablement différents types neuronaux (motoneurones, neurones réticulaires). (2) Au sein des rhombomères limités par des frontières strictes, les progéniteurs neuronaux évoluent isolément, en fonction de l'expression différentielle des marqueurs géniques caractéristiques du niveau antéro-postérieur considéré. Les anomalies comportementales que nous avons observées sont suffisamment sélectives et reproductibles pour démontrer l'atteinte de systèmes neuronaux intégrés particuliers. Ainsi, le même système fonctionnel anti-apnéique est affecté par toute anomalie de la signalisation à un niveau donné du tube neural (r3/r4) et ce système est clairement distinct du système respiratoire plus caudal (séparé par r5 peu impliqué dans la fonction respiratoire) ou plus rostral (le système de contrôle inspiratoire issu de r1/r2). (3) Les gènes de segmentation pourraient alors être le support biologique d'un plan d'organisation par lequel des circuits neuronaux sont mis en place au sein des grands ensembles fonctionnels. Effectivement, une anomalie dans la combinaison des facteurs de transcription exprimés chez les des mutants $Hoxa1^{-/-}$ au niveau de r3/r4, induit la formation d'un groupe neuronal supplémentaire, viable, fonctionnel et intégré dans le réseau respiratoire. Nos résultats sont donc compatibles avec l'hypothèse selon laquelle les rhombomères sont des compartiments polyclonaux dans lesquels le devenir des différentes lignées neuronales est fixé et coordonné.

Etape 2. Mise en marche des activités rythmogènes chez l'embryon : plasticité et déterminisme dans le réseau respiratoire.

Dès la fin de la segmentation, un réseau neuronal rythmique est établi dans le rhombencéphale et son activité a pu être enregistrée *in vitro* par Fortin et al. (1995,1999). À ce stade, l'organisation du réseau rythmique est évidemment conforme à l'organisation segmentaire puisqu'au cours de leur migration, les neurones réticulaires conservent dans un premier temps leur position antéro-postérieure. Il existe alors des relations synaptiques intersegmentaires et chaque segment ou paire de segment possède un générateur rythmique autonome. Le réseau neuronal primordial possède donc une certaine redondance fonctionnelle

à partir de laquelle le système respiratoire s'organise et mature. Les mécanismes de segmentation semblent aussi fixer les premières étapes de cette maturation et, par exemple, la mise en marche du système para-facial du poulet semble dépendre, comme chez la souris, de la mise en place du couple rhombomérique r3/r4.

Par la suite, au cours du développement fœtal, l'anatomie embryonnaire acquiert les caractéristiques propres de l'espèce considérée et les réseaux neuronaux peuvent être totalement remodelés en fonction, par exemple, des informations sensorielles qui leurs parviennent. Il est donc difficile, dans l'étude du réseau neuronal définitif et du comportement de l'animal, de faire la part de ce qui est fixé chez l'embryon et de ce qui est acquis en fonction du contexte physiologique ou comportemental. Les résultats de cette thèse renforcent notre conviction que le réseau respiratoire est un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires permettant un comportement à la fois plastique pour s'adapter aux aléas du milieu et déterminé génétiquement pour répondre aux nécessité physiologiques propres à l'espèce. La respiration est en effet un comportement élaboré, fait d'une succession de phases et de transitions d'activités. C'est aussi un comportement qui présente une grande plasticité fonctionnelle, car la respiration est le support des activités cognitives et de relation comme l'expression des émotions et le langage. Les expériences faites ces vingt dernières années sur les neurones respiratoires après la naissance ont permis de dégager les bases cellulaires de la plasticité et de la permanence du rythme respiratoire. L'activité rythmique est robuste et persiste toute la vie car elle repose sur les propriétés électriques membranaires des neurones et les relations synaptiques basiques (glutamatergiques, GABAergiques, glycinergiques); c'est aussi une activité flexible, modifiable par neuromodulation, messagers intracellulaires et plasticité à long terme.

Les données de cette thèse replacent ce constat dans la perspective des gènes de développement. Nous avons par exemple mis en évidence un contrôle pontique para-facial qui fixe irréversiblement la fréquence respiratoire. Cette régulation s'exerce dans les deux sens car en cas d'anomalie, la fréquence peut dériver vers des valeurs trop faibles ou trop fortes pour l'espèce. Les observations de Fortin et al. (1999) montrent chez le poulet que la maturation embryonnaire para-faciale fait intervenir des modifications cellulaires relativement simples impliquant les synapses GABAergiques et le courant voltage-dépendant Ih. Il serait important d'étudier ce système chez la souris.

Par ailleurs, nous avons largement souligné l'importance des mécanismes de neuromodulation et de plasticité synaptique dans le contrôle de l'activité rythmogène au niveau médullaire. Ces mécanismes semblent impliqués dans la compensation du phénotype $AChE^{--}$ et dans la régulation de l'efficacité de la naloxone (par exemple son augmentation chez les mutants +/kr). Cette thèse permet donc une première appréciation de l'importance respective des mécanismes déterministes et neuromodulateurs au cours du développement. Confortant l'idée selon laquelle le développement précoce met en place un plan d'organisation fonctionnelle utilisé toute la vie, nos observations montrent que des modifications même légères du programme de segmentation entraînent une modification permanente du comportement respiratoire, en dépit de la grande plasticité des réseaux neuronaux pendant le développement fœtal et post-natal.

Etape 3. La respiration devient vitale à la naissance : la signification biologique des mécanismes de développement dépend de la fonction du circuit neuronal définitif.

Il est évident que le processus de segmentation embryonnaire influence l'organisation anatomo-fonctionnelle du tronc cérébral à la naissance. Conformément à l'organisation segmentaire, nous avons pu distinguer dans cette thèse les systèmes pré-Bötzinger médullaire, anti-apnéique para-facial, et le contrôle de l'inspiration par le pont rostral. Nous avons aussi souligné que le contrôle rythmique de l'ouverture de la gueule, le réflexe de retournement et les réponses respiratoires chémosensorielles dépendent de la subdivision du tronc cérébral selon l'axe antéro-postérieur en domaines moteurs branchiaux (trigeminal, facial, vagalglossopharyngien). Ces comportements fournissent des indices intéressants en clinique pour l'exploration fonctionnelle des pathologies respiratoires et pour orienter la recherche d'anomalies anatomiques aux différents étages du tronc cérébral. Il existe donc bien dans le tronc cérébral une organisation anatomique modulaire des réseaux neuronaux, qui reflète les subdivisions du tube neural embryonnaire.

L'influence de la segmentation embryonnaire ne se limite cependant pas à la mise en place de l'organisation anatomique globale du tronc cérébral. La « formation réticulée » du tronc cérébral ne possède d'ailleurs pas d'organisation anatomique claire ni de nucléarisation évidente. De plus, il n'existe pas de subdivision de la formation réticulée qui soit sélectivement impliquée dans une seule fonction physiologique, de telle sorte que des neurones situés au même endroit participent au contrôle respiratoire, cardio-vasculaire ou alimentaire. En fait, plusieurs exemples présentés dans cette thèse permettent de dissocier les conséquences anatomiques et fonctionnelles des anomalies de segmentation. L'étendue des aberrations anatomiques ne permet pas de prédire la gravité des anomalies physiologiques et la survie à la naissance. Ainsi, les mutants kr/kr présentent des remaniements anatomiques majeurs comportant l'élimination de larges domaines de la formation réticulée et un

positionnement anormal des noyaux moteurs les uns par rapport aux autres. Pourtant leur respiration est normale (publication 2). En revanche, des modifications significatives du comportement respiratoire sont détectables alors que les anomalies anatomiques sont mineures (traitement de l'embryon par de faibles doses d'acide rétinoïque, publication 5) ou indétectables (mutants +/kr, publication 2). Nous considérons donc, dans cet exemple précis, qu'au cours de l'évolution la pression de sélection a pu s'exercer au moins autant sur les modifications comportementales que sur le détail de l'organisation anatomique cérébrale pour conserver de la voie de signalisation *kreisler* chez les mammifères.

Il en est probablement de même des autres gènes de segmentation. Ainsi, l'importance vitale de la fonction anti-apnéique chez les mammifères et de la commande épisodique des poumons chez les premiers tétrapodes contribuent certainement à la conservation de la signalisation moléculaire responsable de la mise en place des rhombomères r3 et r4. Nos résultats montrent que c'est pendant les premiers jours post-nataux chez la souris que ce groupe respiratoire anti-apnéique joue un rôle vital. Cet oscillateur, couplé au générateur médullaire du pBC par des interactions sensibles aux neuromodulations opioïdes, semble très important pour la génération, chez la souris nouveau-née d'un rythme respiratoire stable et régulier.

Le schéma de développement du réseau neuronal respiratoire explique que les événements précoces de l'embryogenèse, comme la segmentation, ont plus de poids sur la fonction respiratoire néonatale que des phénomènes plus tardifs, tels que la mise en place de la transmission synaptique cholinergique. Notre étude montre que les gènes peuvent contrôler plus ou moins finement les valeurs des paramètres respiratoires en influant sur la mise en marche de circuits spécifiques, intégrés ensuite au réseau neuronal respiratoire. Ainsi, divers troubles génétiques du développement se traduisent par des modifications anatomofonctionnelles précises et l'apparition de comportements respiratoires définis. Cependant, cette liaison forte entre contrôle génétique et respiration ne doit pas faire oublier la part importante de l'environnement dans l'occurrence des différents comportements respiratoires.

BIBLIOGRAPHIE

Abadie, V., Champagnat, J., Fortin, G., and Couly, G. (1999). Sucking-deglutition-respiration and brain stem development genes. *Arch.Pediatr.* **6** [10], 1043-1047.

Abadie, V., Champagnat, J., and Fortin, G. (2000). Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport* **11** [1], 141-145.

Akilesh, M. R., Kamper, M., Li, A., and Nattie, E. E. (1997). Effects of unilateral lesions of retrotrapezoid nucleus on breathing in awake rats. *J.Appl.Physiol.* 82 [2], 469-479.

Allen, W. F. (1927). Experimental anatomical studies on the visceral bulbospinal pathway in the cat and guinea pig. *J.Comp.Neurol.* **42**, 393-456.

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

Arvidsson, U., Dado, R. J., Riedl, M., Lee, J. H., Law, P. Y., Loh, H. H., Elde, R., and Wessendorf, M. W. (1995). delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J.Neurosci.* **15** [2], 1215-1235.

Auclair, F., Valdes, N., and Marchand, R. (1996). Rhombomere-specific origin of branchial and visceral motoneurons of the facial nerve in the rat embryo. *J.Comp.Neurol.* **369** [3], 451-461.

B

Barrow, J. R., Stadler, H. S., and Capecchi, M. R. (2000). Roles of *Hoxa1* and *Hoxa2* in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* **127** [5], 933-944.

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

Bartlett, D. Jr (1989). Respiratory functions of the larynx. Physiol. Rev. 69 [1], 33-57.

Becker, N., Seitanidou, T., Murphy, P., Mattei, M. G., Topilko, P., Nieto, M. A., Wilkinson, D. G., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P. (1994). Several receptor tyrosine kinase genes of the Eph family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mech.Dev.* **47** [1], 3-17.

Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., and Strahle, U. (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat.Neurosci.* **5** [2], 111-118.

Bellingham, M. C. & Funk, G. D. (2000). Cholinergic modulation of respiratory brain-stem neurons and its function in sleep-wake state determination. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **27** [1-2], 132-137.
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** [2], 231-254.

Bernard, V., Brana, C., Liste, I., Lockridge, O., and Bloch, B. (2003). Dramatic depletion of cell surface m2 muscarinic receptor due to limited delivery from intracytoplasmic stores in neurons of acetylcholinesterase-deficient mice. *Mol.Cell Neurosci.* **23** [1], 121-133.

Bertrand, F. & Hugelin, A. (1971). Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J.Neurophysiol.* **34** [2], 189-207.

Bianchi, A. L. (1971). [Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation]. *J.Physiol.(Paris)* **63** [1], 5-40.

Bianchi, A. L. & Barillot, J. C. (1982). Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: pontile, medullary, spinal and vagal projections. *Neurosci.Lett.* **31** [3], 277-282.

Bianchi, A. L., Grelot, L., Iscoe, S., and Remmers, J. E. (1988). Electrophysiological properties of rostral medullary respiratory neurones in the cat: an intracellular study. *J.Physiol.* **407**, 293-310.

Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M., and Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol.Rev.* **75** [1], 1-45.

Biscoe, T. J. & Purves, M. J. (1967). Observations on the rhythmic variation in the cat carotid body chemoreceptor activity which has the same period as respiration. *J.Physiol.* **190** [3], 389-412.

Blanchi B., Kelly L. M., Viemari J.-C., Lafon I., Burnet H., Bevengut M., Tillmanns S., Daniel L., Graf T., Hilaire G., and Sieweke M. H. (2003). MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat. Neurosci.* **6** [10], 1091-1100.

Blanco, C. E. (1994). Maturation of fetal breathing activity. Biol.Neonate 65 [3-4], 182-188.

Blumberg, B., Bolado, J. Jr, Moreno, T. A., Kintner, C., Evans, R. M., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* **124** [2], 373-379.

Bodineau, L., Frugiere, A., Marlot, D., and Wallois, F. (2000a). Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci.Lett.* **280** [2], 111-114.

Bodineau, L., Frugiere, A., Marlot, D., and Wallois, F. (2000b). Effect of hypoxia on the activity of respiratory and non-respiratory modulated retrotrapezoid neurons of the cat. *Auton.Neurosci.* **86** [1-2], 70-77.

Bodineau, L., Cayetanot, F., and Frugiere, A. (2000c). Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an in vitro study in neonatal rat. *Neurosci.Lett.* **295** [1-2], 67-69.

Bodineau, L. & Larnicol, N. (2001). Brainstem and hypothalamic areas activated by tissue hypoxia: Fos-like immunoreactivity induced by carbon monoxide inhalation in the rat. *Neuroscience* **108** [4], 643-653.

Bodineau, L., Cayetanot, F., and Frugiere, A. (2001). Fos study of ponto-medullary areas involved in the in vitro hypoxic respiratory depression. *Neuroreport* **12** [18], 3913-3916.

Bonham, A. C. & McCrimmon, D. R. (1990). Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. *J.Physiol.* **427**, 261-280.

Bonora, M., Marlot, D., Gautier, H., and Duron, B. (1984). Effects of hypoxia on ventilation during postnatal development in conscious kittens. *J.Appl.Physiol.* **56** [6], 1464-1471.

Borday, V. (1997). Importance de la segmentation du cerveau postérieur de l'embryon pour la genèse du rythme respiratoire à la naissance. Thèse de L'Université Paris XI, 85-92.

Borday, V., Kato, F., and Champagnat, J. (1997). A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. *Neuroreport* **8** [17], 3679-3683.

Brandon, E. P., Lin, W., D'Amour, K. A., Pizzo, D. P., Dominguez, B., Sugiura, Y., Thode, S., Ko, C. P., Thal, L. J., Gage, F. H., and Lee, K. F. (2003). Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J.Neurosci.* **23** [2], 539-549.

Breen, S., Rees, S., and Walker, D. (1997). Identification of brainstem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. *Brain Res.* **748** [1-2], 107-121.

Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., and Ericson, J. (1999). Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398** [6728], 622-627.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101** [4], 435-445.

Bronner-Fraser, M. (1994). Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J.* **8** [10], 699-706.

Buckler, K. J., Williams, B. A., and Honore, E. (2000). An oxygen-, acid- and anaestheticsensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J.Physiol.* **525 Pt 1**, 135-142.

Butera, R. J. Jr, Rinzel, J., and Smith, J. C. (1999a). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *J.Neurophysiol.* **82** [1], 398-415.

Butera, R. J. Jr, Rinzel, J., and Smith, J. C. (1999b). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J.Neurophysiol.* **82** [1], 382-397.

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** [1], 59-66.

С

Caille, D., Vibert, J. F., and Hugelin, A. (1981). Apneusis and apnea after parabrachial or Kolliker-Fuse N. lesion; influence of wakefulness. *Respir.Physiol.* **45** [1], 79-95.

Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Chisaka, O., Manley, N. R., and Capecchi, M. R. (1993). Loss of *Hox-A1* (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* **118** [4], 1063-1075.

Chamberlin, N. L., Bocchiaro, C. M., Greene, R. W., and Feldman, J. L. (2002). Nicotinic excitation of rat hypoglossal motoneurons. *Neuroscience* **115** [3], 861-870.

Champagnat, J., Denavit-Saubié, M., Henry, J. L., and Leviel, V. (1979). Catecholaminergic depressant effects on bulbar respiratory mechanisms. *Brain Res.* **160** [1], 57-68.

Champagnat, J. & Fortin, G. (1997). Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *Trends.Neurosci.* **20** [3], 119-124.

Chariot, A., Gielen, J., Merville, M. P., and Bours, V. (1999). The homeodomain-containing proteins: an update on their interacting partners. *Biochem.Pharmacol.* **58** [12], 1851-1857.

Cherniack, N. S. & Longobardo, G. S. (1986). Abnormalities of the respiratory rhythm. Cherniack, N. S. and Widdicombe, J. G. Handbook of Physiology. [sect. 3 vol. II], 729-749. Bethesda, MD, The American Physiological Society.

Clarke, J. D. & Lumsden, A. (1993). Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development* **118** [1], 151-162.

Clewlow, F., Dawes, G. S., Johnston, B. M., and Walker, D. W. (1983). Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J.Physiol.* **341**, 463-476.

Cohen-Cory, S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* **298** [5594], 770-776.

Cohen, M. I. & Wang, S. C. (1959). Respiratory neuronal activity in pons of cat. *J.Neurophysiol.* **22**, 33-50.

Cohn, M. J. (2002). Evolutionary biology: lamprey Hox genes and the origin of jaws. *Nature* **416** [6879], 386-387.

Conlon, R. A. & Rossant, J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* **116** [2], 357-368.

Connelly, C. A., Ellenberger, H. H., and Feldman, J. L. (1990). Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. *Am.J.Physiol.* **258** [2 Pt 1], L33-L44.

Cordes, S. P. & Barsh, G. S. (1994). The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* **79** [6], 1025-1034.

Couly, G. F., Coltey, P. M., and Le Douarin, N. M. (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development* **114** [1], 1-15.

Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B., and Le Douarin, N. M. (1998). Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between *Hox* gene expression and lower jaw development. *Development* **125** [17], 3445-3459.

Couly, G., Creuzet, S., Bennaceur, S., Vincent, C., and Le Douarin, N. M. (2002). Interactions between *Hox*-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development* **129** [4], 1061-1073.

Creuzet, S., Couly, G., Vincent, C., and Le Douarin, N. M. (2002). Negative effect of *Hox* gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* **129** [18], 4301-4313.

D

Davenne, M., Maconochie, M. K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F. (1999). *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* **22**, 677-691.

Davies, R. O. & Edwards, M. W. Jr (1973). Distribution of carotid body chemoreceptor afferents in the medulla of the cat. *Brain Res.* **64**, 451-454.

Dawes, G. S., Gardner, W. N., Johnston, B. M., and Walker, D. W. (1983). Breathing in fetal lambs: the effect of brain stem section. *J.Physiol.(Lond.)* **335**, 535-553.

Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, E. M. Jr, Snider, W. D., and Korsmeyer, S. J. (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* **17** [3], 401-411.

Del Negro, C. A., Johnson, S. M., Butera, R. J., and Smith, J. C. (2001). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *J.Neurophysiol.* **86** [1], 59-74.

Del Negro, C. A., Koshiya, N., Butera, R. J. Jr, and Smith, J. C. (2002a). Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *J.Neurophysiol.* **88** [5], 2242-2250.

Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C., and Feldman, J. L. (2002b). Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* **34** [5], 821-830.

Denavit-Saubié, M., Champagnat, J., and Zieglgansberger, W. (1978). Effects of opiates and methionine-enkephalin on pontine and bulbar respiratory neurones of the cat. *Brain Res.* **155** [1], 55-67.

Deol, MS. (1964). The abnormalities of the inner ear in *kreisler* mice. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **12.** [3.], 475.-490.

Di Fiore, J. M., Arko, M. K., Miller, M. J., Krauss, A., Betkerur, A., Zadell, A., Kenney, S. R., and Martin, R. J. (2001). Cardiorespiratory events in preterm infants referred for apnea monitoring studies. *Pediatrics* **108** [6], 1304-1308.

Di Pasquale, E., Monteau, R., and Hilaire, G. (1992). In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp.Brain Res.* **89** [2], 459-464.

Di Rocco, G., Mavilio, F., and Zappavigna, V. (1997). Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific Hox-Pbx complex. *EMBO J.* **16** [12], 3644-3654.

Domínguez del Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F., and Champagnat, J. (2001). Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J.Neurosci.* **21** [15], 5637-5642.

Donnelly, D. F. & Haddad, G. G. (1990). Prolonged apnea and impaired survival in piglets after sinus and aortic nerve section. *J.Appl.Physiol.* **68** [3], 1048-1052.

Drorbaugh, J. E. & Fenn W.O. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81-87.

Duboule, D. & Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* **8** [5], 1497-1505.

Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Pattyn, A., Brunet, J. F., and Goridis, C. (2000). The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development* **127** [23], 5191-5201.

Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Jouve, C., Brunet, J. F., and Goridis, C. (2002). The role of *Phox2b* in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis. *Development* **129** [22], 5241-5253.

Dupé, V., Davenne, M., Brocard, J., Dollé, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124** [2], 399-410.

Dupé, V., Ghyselinck, N. B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* **126** [22], 5051-5059.

Dupé, V. & Lumsden, A. (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* **128**, 2199-2208.

Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P. D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340** [6229], 140-144.

Ε

Eden, G. J. & Hanson, M. A. (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J.Physiol.* **392**, 1-9.

Eichmann, A., Grapin-Botton, A., Kelly, L., Graf, T., Le Douarin, N. M., and Sieweke, M. (1997). The expression pattern of the *mafB/kr* gene in birds and mice reveals that the kreisler phenotype does not represent a null mutant. *Mech.Dev.* **65** [1-2], 111-122.

Elde, R., Hokfelt, T., Johansson, O., and Terenius, L. (1976). Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience* **1** [4], 349-351.

Ellies, D. L., Church, V., Francis-West, P., and Lumsden, A. (2000). The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development* **127** [24], 5285-5295.

Ellies, D. L., Tucker, A. S., and Lumsden, A. (2002). Apoptosis of premigratory neural crest cells in rhombomeres 3 and 5: consequences for patterning of the branchial region. *Dev.Biol.* **251** [1], 118-128.

Erickson, J. T., Conover, J. C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G., and Katz, D. M. (1996). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J.Neurosci.* **16** [17], 5361-5371.

Erickson, J., Brosenitsch, T., and Katz, D. (2001). Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J.Neurosci.* **21** [2], 581-589.

Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* **81** [5], 747-756.

Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van, Heyningen, V, Jessell, T. M., and Briscoe, J. (1997). *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* **90** [1], 169-180.

Errchidi, S., Monteau, R., and Hilaire, G. (1991). Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an *in vitro* study. *J.Physiol.(Lond.)* **443**, 477-498.

Ezure, K. (1990). Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog.Neurobiol.* **35** [6], 429-450.

F

Fedorko, L., Kelly, E. N., and England, S. J. (1988). Importance of vagal afferents in determining ventilation in newborn rats. *J.Appl.Physiol.* **65** [3], 1033-1039.

Feldman, J. L. & Gautier, H. (1976). Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J.Neurophysiol.* **39** [1], 31-44.

Feldman, J. L. (1986). Neurophysiology of breathing in mammals. Am.Physiol.Soc. Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory System in the Brain. [sect.1, vol. IV, chapt. 9], 463-524. Washington, DC.

Fewell, J. E., Smith, F. G., and Ng, V. K. (2001). Prenatal exposure to nicotine impairs protective responses of rat pups to hypoxia in an age-dependent manner. *Respir.Physiol.* **127** [1], 61-73.

Finley, J. C., Polak, J., and Katz, D. M. (1992). Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: dopaminergic and peptidergic phenotypes. *Neuroscience* **51** [4], 973-987.

Flourens, P. (1851). Le point vital de la moelle allongée. C.R.Acad.Sci.Paris 33, 437-439.

Fortin, G., Champagnat, J., and Lumsden, A. (1994). Onset and maturation of branchio-motor activities in the chick hindbrain. *Neuroreport* **5** [9], 1149-1152.

Fortin, G., Kato, F., Lumsden, A., and Champagnat, J. (1995). Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J.Physiol.(Lond.)* **486** [Pt 3], 735-744.

Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A., and Champagnat, J. (1999). Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nat.Neurosci.* **2** [10], 873-877.

Foutz, A. S., Champagnat, J., and Denavit-Saubié, M. (1988a). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors control respiratory off-switch in cat. *Neurosci.Lett.* **87** [3], 221-226.

Foutz, A. S., Champagnat, J., and Denavit-Saubié, M. (1988b). Respiratory effects of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist, MK-801, in intact and vagotomized chronic cats. *Eur.J.Pharmacol.* **154** [2], 179-184.

Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* **344** [6265], 431-435.

Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S. P., Halamek, L. P., and Barsh, G. S. (1993). Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, kreisler (*kr*). *Development* **117** [3], 925-936.

G

Garel, S., Garcia-Dominguez, M., and Charnay, P. (2000). Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* **127** [24], 5297-5307.

Gauda, E. B., Cooper, R., Akins, P. K., and Wu, G. (2001). Prenatal nicotine affects catecholamine gene expression in newborn rat carotid body and petrosal ganglion. *J.Appl.Physiol.* **91** [5], 2157-2165.

Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). Role of *Hoxa- 2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124** [19], 3693-3702.

Gavalas, A. (2002). ArRAnging the hindbrain. Trends. Neurosci. 25 [2], 61-64.

Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wuthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78** [2], 211-223.

Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M., and Gridley, T. (1993). Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* **75** [7], 1317-1331.

Gilardi-Hebenstreit, P., Nieto, M. A., Frain, M., Mattei, M. G., Chestier, A., Wilkinson, D. G., and Charnay, P. (1992). An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* **7** [12], 2499-2506.

Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P. (2001). *Krox-20* patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev.* **15** [5], 567-580.

Giudicelli, F., Gilardi-Hebenstreit, P., Mechta-Grigoriou, F., Poquet, C., and Charnay, P. (2003). Novel activities of *Mafb* underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Dev.Biol.* **253** [1], 150-162.

Giussani, D. A., Moore, P. J., Bennet, L., Spencer, J. A., and Hanson, M. A. (1995). Alpha 1and alpha 2-adrenoreceptor actions of phentolamine and prazosin on breathing movements in fetal sheep in utero. *J.Physiol.* **486 Pt 1**), 249-255.

Goridis, C. & Brunet, J. F. (1999). Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Curr.Opin.Neurobiol.* **9** [1], 47-53.

Graham, A., Papalopulu, N., and Krumlauf, R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57** [3], 367-378.

Graham, A., Heyman, I., and Lumsden, A. (1993). Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* **119** [1], 233-245.

Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A. (1994). The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* **372** [6507], 684-686.

Grammatopoulos, G. A., Bell, E., Toole, L., Lumsden, A., and Tucker, A. S. (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* **127** [24], 5355-5365.

Grapin-Botton, A., Bonnin, M. A., McNaughton, L. A., Krumlauf, R., and Le Douarin, N. M. (1995). Plasticity of transposed rhombomeres: Hox gene induction is correlated with phenotypic modifications. *Development* **121** [9], 2707-2721.

Grapin-Botton, A., Bonnin, M. A., Sieweke, M., and Le Douarin, N. M. (1998). Defined concentrations of a posteriorizing signal are critical for *MafB/kreisler* segmental expression in the hindbrain. *Development* **125** [7], 1173-1181.

Gray, P. A., Rekling, J. C., Bocchiaro, C. M., and Feldman, J. L. (1999). Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* **286** [5444], 1566-1568.

Gray, P. A., Janczewski, W. A., Mellen, N., McCrimmon, D. R., and Feldman, J. L. (2001). Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat.Neurosci.* **4** [9], 927-930.

Greer, J. J., Smith, J. C., and Feldman, J. L. (1992). Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord in vitro. *J.Neurophysiol.* **67** [4], 996-999.

Greer, J. J., Carter, J. E., and al-Zubaidy, Z. (1995). Opioid depression of respiration in neonatal rats. *J.Physiol.* **485 Pt 3**), 845-855.

Greer, J. M., Puetz, J., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* **403** [6770], 661-665.

Grelot L., Bianchi A. L., Iscoe S., and Remmers J. E. (1988). Expiratory neurones of the rostral medulla: anatomical and functional correlates. *Neurosci. Lett.* **89**(2), 140-145.

Groc, L., Bezin, L., Jiang, H., Jackson, T. S., and Levine, R. A. (2001). Bax, Bcl-2, and cyclin expression and apoptosis in rat substantia nigra during development. *Neurosci.Lett.* **306** [3], 198-202.

Guidato, S., Prin, F., and Guthrie, S. (2003). Somatic motoneurone specification in the hindbrain: the influence of somite-derived signals, retinoic acid and *Hoxa3*. *Development* **130** [13], 2981-2996.

Η

Haddad, G. G. & Mellins, R. B. (1984). Hypoxia and respiratory control in early life. *Annu.Rev.Physiol.* 46, 629-643.

Haddad, G. G., Donnelly, D. F., and Bazzy-Asaad, A. R. (1995). Developmental control of respiration: neurobiological basis. II; Development changes in carotid body hypoxia chemosensitivity. Dempsey, J. A. and Pack, A. I. Regulation of breathing. 743-796. Marcel Dekker INC.

Hafstrom, O., Milerad, J., and Sundell, H. W. (2002a). Altered breathing pattern after prenatal nicotine exposure in the young lamb. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **166** [1], 92-97.

Hafstrom, O., Milerad, J., and Sundell, H. W. (2002b). Prenatal nicotine exposure blunts the cardiorespiratory response to hypoxia in lambs. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **166** [12 Pt 1], 1544-1549.

Hanson, M. A., Moore, P. J., Nijhuis, J. G., and Parkes, M. J. (1988). Effects of pilocarpine on breathing movements in normal, chemodenervated and brain stem-transected fetal sheep. *J.Physiol.* **400**, 415-424.

Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W., and Levine, M. (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in Drosophila. *Science* **229** [4719], 1236-1242.

Harper, R. M., Hoppenbrouwers, T., Sterman, M. B., McGinty, D. J., and Hodgman, J. (1976). Polygraphic studies of normal infants during the first six months of life. I. Heart rate and variability as a function of state. *Pediatr.Res.* **10** [11], 945-948.

Hayashida, Y., Koyano, H., and Eyzaguirre, C. (1980). An intracellular study of chemosensory fibers and endings. *J.Neurophysiol.* **44** [6], 1077-1088.

Herbert, H., Moga, M. M., and Saper, C. B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J.Comp.Neurol.* **293** [4], 540-580.

Hertwig, P. (1942). Sechs neue Mutationen bei der Hausmaus in ihrer Bedeutung für allgemeine Vererbungsfragen. Z. Menschl. Vererbgslehre 26, 1-21.

Hertwig, P. (1944). Die Genese der Hirn- und Gehörorganmißbildungen bei röntgenmutierten Kreisler-Mäusen. Zeit.KonstLehre 28, 327-354.

Hertzberg, T., Hellstrom, S., Lagercrantz, H., and Pequignot, J. M. (1990). Development of the arterial chemoreflex and turnover of carotid body catecholamines in the newborn rat. *J.Physiol.* **425**, 211-225.

Heymans, J. F. & Heymans, C. (1927). Sur les modifications directes et sur la régulation réflexe de l'activité du centre respiratoire de la tête isolée de chien. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **33**, 273.

Heymans, C., Bouckaert, J. J., and Dautrebande, L. (1931). Sinus carotidien et réflexes respiratoires. II. Sensibilité du sinus carotidien aux substances chimiques. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **40** [54].

Hilaire, G., Monteau, R., and Errchidi, S. (1989). Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res.* **485** [2], 325-332.

Hilaire, G. & Pasaro, R. (2003). Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol.Sci.* **18**, 23-28.

Holder, N. & Hill, J. (1991). Retinoic acid modifies development of the midbrain-hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development* **113** [4], 1159-1170.

Hoppenbrouwers, T., Hodgman, J. E., Harper, R. M., Hofmann, E., Sterman, M. B., and McGinty, D. J. (1977). Polygraphic studies of normal infants during the first six months of life: III. Incidence of apnea and periodic breathing. *Pediatrics* **60** [4], 418-425.

Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M. H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E., and Krumlauf, R. (1991a). A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* **353** [6347], 861-864.

Hunt, P., Whiting, J., Muchamore, I., Marshall, H., and Krumlauf, R. (1991b). Homeobox genes and models for patterning the hindbrain and branchial arches. *Dev.Suppl.* **1**, 187-196.

Ι

Ioffe, S., Jansen, A. H., and Chernick, V. (1987). Maturation of spontaneous fetal diaphragmatic activity and fetal response to hypercapnia and hypoxemia. *J.Appl.Physiol.* **63** [2], 609-622.

Jacquin, T. D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P., and Champagnat, J. (1996). Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in *Krox-20* knockout mice. *Neuron* **17** [4], 747-758.

Jansen, A. H. & Chernick, V. (1983). Development of respiratory control. *Physiol.Rev.* 63 [2], 437-483.

Jansen, A. H. & Chernick, V. (1991). Fetal breathing and development of control of breathing. *J.Appl.Physiol.* **70** [4], 1431-1446.

Jansen, A. H., Ioffe, S., and Chernick, V. (1993). Effect of medullary lesions, vagotomy and carotid sinus denervation on fetal breathing. *Respir.Physiol.* **94** [3], 265-283.

Jodkowski, J. S., Coles, S. K., and Dick, T. E. (1994). A 'pneumotaxic centre' in rats. *Neurosci.Lett.* **172** [1-2], 67-72.

Johnston, B. M. & Gluckman, P. D. (1989). Lateral pontine lesions affect central chemosensitivity in unanesthetized fetal lambs. *J.Appl.Physiol.* **67** [3], 1113-1118.

Johnston, B. M. & Gluckman, P. D. (1993). Peripheral chemoreceptors respond to hypoxia in pontine-lesioned fetal lambs in utero. *J.Appl.Physiol.* **75** [3], 1027-1034.

Johnson, S. M., Smith, J. C., Funk, G. D., and Feldman, J. L. (1994). Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J.Neurophysiol.* **72** [6], 2598-2608.

Jordan, D. & Spyer, K. M. (1977). Studies on the termination of sinus nerve afferents. *Plügers Arch.* **369** [1], 65-73.

K

Kalia, M. & Mesulam, M. M. (1980). Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J.Comp.Neurol.* **193** [2], 467-508.

Kalia, M., Schweitzer, P., Champagnat, J., and Denavit-Saubié, M. (1993). Two distinct phases characterize maturation of neurons in the nucleus of the tractus solitarius during early development. *J.Comp.Neurol.* **327**, 37-47.

Katz, D. M., Markey, K. A., Goldstein, M., and Black, I. B. (1983). Expression of catecholaminergic characteristics by primary sensory neurons in the normal adult rat in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80** [11], 3526-3530.

Katz, D. M. & Black, I. B. (1986). Expression and regulation of catecholaminergic traits in primary sensory neurons: relationship to target innervation in vivo. *J.Neurosci.* **6** [4], 983-989.

King, G. W. (1980). Topology of ascending brainstem projections to nucleus parabrachialis in the cat. *J.Comp.Neurol.* **191** [4], 615-638.

Kinney, H. C., Filiano, J. J., Sleeper, L. A., Mandell, F., Valdes-Dapena, M., and White, W. F. (1995). Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in suddent infant death syndrome. *Science* **269** [5229], 1446-1450.

Kobayashi, K., Lemke, R. P., and Greer, J. J. (2001). Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. *J.Appl.Physiol.* **91** [1], 316-320.

Koepchen, H. P., Langhorst, P., Seller, H., Polster, J., and Wagner, P. H. (1967). [Neuronal activity in the lower brain stem with reference to the circulation]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **294** [1], 40-64.

Koshiya, N. & Smith, J. C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* **400** [6742], 360-363.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. Cell 78 [2], 191-201.

L

Lahiri, S., Mokashi, A., Mulligan, E., and Nishino, T. (1981). Comparison of aortic and carotid chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. *J.Appl.Physiol.* **51** [1], 55-61.

Langston, A. W. & Gudas, L. J. (1992). Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech.Dev.* **38** [3], 217-227.

Le Lievre, C. S. & Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **34** [1], 125-154.

Le Lievre, C. S. (1978). Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **47**, 17-37.

Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S., and Beachy, P. A. (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* **71** [1], 33-50.

Lentz, S. I., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., and Snider, W. D. (1999). Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. *J.Neurosci.* **19** [3], 1038-1048.

Leusen I.R. (1954a). Chemosensitivity of the respiratory center: influences of changes in the hydrogen ion & total buffer concentration in the central ventricles on respiration. *Am.J.Physiol.* **176**, 45-51.

Leusen I.R. (1954b). Chemosensitivity of the respiratory center. Influence of CO2 in the cerebral ventricles on respiration. *Am.J.Physiol.* **176**, 39-44.

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276** [5688], 565-570.

Li, A., Randall, M., and Nattie, E. E. (1999). CO(2) microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J.Appl.Physiol.* **87** [3], 910-919.

Liem, K. F. Jr, Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82** [6], 969-979.

Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., and Ramirez, J. M. (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat.Neurosci.* **3** [6], 600-607.

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol.Cell* **6** [6], 1389-1399.

Lipski, J., McAllen, R. M., and Spyer, K. M. (1977). The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarus. *J.Physiol.* **269** [3], 797-810.

Liste, I., Bernard, V., and Bloch, B. (2002). Acute and chronic acetylcholinesterase inhibition regulates in vivo the localization and abundance of muscarinic receptors m2 and m4 at the cell surface and in the cytoplasm of striatal neurons. *Mol.Cell Neurosci.* **20** [2], 244-256.

Liu, Y. Y., Ju, G., and Wong-Riley, M. T. (2001). Distribution and colocalization of neurotransmitters and receptors in the pre-Botzinger complex of rats. *J.Appl.Physiol.* **91** [3], 1387-1395.

Liu, Y. Y., Wong-Riley, M. T., Liu, J. P., Jia, Y., Liu, H. L., Jiao, X. Y., and Ju, G. (2002). GABAergic and glycinergic synapses onto neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Bötzinger complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur.J.Neurosci.* **16** [6], 1058-1066.

Liu, Y. Y., Wong-Riley, M. T., Liu, J. P., Jia, Y., Liu, H. L., Fujiyama, F., and Ju, G. (2003). Relationship between two types of vesicular glutamate transporters and neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Bötzinger complex of rats: light and electron microscopic studies. *Eur.J.Neurosci.* **17** [1], 41-48.

Loeschcke, H. H., Koepchen, H. P., and Gertz, K. H. (1958). Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und CO2 Druck im Liquor cerebrospinalis auf die Atmung. *Plügers Arch.* **266**, 569-585.

Loeschcke, H. H., De Lattre, J., Schlafke, M. E., and Trouth, C. O. (1970). Effects on respiration and circulation of electrically stimulating the ventral surface of the medulla oblongata. *Respir.Physiol.* **10** [2], 184-197.

Loewy, A. D. & Burton, H. (1978). Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. *J.Comp.Neurol.* **181** [2], 421-449.

Loewy, A. D., Wallach, J. H., and McKellar, S. (1981). Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Res.* **228** [1], 63-80.

Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J. R., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K+ current modulated by PO2 in type I chemoreceptor cells. *Science* **241** [4865], 580-582.

Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M., and Chambon, P. (1991). Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* **66** [6], 1105-1119.

Lumsden, A. & Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337** [6206], 424-428.

Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends.Neurosci.* **13** [8], 329-335.

Lumsden, A., Sprawson, N., and Graham, A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development JID* - 8701744 **113** [4], 1281-1291.

Lumsden, A., Clarke, J. D., Keynes, R., and Fraser, S. (1994). Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of the chick embryo hindbrain. *Development* **120** [6], 1581-1589.

Lumsden, A. & Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274** [5290], 1109-1115.

Lumsden, T. (1923a). Observations on th respiratory centres in the cat. *J.Physiol.(Lond.)* **57**, 153-160.

Lumsden, T. (1923b). Observations on the respiratory centres. J. Physiol. (Lond.) 57, 354-367.

Lundin, L. G. (1993). Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* **16** [1], 1-19.

Μ

Maconochie, M. K., Nonchev, S., Manzanares, M., Marshall, H., and Krumlauf, R. (2001). Differences in *Krox20*-dependent regulation of *Hoxa2* and *Hoxb2* during hindbrain development. *Dev.Biol.* **233** [2], 468-481.

Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr.Biol.* **6** [4], 417-426.

Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat.Rev.Neurosci.* **3** [11], 843-853.

Manzanares, M., Cordes, S., Kwan, C. T., Sham, M. H., Barsh, G. S., and Krumlauf, R. (1997). Segmental regulation of *Hoxb3* by *kreisler*. *Nature* **387** [6629], 191-195.

Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G., and Krumlauf, R. (1999a). Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development* **126** [4], 759-769.

Manzanares, M., Trainor, P. A., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C. T., Sham, M. H., Wilkinson, D. G., and Krumlauf, R. (1999b). The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. *Dev.Biol.* **211** [2], 220-237.

Manzanares, M., Bel-Vialar, S., Ariza-McNaughton, L., Ferretti, E., Marshall, H., Maconochie, M. M., Blasi, F., and Krumlauf, R. (2001). Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* **128** [18], 3595-3607.

Manzanares, M., Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, P., Marshall, H., Giudicelli, F., Martinez-Pastor, M. T., Krumlauf, R., and Charnay, P. (2002). *Krox20* and *kreisler* co-operate in the transcriptional control of segmental expression of *Hoxb3* in the developing hindbrain. *EMBO J.* **21** [3], 365-376.

Marin, F. & Puelles, L. (1995). Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur.J.Neurosci.* **7** [8], 1714-1738.

Marin, F. & Charnay, P. (2000a). Hindbrain patterning: FGFs regulate *Krox20* and *mafB/kr* expression in the otic/preotic region. *Development* **127** [22], 4925-4935.

Marin, F. & Charnay, P. (2000b). Positional regulation of *Krox-20* and *mafB/kr* expression in the developing hindbrain: potentialities of prospective rhombomeres. *Dev.Biol.* **218** [2], 220-234.

Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J. L., Ruberte, E., Olivo, J. C., Dollé, P., Gorry, P., Lumsden, A., and Chambon, P. (1993). Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development* **119** [2], 319-338.

Marlot, D. & Duron, B. (1979). Postnatal development of vagal control of breathing in the kitten. *J.Physiol.(Paris)* **75** [8], 891-900.

Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M. H., Muchamore, I., Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* **360** [6406], 737-741.

Marshall, H., Studer, M., Popperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, A., Brenner, S., and Krumlauf, R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* **370** [6490], 567-571.

Maves, L., Jackman, W., and Kimmel, C. B. (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* **129** [16], 3825-3837.

McGinnis, W. & Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68 [2], 283-302.

McKay, I. J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A., and Lewis, J. (1994). The *kreisler* mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* **120** [8], 2199-2211.

McKay, I. J., Lewis, J., and Lumsden, A. (1996). The role of FGF-3 in early inner ear development: an analysis in normal and *kreisler* mutant mice. *Dev.Biol.* **174** [2], 370-378.

McLean, H. A., Kimura, N., Kogo, N., Perry, S. F., and Remmers, J. E. (1995). Fictive respiratory rhythm in the isolated brainstem of frogs. *J.Comp.Physiol.* **176** [5], 703-713.

Mellen, N. M., Janczewski, W. A., Bocchiaro, C. M., and Feldman, J. L. (2003). Opioidinduced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* **37** [5], 821-826.

Mellitzer, G., Xu, Q., and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* **400** [6739], 77-81.

Merrill, E. G. (1970). The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambigualis, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Res.* **24** [1], 11-28.

Merrill, E. G. (1979). Is there reciprocal inhibition between medullary inspiratory and expiratory neurones ? von Euler, C. and Lagercrantz, H. Central Nervous Cnontrol Mechanisms in Breathing. 239-254. Oxford, Pergamon.

Merrill, E. G. (1981). Where are the real respiratory neurons? Fed. Proc. 40 [9], 2389-2394.

Middleton, G., Cox, S. W., Korsmeyer, S., and Davies, A. M. (2000). Differences in *bcl-2*and *bax*-independent function in regulating apoptosis in sensory neuron populations. *Eur.J.Neurosci.* **12** [3], 819-827.

Misgeld, T., Burgess, R. W., Lewis, R. M., Cunningham, J. M., Lichtman, J. W., and Sanes, J. R. (2002). Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* **36** [4], 635-648.

Mitchell, R. A., Loeschcke, H. H., Severinghaus, J. W., Richardson, B. W., and Massion, W. H. (1963). Regions of respiratory chemosensitivity on the surface of the medulla. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **109**, 661-681.

Moga, M. M., Herbert, H., Hurley, K. M., Yasui, Y., Gray, T. S., and Saper, C. B. (1990). Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *J.Comp.Neurol.* **295** [4], 624-661.

Monteau, R., Morin, D., and Hilaire, G. (1990). Acetylcholine and central chemosensitivity: in vitro study in the newborn rat. *Respir.Physiol.* **81** [2], 241-253.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Gacel, G., Champagnat, J., Roques, B. P., and Denavit-Saubié, M. (1984a). Different effects of mu and delta opiate agonists on respiration. *Eur.J.Pharmacol.* **98** [2], 235-240.

Morin-Surun, M. P., Gacel, G., Champagnat, J., Denavit-Saubié, M., and Roques, B. P. (1984b). Pharmacological identification of delta and mu opiate receptors on bulbar respiratory neurons. *Eur.J.Pharmacol.* **98** [2], 241-247.

Morin-Surun, M. P., Champagnat, J., Boudinot, E., and Denavit-Saubié, M. (1984c). Differentiation of two respiratory areas in the cat medulla using kainic acid. *Respir.Physiol.* **58** [3], 323-334.

Morin-Surun, M. P. and Denavit-Saubié, M. (1989). Rhythmic discharges in the perfused isolated brainstem preparation of adult guinea pig. *Neurosci.Lett.* **101** [1], 57-61.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Sarraseca, H., Fortin, G., and Denavit-Saubié, M. (1992). Respiratory network remains functional in a mature guinea pig brainstem isolated *in vitro*. *Exp.Brain Res.* **90** [2], 375-383.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Schafer, T., and Denavit-Saubié, M. (1994). Brain stem chemosensitivity: its implication in central respiratory regulation. *Biol.Neonate* **65** [3-4], 166-170.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Kato, F., Foutz, A. S., and Denavit-Saubié, M. (1995a). Involvement of NMDA receptors in the respiratory phase transition is different in the adult guinea pig in vivo and in the isolated brain stem preparation. *J.Neurophysiol.* **74** [2], 770-778.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Schafer, T., and Denavit-Saubié, M. (1995b). Localization of chemosensitive structures in the isolated brainstem of adult guinea-pig. *J.Physiol.* **485** Pt **1**), 203-212.

Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Dubois, C., Matthes, H. W., Kieffer, B. L., Denavit-Saubié, M., Champagnat, J., and Foutz, A. S. (2001). Respiratory function in adult mice lacking the mu-opioid receptor: role of delta-receptors. *Eur.J.Neurosci.* **13** [9], 1703-1710.

Morrison, S. F., Cravo, S. L., and Wilfehrt, H. M. (1994). Pontine lesions produce apneusis in the rat. *Brain Res.* **652** [1], 83-86.

Mortola, J. P. (1984). Breathing pattern in newborns. J.Appl.Physiol. 56 [6], 1533-1540.

Mortola, J. P. & Noworaj, A. (1984). Breathing pattern and growth: comparative aspects. *J.Comp.Physiol.* **155**, 171-176.

Mortola, J. P. (1987). Dynamics of breathing in newborn mammals. *Physiol.Rev.* **67** [1], 187-243.

Ν

Naeye, R. L., Fisher, R., Ryser, M., and Whalen, P. (1976). Carotid body in the sudden infant death syndrome. *Science* **191** [4227], 567-569.

Nakayama, S. and von Baumgarten, R. (1964). Localisierung absteigender Atmungsbahnen im Rückenmark der Katze antidromer reizung. *Pflugers Arch.Ges.Physiol.* **281**, 231-244.

Nattie, E. E., Wood, J., Mega, A., and Goritski, W. (1989). Rostral ventrolateral medulla muscarinic receptor involvement in central ventilatory chemosensitivity. *J.Appl.Physiol.* **66** [3], 1462-1470.

Nattie, E. E., Li, A. H., and St John, W. M. (1991). Lesions in retrotrapezoid nucleus decrease ventilatory output in anesthetized or decerebrate cats. *J.Appl.Physiol.* **71** [4], 1364-1375.

Nattie, E. E., Gdovin, M., and Li, A. (1993a). Retrotrapezoid nucleus glutamate receptors: control of CO2-sensitive phrenic and sympathetic output. *J.Appl.Physiol.* **74** [6], 2958-2968.

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

Nattie, E. E. & Li, A. (1994a). Retrotrapezoid nucleus glutamate injections: long-term stimulation of phrenic activity. *J.Appl.Physiol.* **76** [2], 760-772.

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

Nattie, E. E. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir.Physiol.* **129** [1-2], 257-268.

Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat.Genet.* **21** [4], 444-448.

Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Dollé, P. (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127** [1], 75-85.

Noden, D. M. (1983). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev.Biol.* **96** [1], 144-165.

Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M. H., Krumlauf, R., and Charnay, P. (1996). Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development* **122** [2], 543-554.

Norgren, R. (1978). Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* **3** [2], 207-218.

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** [2], 99-118.

0

Oku, Y., Tanaka, I., and Ezure, K. (1992). Possible inspiratory off-switch neurones in the ventrolateral medulla of the cat. *Neuroreport* **3** [10], 933-936.

Onimaru, H. & Homma, I. (1987). Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* **403** [2], 380-384.

Onimaru, H., Arata, A., and Homma, I. (1995). Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Exp.Brain Res.* **106** [1], 57-68.

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

Oosterveen, T., Niederreither, K., Dollé, P., Chambon, P., Meijlink, F., and Deschamps, J. (2003). Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' Hoxb genes in posterior hindbrain. *EMBO J.* **22** [2], 262-269.

Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 14, 453-501.

Otake, K., Sasaki, H., Mannen, H., and Ezure, K. (1987). Morphology of expiratory neurons of the Botzinger complex: an HRP study in the cat. *J.Comp.Neurol.* **258** [4], 565-579.

Otake, K., Sasaki, H., Ezure, K., and Manabe, M. (1989). Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. *J.Comp.Neurol.* **286** [2], 218-230.

Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat.Rev.Neurosci.* **3** [9], 715-727.

Р

Pascual, O., Denavit-Saubié, M., Dumas, S., Kietzmann, T., Ghilini, G., Mallet, J., and Pequignot, J. M. (2001). Selective cardiorespiratory and catecholaminergic areas express the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) under in vivo hypoxia in rat brainstem. *Eur.J.Neurosci.* **14** [12], 1981-1991.

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

Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., and Rijli, F. M. (2000). Ectopic *Hoxa2* induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in Xenopus. *Development* **127** [24], 5367-5378.

Paton, J. F., Ramirez, J. M., and Richter, D. W. (1994). Functionally intact in vitro preparation generating respiratory activity in neonatal and mature mammals. *Plügers Arch.* **428** [3-4], 250-260.

Paton, J. F. & Richter, D. W. (1995). Role of fast inhibitory synaptic mechanisms in respiratory rhythm generation in the maturing mouse. *J.Physiol.* **484 Pt 2**), 505-521.

Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet, J. (2000a). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene *Phox2b*. *Development* **127** [7], 1349-1358.

Pattyn, A., Goridis, C., and Brunet, J. F. (2000b). Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene *Phox2b*. *Mol.Cell Neurosci.* **15** [3], 235-243.

Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J. M., Samad, O. A., Krumlauf, R., Rijli, F. M., Brunet, J. F., and Ericson, J. (2003). Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev.* **17** [6], 729-737.

Pearce, R. A., Stornetta, R. L., and Guyenet, P. G. (1989). Retrotrapezoid nucleus in the rat. *Neurosci.Lett.* **101** [2], 138-142.

Peers, C. & Kemp, P. J. (2001). Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respir.Res.* **2** [3], 145-149.

Perrin, D. G., Cutz, E., Becker, L. E., Bryan, A. C., Madapallimatum, A., and Sole, M. J. (1984). Sudden infant death syndrome: increased carotid-body dopamine and noradrenaline content. *Lancet* **2** [8402], 535-537.

Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T. M. (1999). A sonic hedgehogindependent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97** [7], 903-915.

Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding, M., and Jessell, T. M. (2001). Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* **29** [2], 367-384.

Poon, C. S., Zhou, Z., and Champagnat, J. (2000). NMDA receptor activity in utero averts respiratory depression and anomalous long-term depression in newborn mice. *J.Neurosci.* **20** [9], RC73.

Popperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S. K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R. S., and Krumlauf, R. (1995). Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* **81** [7], 1031-1042.

Prince, V. & Lumsden, A. (1994). Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* **120** [4], 911-923.

R

Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J., and Richter, D. W. (1996). Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J.Physiol.* **491** Pt **3**), 799-812.

Rekling, J. C., Champagnat, J., and Denavit-Saubié, M. (1996). Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J.Neurophysiol.* **75** [2], 795-810.

Rekling, J. C., Shao, X. M., and Feldman, J. L. (2000). Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the preBotzinger complex. *J.Neurosci.* **20** [23], RC113.

Ricardo, J. A. & Koh, E. T. (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], 1-26.

Riche, D., Denavit-Saubié, M., and Champagnat, J. (1979). Pontine afferents to the medullary respiratory system: anatomofunctional correlation. *Neurosci.Lett.* **13** [2], 151-155.

Richter, D. W. (1982). Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J.Exp.Biol.* **100**, 93-107.

Richter, D. W., Ballantyne, D., and Remmers, J. E. (1986). How is the respiratory rhythm generated? *News Physiol.Sci.* **1**, 109-112.

Richter, D. W. & Spyer, K. M. (2001). Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of *in vivo* and *in vitro* models. *Trends.Neurosci.* **24** [8], 464-472.

Rijli, F., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P., and Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa2*, which act as a selector gene. *Cell* **75**, 1333-1349.

Ritter, B. & Zhang, W. (2000). Early postnatal maturation of GABAA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur.J.Neurosci.* **12** [8], 2975-2984.

Robinson, D. M., Peebles, K. C., Kwok, H., Adams, B. M., Clarke, L. L., Woollard, G. A., and Funk, G. D. (2002). Prenatal nicotine exposure increases apnoea and reduces nicotinic potentiation of hypoglossal inspiratory output in mice. *J.Physiol.* **538** [Pt 3], 957-973.

Ross, C. A., Ruggiero, D. A., and Reis, D. J. (1985). Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J.Comp.Neurol.* **242** [4], 511-534.

Rossel, M. & Capecchi, M. R. (1999). Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* **126** [22], 5027-5040.

Rovainen, C. M. (1996). Feeding and breathing in lampreys. *Brain Behav.Evol.* 48 [5], 297-305.

S

Saper, C. B., Loewy, A. D., Swanson, L. W., and Cowan, W. M. (1976). Direct hypothalamoautonomic connections. *Brain Res.* **117** [2], 305-312.

Schlaefke, M. E. & Loeschcke, H. H. (1967). Lokalisation eines an der Regulation von Atmung und Kreislauf beteiligten Gebietes an der ventralen Oberfläche der Medulla oblongata durch Kälteblockade. *Plügers Arch.* **297**, 201-220.

Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P. (1993). Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* **75** [6], 1199-1214.

Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P., and Lumsden, A. (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of *Krox-20* mouse mutants. *Development* **124** [6], 1215-1226.

Schweitzer, P., Pierrefiche, O., Foutz, A. S., and Denavit-Saubié, M. (1990). Effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade on breathing pattern in newborn cat. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **56** [2], 290-293.

Schweitzer, P., Fortin, G., Beloeil, J. C., and Champagnat, J. (1992). In vitro study of newborn rat brain maturation: implication for sudden infant death syndrome. *Neurochem.Int.* **20** [1], 109-112.

Scott, M. P. (1992). Vertebrate homeobox gene nomenclature. Cell 71 [4], 551-553.

Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D. G., and Charnay, P. (1997). Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mech.Dev.* **65** [1-2], 31-42.

Sham, M. H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R. D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P., and Krumlauf, R. (1993). The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* **72** [2], 183-196.

Shao, X. M. & Feldman, J. L. (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** [4], 1853-1860.

Shao, X. M. & Feldman, J. L. (2000). Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in pre-Bötzinger complex inspiratory neurons. *J.Neurophysiol.* **83** [3], 1243-1252.

Shao, X. M. & Feldman, J. L. (2001). Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBotzinger complex. *J.Neurophysiol.* **85** [6], 2461-2467.

Shao, X. M. & Feldman, J. L. (2002). Pharmacology of nicotinic receptors in pre-Bötzinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. *J.Neurophysiol.* **88** [4], 1851-1858.

Simantov, R., Kuhar, M. J., Uhl, G. R., and Snyder, S. H. (1977). Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74** [5], 2167-2171.

Smith, J. C., Morrison, D. E., Ellenberger, H. H., Otto, M. R., and Feldman, J. L. (1989). Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J.Comp.Neurol.* **281** [1], 69-96.

Smith, J. C., Greer, J. J., Liu, G. S., and 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** [4], 1149-1169.

Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., and Feldman, J. L. (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254** [5032], 726-729.

Smith, J. C., Butera, R. J., Koshiya, N., Del Negro, C., Wilson, C. G., and Johnson, S. M. (2000). Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemakernetwork model. *Respir.Physiol.* **122** [2-3], 131-147.

Solomon, I. C., Edelman, N. H., and Neubauer, J. A. (2000). Pre-Botzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J.Neurophysiol.* **83** [5], 2854-2868.

Spyer, K. M. & Richter, D. W. (1986). Integrative mechanisms within the nucleus of the solitary tract. von Euler, C. and Lagercrantz, H. Neurobiology oh the Control of Breathing. 291-295. New York, Raven Press.

St-John, W. M. & Leiter, J. C. (1999). Maternal nicotine depresses eupneic ventilation of neonatal rats. *Neurosci.Lett.* **267** [3], 206-208.

Stella, G. (1938). On the mechanisms of production, and the physiological significance of "apneusis". *J.Physiol.(Lond.)* **93**, 10-23.

Strohl, K. P. (2003). Periodic breathing and genetics. *Respir.Physiolo.Neurobiol.* **135** [2-3], 179-185.

Studer, M., Popperl, H., Marshall, H., Kuroiwa, A., and Krumlauf, R. (1994). Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* **265** [5179], 1728-1732.

Studer, M. (2001). Initiation of facial motoneurone migration is dependent on rhombomeres 5 and 6. *Development* **128** [19], 3707-3716.

Suzue, T. (1984). Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J.Physiol.(Lond.)* **354**, 173-183.

Suzue, T. (1994). Mouse fetuses in late gestation maintained in vitro by a transplacental perfusion method and their physiological activities. *Neurosci.Res.* **21** [2], 173-176.

Svoboda, K. R., Vijayaraghavan, S., and Tanguay, R. L. (2002). Nicotinic receptors mediate changes in spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine. *J.Neurosci.* **22** [24], 10731-10741.

Swiatek, P. J. & Gridley, T. (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev.* 7 [11], 2071-2084.

Swindell, E. C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T. M., and Eichele, G. (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev.Biol.* **216** [1], 282-296.

Т

Takeuchi, Y., McLean, J. H., and Hopkins, D. A. (1982). Reciprocal connections between the amygdala and parabrachial nuclei: ultrastructural demonstration by degeneration and axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res.* **239** [2], 583-588.

Tanabe, Y. & Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274** [5290], 1115-1123.

Tanabe, Y., William, C., and Jessell, T. M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95** [1], 67-80.

Ter Horst, G. J., de Boer, P., Luiten, P. G., and van Willigen, J. D. (1989). Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* **31** [3], 785-797.

Theil, T., Frain, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Flenniken, A., Charnay, P., and Wilkinson, D. G. (1998). Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development* **125** [3], 443-452.

Theil, T., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Brodie, J., Krumlauf, R., and Wilkinson, D. G. (2002). Requirement for downregulation of *kreisler* during late patterning of the hindbrain. *Development* **129** [6], 1477-1485.

Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., and Ramirez, J. M. (2000a). The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *J.Neurosci.* **20** [8], 2994-3005.

Thoby-Brisson, M. & Ramirez, J. M. (2000b). Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response to the respiratory network *in vitro*. *J.Neurosci.* **20** [15], 5858-5866.

Thoby-Brisson, M. & Ramirez, J. M. (2001). Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J.Neurophysiol.* **86** [1], 104-112.

Thoby-Brisson M., Cauli B., Champagnat J., Fortin G., and Katz D.M. (2003). Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *J. Neurosci.* **23** [20], 7685-7689.

Topilko P., Schneider-Maunoury S., Levi G., Baron-Van Evercooren A., Chennoufi A.B., Seitanidou T., Babinet C. and Charnay P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, **371** [6500], 796-769.

Trainor, P. A. & Krumlauf, R. (2001). Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **13** [6], 698-705.

Trippenbach, T. (1986). Developmental aspects of respiratory reflexes. von Euler, C. and Lagercrantz, H. Neurobiology of the control of breathing. 283-290. New York, Raven Press.

Trouth, C. O., Millis, R. M., Bernard, D. G., Pan, Y., Whittaker, J. A., and Archer, P. W. (1993). Cholinergic-opioid interactions at brainstem respiratory chemosensitive areas in cats. *Neurotoxicology* **14** [4], 459-467.

Tryba, A. K., Pena, F., and Ramirez, J. M. (2003). Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *J.Neurosci.* 23 [8], 3538-3546.

V

Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T. M., and Ericson, J. (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* **31** [5], 743-755.

Vert, P., Aranda, J. V., Catz, C., and Yaffe S. (1994). Control of breathing during development, apnea of the newborn and in suffen infant death syndrome. *Biol.Neonate* **65**, 133-280.

Vesque, C., Maconochie, M., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Kuroiwa, A., Charnay, P., and Krumlauf, R. (1996). Hoxb-2 transcriptional activation in rhombomeres 3 and 5 requires an evolutionarily conserved cis-acting element in addition to the Krox-20 binding site. *EMBO J.* **15** [19], 5383-5396.

Vincent, A., Jean, A., and Tell, F. (1996). Developmental study of N-methyl-D-aspartateinduced firing activity and whole-cell currents in nucleus tractus solitarii neurons. *Eur.J.Neurosci.* 8 [12], 2748-2752.

Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2001). Hindbrain patterning: *Krox20* couples segmentation and specification of regional identity. *Development* **128** [24], 4967-4978.

von Euler, C. & Soederberg, U. (1952a). Medullary chemosensitive receptors. *J.Physiol.(Lond.)* **118**, 545-555.

von Euler, C. & Soederberg, U. (1952b). Slow potentials in the respiratory centers. *J.Physiol.(Lond.)* **118**, 555-564.

von Euler, C., Marttila, I., Remmers, J. E., and Trippenbach, T. (1976). Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta Physiol.Scand.* **96** [3], 324-337.

von Euler, C. (1986). Brainstem mechanisms for generation and control of breathing pattern. Am.Physiol.Soc. Handbook of Physiology. 1-67. Bethesda, MD.

W

Wakimoto, B. T. and Kaufman, T. C. (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in Drosophila melanogaster. *Dev.Biol.* **81** [1], 51-64.

Wakimoto, B. T., Turner, F. R., and Kaufman, T. C. (1984). Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. *Dev.Biol.* **102** [1], 147-172.

Walker, D. W., Lee, B., and Nitsos, I. (2000). Effect of hypoxia on respiratory activity in the foetus. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **27** [1-2], 110-113.

Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I. M., Dickson, C., and Mason, I. (2002). Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Curr.Biol.* **12** [13], 1117-1123.

Wang, W., Fung, M. L., and St John, W. M. (1993). Pontile regulation of ventilatory activity in the adult rat. *J.Appl.Physiol.* **74** [6], 2801-2811.

Weintraub, Z., Cates, D., Kwiatkowski, K., Al-Hathlol, K., Hussain, A., and Rigatto, H. (2001). The morphology of periodic breathing in infants and adults. *Respir.Physiol.* **127** [2-3], 173-184.

Wendling, O., Dennefeld, C., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* **127** [8], 1553-1562.

Wendling, O., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., and Mark, M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* **128**, 2031-2038.

William, C. M., Tanabe, Y., and Jessell, T. M. (2003). Regulation of motor neuron subtype identity by repressor activity of Mnx class homeodomain proteins. *Development* **130** [8], 1523-1536.

Wingate, R. J. & Lumsden, A. (1996). Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental hindbrain. *Development* **122** [7], 2143-2152.

Х

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., and Wilkinson, D. G. (1999). *In vivo* cell sorting in complementary segmental domains mediated by *Eph* receptors and *ephrins*. *Nature* **399** [6733], 267-271.

Ζ

Zheng, Y., Riche, D., Rekling, J. C., Foutz, A. S., and Denavit-Saubié, M. (1998). Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res.* **782** [1-2], 113-125.

Résumé

Notre but était de délimiter dans le rhombencéphale segmenté de l'embryon de souris, les territoires importants pour le maintien du comportement respiratoire à la naissance. Nous avons comparé les anomalies de ce comportement (hypoventilation, apnées, respiration épisodique) induites par modification du programme de segmentation embryonnaire (invalidation des gènes *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Krox20*, mutation *kreisler*, traitement par l'acide rétinoïque). Nous avons identifié un domaire para-facial dérivé des rhombomères r3 et r4, d'où provient un système neuronal anti-apnéique (i) vital chez la souris pendant le premier jour postnatal, (ii) antagoniste des mécanismes enképhalinergiques déprimant la fréquence respiratoire, (iii) distinct du mécanisme rythmogène médullaire.

Des modifications même légères du programme de segmentation (mutation *kreisler* hétérozygote, acide rétinoïque administré à très faible dose) entraînent des défauts permanents du comportement respiratoire. Ces déficits fonctionnels d'origine segmentaire ne sont donc pas compensés par plasticité neuronale ou synaptique, comme nous l'avons observé, par exemple, après invalidation du gène de l'acétylcholine estérase.

En conclusion, nous subdivisons le générateur respiratoire en deux modules, l'un parafacial, l'autre médullaire, conformément à un plan d'organisation établi dès le début du stade embryonnaire de segmentation. L'oscillateur para-facial assurerait la stabilité et la régularité du rythme respiratoire néonatal, en relation avec la neuro-modulation opioïde au niveau du générateur médullaire.

Mots-clés : Tronc cérébral, segmentation embryonnaire, comportement respiratoire, souris nouveau-née, gènes *Hox, Krox20, kreisler*, acide rétinoïque.

Regionalisation of the neural tube and development of neuronal circuits: studies about the neuronal network controlling breathing rhythm in the brainstem of transgenic mice.

Summary

This work aimed at identify, in the regionalised hindbrain of the mouse, the territories critical for a maintained breathing behaviour at birth. The present results lie upon comparison of the anomalies of this behaviour (apneas, hypoventilation, episodic breathing) induced by modification of the segmental embryonic program (invalidation of *Hoxa1*, *Hoxa2* and *Krox20* genes, *kreisler* mutations, treatment with retinoic acid). We define a para-facial area originating in r3/r4, which develops into an vital anti-apneic system (i) active in mice during the first postnatal day, (ii) antagonist of opioid mechanisms depressing the breathing rhythm, (iii) distinct from the medullary rhythm generator.

Even slight modifications of the segmentation program (heterozygous *kreisler* mutation, treatment with low doses of retinoi acid) induce permanent defects of the respiratory behaviour. Thus, hese functional deifcits from segmental origin are not compensated by synaptic or neuronal plasticity, as we observed, by example, after invalidation of the acetylcholinesterase gene.

In conclusion, we divide the respiratory generator into two modules, one para-facial and the other medullary, acording to a organisation scheme established in the very first hours of the embryonic segmentation. The para-facial oscillator would ensure stability and regularity of the respiratory rhythm in relation with the opioid neuro-modulation in the medullary generator.

Keywords: brainstem, embryonic segmentation, respiratory behaviour, newborn mouse, *Hox* genes, *Krox20*, *kreisler*, retinoic acid.