

Université de Montréal

**Contrôle nerveux de la respiration chez la lamproie**

par

Kianoush Missaghi

Département de neurosciences

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de docteur en neurosciences

Août 2017

© Kianoush Missaghi 2017

## Résumé

La respiration est une activité motrice rythmique essentielle maintenue tout au long de la vie. Des réseaux de neurones appelés « générateurs de rythme » sont responsables de produire les contractions musculaires rythmiques nécessaires à la respiration et ce, chez l'ensemble des vertébrés. Ces réseaux de neurones sont étudiés chez les mammifères, mais les détails de leur organisation demeurent inconnus. Nous avons eu recours à la lamproie en tant que modèle animal d'un vertébré basal afin d'étudier les réseaux neuronaux de la respiration. Un avantage important de ce modèle expérimental est que nous pouvons enregistrer l'activité nerveuse de groupes/ou de neurones unitaires à même une préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Chez la lamproie, deux rythmes respiratoires sont observés : un rythme rapide (rythme principal) et un rythme lent. Des études antérieures ont démontré que le rythme rapide est généré au niveau du pôle rostro-latéral du noyau moteur V, une région nommée « groupe respiratoire paratrigéminal (pTRG) » ; alors que le rythme lent serait généré dans la partie caudale du rhombencéphale par un groupe respiratoire caudal (CRG) de neurones.

Les résultats de cette thèse ont d'abord permis de caractériser anatomiquement et physiologiquement les connexions entre le pTRG des deux côtés du cerveau, ainsi que les connexions entre le pTRG et les motoneurones respiratoires. Nous avons trouvé que la région du pTRG comprend différentes populations de neurones : des neurones projetant vers leur homologue controlatéral et des neurones projetant vers les motoneurones respiratoires du même côté, ou des deux côtés. Nos enregistrements de neurones du pTRG ont démontré que l'activité nerveuse de ces derniers est en phase avec le rythme respiratoire. Nous avons également montré que ces neurones possèdent une arborisation axonale complexe, incluant des

projections bilatérales vers les groupes de motoneurones respiratoires dans le tronc cérébral, ainsi que des connexions reliant les pTRGs de chaque côté.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé, pour la première fois, la localisation et l'organisation partielle des réseaux neuronaux qui sous-tendent la genèse du rythme respiratoire lent. Des expériences anatomiques ont révélé la présence de populations de neurones distribuées le long des colonnes des motoneurones respiratoires dans la moitié caudale du rhombencéphale, plus précisément dans le tegmentum médian et latéral, dans le rdV, dans la région près du sulcus limitans ainsi qu'à travers et à proximité des noyaux moteurs VII, IX et X. Ces neurones envoient des projections de l'autre côté ainsi que vers le pTRG des deux côtés. Des expériences physiologiques ont montré que l'activation des régions comprenant les différentes populations de neurones du CRG, tout au long des colonnes de motoneurones respiratoires, est en mesure de produire de longues bouffées de décharges caractéristiques du rythme lent. Alors qu'à l'inverse, une inactivation bilatérale d'environ un tiers du rhombencéphale caudal abolit ce rythme ( $VII_m/IX_m/X_m$  (portion rostrale) et  $X_m$  (portion caudale)). De plus, nous avons démontré que nous pouvions abolir le rythme lent sans affecter le rythme rapide, dans une préparation *in vitro* de tronc cérébral intact. Finalement, des enregistrements intracellulaires ont montré que la région du CRG possède des neurones affichant une activité rythmique en phase avec celle du rythme lent.

Dans leur ensemble, nos résultats démontrent que le pTRG possède des réseaux de neurones présentant des réseaux de connexions pouvant soutenir la synchronisation bilatérale du rythme respiratoire rapide et que des neurones du pTRG peuvent projeter à la fois au pTRG opposé ainsi qu'aux motoneurones des deux côtés, ajoutant ainsi une redondance et une

stabilité au système respiratoire. Enfin, nos résultats démontrent également que le rythme lent est généré par des réseaux neuronaux distribués bilatéralement tout au long des noyaux moteurs du VII, IX et du X, sur toute la longueur du rhombencéphale caudal de la lamproie. Les projections d'un CRG vers son homologue controlatéral, ainsi que les projections vers le pTRG, assurent la synchronisation bilatérale du rythme lent, en plus de son interaction avec le rythme rapide.

Mots-clés : respiration, lamproie, CPG, tronc cérébral, pont, bulbe rachidien, contrôle descendant, bilatéralité, CRG, pTRG.

## Abstract

Respiration is an essential rhythmic motor activity maintained throughout life. Neural networks called “rhythm generators” are responsible to produce rhythmic muscular contractions necessary for respiration in all vertebrates. These neural networks have been studied in mammals, but their detailed organization remains unknown. We used the lamprey as an animal model of a basal vertebrate to study respiratory neural networks. An important advantage of this experimental model is that we can record both groups/or single neurons in an intact brainstem preparation *in vitro*. Two respiratory rhythms can be observed in the lamprey: a fast rhythm (main rhythm) and a slow rhythm. Past studies have demonstrated that the fast rhythm is generated at the rosto-lateral pole of the V motor nucleus, a region named the paratrigeminal respiratory group (pTRG); whereas the slow rhythm was shown to be generated in the caudal part of the rhombencephalon by a caudal respiratory group (CRG) of neurons.

The results of this thesis have first characterized anatomically and physiologically the connections between the pTRG on both sides of the brain, as well as the connections between the pTRG and the respiratory motoneurons. We found that the pTRG contains different populations of neurons: neurons projecting towards their contralateral homologue and neurons projecting towards the respiratory motoneurons exclusively of the same side, or both sides of the brain. Our recordings of pTRG neurons have demonstrated that the neural activity of the latter is in phase with the respiratory rhythm. We have also shown that these neurons possess a complex axonal arborisation, including bilateral projections

towards groups of respiratory motoneurons in the brainstem, as well as connections linking the pTRGs on both sides.

Secondly, we have characterized, for the first time, the localization and the partial organization of the neural networks underlying the generation of the slow respiratory rhythm. Anatomical experiments have revealed the presence of populations of neurons distributed along the respiratory motoneuronal columns in the caudal part of the rhombencephalon. More precisely in the medial and lateral tegmentum, in the rdV, in the region close to the sulcus limitans, as well as through and in close proximity of the motor nucleus VII, IX and X. These neurons send projections to the other side and to the pTRG. Physiological experiments have shown that the activation of the regions comprising the different populations of neurons of the CRG, along the respiratory motoneuronal columns, is able to produce long bursts of discharges characteristic of the slow rhythm. Conversely, the bilateral inactivation of approximately one third of the caudal rhombencephalon abolishes that rhythm ( $VII_m/IX_m/X_m$  (rostral part) et  $X_m$  (caudal part)). Moreover, we have demonstrated that we could abolish the slow rhythm without affecting the fast rhythm, in an intact brainstem preparation *in vitro*. Finally, intracellular recordings have found that the CRG region possesses neurons that show a rhythmic activity in phase with the slow rhythm.

In summary, our results demonstrate that the pTRG possesses neuronal networks presenting connection patterns capable of supporting the bilateral synchronization of the fast respiratory rhythm, as well as neurons projecting to the pTRG on the other side, adding redundancy and stability to the respiratory system. At last, our results also

demonstrate that the slow rhythm is generated by neural networks distributed bilaterally along the motor nucleus of the VII, the IX and the X, covering the whole length of the caudal rhombencephalon of the lamprey. As for the pTRG, the projections from the CRG towards its contralateral homologue, as well as the projections towards the pTRG, assure the bilateral synchronisation of the slow rhythm and its interactions with the fast rhythm.

Keywords : respiration, lamprey, CPG, brainstem, pons, medulla, descending control, bilaterality. CRG, pTRG.

## Table des matières

|   |     |
|---|-----|
| Résumé.....   | 2   |
| Abstract.....   | 5   |
| Liste des tableaux.....   | 10  |
| Liste des figures.....  | 11  |
| Remerciements.....  | 20  |
| Introduction.....   | 22  |
| Historique de la physiologie respiratoire.....  | 24  |
| Réseaux neuronaux de la respiration chez les mammifères.....                                | 26  |
| Description de mes contributions.....   | 86  |
| Méthodologie.....   | 87  |
| Résultats.....  | 99  |
| Connectivité des réseaux neuronaux du rythme respiratoire rapide chez la lamproie.<br>..... | 100 |
| Connectivité des réseaux neuronaux responsables du rythme respiratoire lent.....            | 118 |
| Discussion.....   | 152 |
| Conclusion et perspectives futures.....   | 168 |

Bibliographie..... 172

## Liste des tableaux

|  |     |
|--|-----|
| Table 1. Résumé des projections des neurones enregistrés dans le pTRG..... | 118 |
|--|-----|

## Liste des figures

### *Figures de l'article de revue*

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Anatomie respiratoire. ....  | 29  |
| Figure 2. Respiratory activity recorded from an in vitro isolated brainstem of lamprey. ....                               | 40  |
| Figure 3. Photomicrographs of respiratory motoneurons. ....  | 44  |
| Figure 4. Localization of the region controlling the fast rhythm in the pTRG. ....   | 48  |
| Figure 5. Physiological characterization of the pTRG location. ....  | 50  |
| Figure 6. Electrophysiological and anatomical characterization of a pTRG neuron. ....                                      | 53  |
| Figure 7. Electrophysiological characterization of the locomotion/respiration interaction in the lamprey. ....             | 55  |
| Figure 8. Electrophysiological characterization of the connection between the MLR and the pTRG. ....                       | 59  |
| Figure 9. Anatomical characterization of individual MLR neurons projecting to the respiratory nuclei. ....                 | 64  |
| Figure 10. Schematics of the neural networks underlying respiration (left) and its modulation (right) in the lamprey. .... | 69  |
| Figure 11. Sites d'injection des traceurs anatomiques. ....  | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 12. Neurones marqués rétrogradement dans le pTRG projetant au pTRG controlatéral et aux motoneurones respiratoires. ....   | 104 |
| Figure 13. Distribution des neurones marqués dans le pTRG après des injections controlatérales de traceurs rétrogrades dans le pTRG et la région des motoneurones respiratoires. .... | 106 |
| Figure 14. Distribution des neurones marqués dans le pTRG après une injection de traceurs dans le pTRG et la région des motoneurones respiratoires du même côté. ....                 | 107 |
| Figure 15. Inputs descendants du pTRG vers les motoneurones respiratoires. ....   | 109 |
| Figure 16. Effet des injections de Xylocaïne sur les connexions descendantes du pTRG vers les motoneurones respiratoires. ....  | 112 |
| Figure 17. Effets des antagonistes glutamergiques sur les connexions descendantes du pTRG vers les motoneurones respiratoires. durant la stimulation du pTRG ipsilatéral. ....        | 113 |
| Figure 18. Localisation d'un neurone respiratoire enregistré dans le pTRG. ....   | 114 |
| Figure 19. Enregistrement de patch des cellules du pTRG. ....   | 115 |
| Figure 20. Reconstruction 3D d'un neurone du pTRG. ....   | 117 |
| Figure 21. Sites d'injection des traceurs anatomiques dans le pTRG et dans la partie caudale du rhombencéphale du même côté. ....   | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 22. Sites d'injections des traceurs anatomiques dans le pTRG et dans la partie caudale du rhombencéphale du côté opposé. ....  | 120 |
| Figure 23. Distribution des neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG et vers le tegmentum latéral controlatéraux (voir Fig. 20). ....  | 121 |
| Figure 24. Localisation et distribution des neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG ipsilatéral et vers le tegmentum latéral controlatéral (voir Fig. 21). ....                   | 122 |
| Figure 25. Distribution des trois types de populations de neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG et vers le tegmentum latéral controlatéral.. ....                               | 125 |
| Figure 26. Neurones rétro-marqués dans le noyau facial (VII <sub>m</sub> ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20). ....                             | 126 |
| Figure 27. Neurones rétro-marqués dans le noyau glossopharyngien (IX <sub>m</sub> ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20). ....                    | 126 |
| Figure 28. Neurones rétro-marqués dans le noyau vague (X <sub>m</sub> ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20). ....                                | 126 |
| Figure 29. Neurones rétro-marqués dans le noyau facial (VII <sub>m</sub> ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). ....          | 127 |
| Figure 30. Neurones rétro-marqués dans le noyau glossopharyngien (IX <sub>m</sub> ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). .... | 127 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 31. Neurones rétromarqués dans le noyau vague ( $X_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). ..... | 127 |
| Figure 32. Enregistrements extracellulaires du rythme respiratoire lent dans le rhombencéphale caudal. ....   | 129 |
| Figure 33. Stimulations électriques le long des pools de motoneurones respiratoires. . ....   | 131 |
| Figure 34. Éjections locales de DL-glutamate le long des pools de motoneurones respiratoires. ....  | 133 |
| Figure 35. Injections de Xylocaïne dans la partie rostrale et caudale du tegmentum latéral, le long des pools de motoneurones respiratoires. ....   | 135 |
| Figure 36. Effets de lésions transverses sur le rythme respiratoire lent dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé. ....  | 137 |
| Figure 37. Effets de lésions transverses sur le rythme respiratoire lent dans un cerveau de lamproie. ....  | 139 |
| Figure 38. Perfusion en bain de substance P et d'antagonistes glutamatergiques au-dessus d'une préparation de rhombencéphale caudal isolé. ....   | 141 |
| Figure 39. ....   | 142 |
| Figure 40. Stimulations électriques dans une préparation de tronc cérébral intact. ....   | 145 |
| Figure 41. Stimulations glutamatergiques dans une préparation de tronc cérébral intact. ....  | 147 |

Figure 42. Expériences d'inactivation à la Xylocaïne au niveau du VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub> dans une  
préparation de tronc cérébral intact..... 148

Figure 43. Expériences d'inactivation à la Xylocaïne au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub> dans  
une préparation de tronc cérébral intact..... 149

Figure 44. Caractérisation physiologique des neurones du CRG. .... 150

## Liste des abréviations

AMPA : Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)-propanoïque

AP-5 : Acide (2R)-amino-5-phosphonopentanoïque

ARRN : Noyau réticulaire rhombencéphalique antérieur

BötC : Complexe Bötzinger

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

CO<sub>2</sub> : Gaz carbonique

CRG : Groupe respiratoire caudal

CPG : Générateur central de patron

cVRG : Groupe respiratoire ventral caudal

DRG : Groupe respiratoire dorsal

EPSC : Courant post-synaptique exciteur

EPSP : Potentiel post-synaptique exciteur

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

I1 : cellule isthmique de Müller 1

I2 : cellule isthmique de Müller 2

ICAN : Conductance non-spécifique activée par le calcium

INaP : Conductance persistante sodique

IX : Noyau moteur glossopharyngien

KF : Noyau Kölliker-Fuse

LPBr : Région latérale parabrachiale

Mes : Mésencéphale

Mlf : Fascicule longitudinal médian

MLR : Région locomotrice du mésencéphale

MN : Motoneurone

mV : Racine motrice du trijumeau

NMDA : Acide N-Methyl-D-aspartique

NOMA : Noyau octavomoteur antérieur

O<sub>2</sub> : Oxygène

OLA : région octavolatérale

pFRG : groupe respiratoire parafacial

PreBötC : Complexe pré-Bötzinger

PRG : Groupe respiratoire pontique

Pro : Prosencéphale

PRRN : Noyau réticulaire rhombencéphalique postérieur

PT : Tubercule postérieur

pTRG : Groupe respiratoire paratrigéminal

RTN : Noyau rétro-trapèzoïde

rDV : Racine descendante trigéminal

rVRG : Group respiratoire ventral rostral

sep : Couche sous-épendymaire

VII : Noyau moteur facial

VRG : Groupe respiratoire ventral

X : Noyau moteur vague

XII : Noyau hypoglosse

*« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité, le flambeau qui éclaire le monde. » - Louis Pasteur*

Mondor, Henri (1945). Pasteur. Paris (France): Corrêa, 189pp.

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Pr. Réjean Dubuc, pour la confiance qu'il a eue en mes capacités de pouvoir participer à l'avancement des connaissances en neurosciences. Son soutien et ses précieux conseils ont été des facteurs déterminants à la poursuite de mon doctorat.

Je remercie notre technicienne de laboratoire Danielle Veilleux et notre assistant de recherche François Auclair pour avoir contribué de manière significative à ma formation d'apprenti chercheur. Je ne peux également pas passer sous silence leur aide indispensable à l'avancement de mon projet. Je tiens également à remercier Frédéric Bernard, ainsi que Christian Valiquette pour leur soutien respectif lors de la conception de figures et le développement de programmes nécessaires à l'analyse de résultats expérimentaux.

J'aimerais aussi profiter de cette section pour adresser une mention spéciale à mon collègue et post-doctorant Jean-Patrick Le Gal, qui m'a supervisé et conseillé tout au long de la rédaction de ma thèse. Son aide précieuse et son dévouement envers mon travail ont grandement contribué à rendre possible la réalisation de cette thèse.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire du Pr. Réjean Dubuc que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces nombreuses années. Plusieurs d'entre eux ont eu une grande influence sur moi : Laurent Juvin, Dominique Derjean, Gheylen Daghfous, Dimitri Ryczko, Émilie Trillaud-Doppia, Swantje Grätsch, Jean-François Gariépy et Jean-Patrick Le Gal.

Enfin, j'aimerais remercier les professeurs et chercheurs qui m'ont inspiré et influencé au cours de mes études : Jannic Boehm, Serge Rossignol, John Kalaska, Jean-Claude Lacaille, Richard Robitaille, Trevor Drew et Arlette Kolta.

# **Introduction**

La respiration est une fonction motrice indispensable au maintien de la vie de tous les animaux. « Life and respiration are convertible terms, for there is no life without breathing, and no breathing without life » (citation de William Harvey mentionnée dans Curtis, 2015). Elle a pour principal rôle d'assurer les échanges gazeux entre un organisme et son environnement. Plus précisément, la respiration assure l'apport d'oxygène nécessaire à tous les processus énergétiques cellulaires, tout en permettant le rejet de gaz carbonique. La citation ci-dessous de Micheal Faraday et William Crookes (1861) illustre l'importance de ce mécanisme :

*A man in twenty-four hours converts as much as seven ounces of carbon into carbonic acid; a milk cow will convert seventy ounces, and a horse seventy-nine ounces, solely by the act of respiration. That is, the horse in twenty-four hours burns seventy-nine ounces of charcoal, or carbon, in his organs of respiration to supply his natural warmth in that time [...], not in a free state, but in a state of combination.*

De par son rôle primordial à la survie des organismes, la respiration doit être maintenue du début jusqu'à la fin de la vie. Malgré son aspect de fonction rythmique "automatique", elle reste néanmoins hautement modulable. En effet, la respiration est en permanence influencée par de nombreux comportements, tels que : la vocalisation, la déglutition, le vomissement, l'éternuement, la toux, la défécation et l'exercice physique (Dutschmann et al., 2014; Eldridge et al., 1981; Shannon et al., 2004 ; Wallois et al., 1995). Chez les mammifères, les circuits contrôlant la respiration s'étendent du pont (pour revue, voir Dutschmann et Dick, 2012) jusqu'à la moelle épinière (pour revue, voir Feldman et Del Negro, 2006). Toutefois, une région du bulbe rachidien nommée complexe pre-Bötzinger

(preBötC) a été démontrée comme jouant un rôle primordial dans l'activité respiratoire (Smith et al., 1991). Cette structure, qui a été retrouvée et étudiée chez de nombreuses espèces (souris, rat, lapin, chèvre...), est reconnue de façon quasi-unanime comme étant le générateur du rythme inspiratoire chez les mammifères.

Dans la première partie de cette thèse, un survol historique du domaine de la physiologie respiratoire sera présenté. Par la suite, nous présenterons à la fois les différentes populations de motoneurones impliquées dans le contrôle des muscles respiratoires, ainsi que les groupes d'interneurones responsables de la genèse des rythmes inspiratoire et expiratoire chez les mammifères. Enfin, une revue de questions pour laquelle je suis premier auteur viendra compléter l'introduction. Cette revue de questions porte sur le contrôle nerveux de la respiration chez la lamproie. Les aspects comparatifs entre les circuits qui génèrent la respiration chez la lamproie et les autres vertébrés y sont également abordés.

### **Historique de la physiologie respiratoire**

En Chine, en Inde, de même qu'en Grèce, la pensée générale était que la respiration et le cœur étaient reliés à l'esprit et l'âme (4000 à 500 av. J.-C.) (Gandevia, 1970a,b). Dès l'antiquité, l'arrêt de la respiration était le plus souvent associé à la mort, à la perte de mouvement et de chaleur (Gandevia, 1970a,b). Des écrits provenant du Papyrus D'Ebers (c. 1550 av. J.-C.) révèlent que les égyptiens possédaient déjà des traitements visant à traiter des maladies des voies respiratoires telles que l'asthme (Gandevia, 1970a). Il faudra cependant attendre la fin de la période de la Grèce antique avant que de nouvelles découvertes ne bousculent le domaine de la médecine et plus particulièrement celui de la respiration. Les

Alexandrins (300 av. J.-C.) sont en partie responsables de l'avancement des connaissances en médecine, notamment grâce à la pratique de la dissection humaine (criminels et morts) et animale (Debru, 2000).

À cette même époque, plusieurs hypothèses farfelues concernant le rôle de la respiration circulaient déjà. Les prédécesseurs d'Aristote pensaient que la respiration servait à alimenter notre feu intérieur, soit en d'autres mots, notre chaleur vitale (Aristote, 350 av. J.-C., traduit par Ross). Pour Aristote, seuls les animaux pourvus de poumons étaient capables de respirer. Selon lui, l'inspiration et l'expiration constituaient deux phases indissociables de la respiration et cette dernière permettait de refroidir les excès de chaleur produits par le cœur (Aristote, 350 av. J.-C., traduit par Ross). Quelques siècles plus tard, Claude Galien, médecin grec formé à l'école de médecine d'Hippocrate, a fait sa réputation à travers l'étude des blessures subies par les gladiateurs. Tout comme Hippocrate qui considérait qu'il n'y avait rien de mieux que les guerres pour l'avancement de la médecine, Claude Galien était particulièrement doué pour faire le lien entre l'observation des blessures et la fonction des nerfs et/ou organes affectés (Norman, 2011). Par exemple, en observant qu'un gladiateur blessé au haut du cou mourrait, alors qu'une blessure plus basse laissait le gladiateur paralysé et encore capable de respirer, il découvre que le nerf phrénique innerve le diaphragme. Plus tard, des expériences menées sur des porcs lui ont permis d'entrevoir que le rythme respiratoire prenait naissance dans le système nerveux central, en amont de la moelle épinière. Il observa également qu'une section de la moelle épinière au niveau de la 2<sup>e</sup> vertèbre abolissait la respiration, alors que la même section au niveau de la 6<sup>e</sup> vertèbre engendrait une perte de mouvement thoracique, malgré la préservation de la respiration diaphragmatique (pour revue, voir Norman, 2011 et Gandevia,

1970b). Ce n'est que vers la fin du 18<sup>e</sup> jusqu'au début du 20<sup>e</sup> siècle que les travaux de Legallois (pour revue, voir Cheung, 2013), Breuer (1868) et Lumsden (1923a,b,c), sur la base d'expériences lésionnelles, ont ainsi permis de démontrer que l'activité respiratoire reposait sur des circuits nerveux localisés dans le tronc cérébral, dans une région s'étendant du pont jusqu'à la moelle.

Dans ce contexte, mes travaux de doctorat ont porté sur l'étude des réseaux de neurones impliqués dans la genèse du rythme respiratoire chez la lamproie. Dans les sections qui suivent, je présenterai tout d'abord un aperçu des connaissances actuelles sur les réseaux respiratoires des mammifères. Par la suite, une présentation détaillée des réseaux respiratoires de la lamproie sera abordée à travers un article de revue de question intégré à l'introduction.

## **Réseaux neuronaux de la respiration chez les mammifères**

### *Muscles et motoneurones respiratoires*

Chez les mammifères, la respiration au repos est caractérisée par une phase inspiratoire active et une phase expiratoire passive. Dans certaines circonstances, telles que pendant un exercice physique ou lors de certaines activités motrices réflexes (ex : éternuement et toux), l'expiration devient une phase active du cycle respiratoire. Les activités inspiratoires et expiratoires sont contrôlées par des muscles spécifiques. Parmi ces muscles, on distingue les muscles des voies aériennes supérieures, les muscles abdominaux, les muscles intercostaux et le diaphragme. Ce dernier constitue le principal muscle respiratoire, assurant à lui seul 75% de l'activité inspiratoire. Au repos, la phase inspiratoire est caractérisée par une expansion de la cage thoracique suivant la contraction du diaphragme poussant les viscères vers le bas et

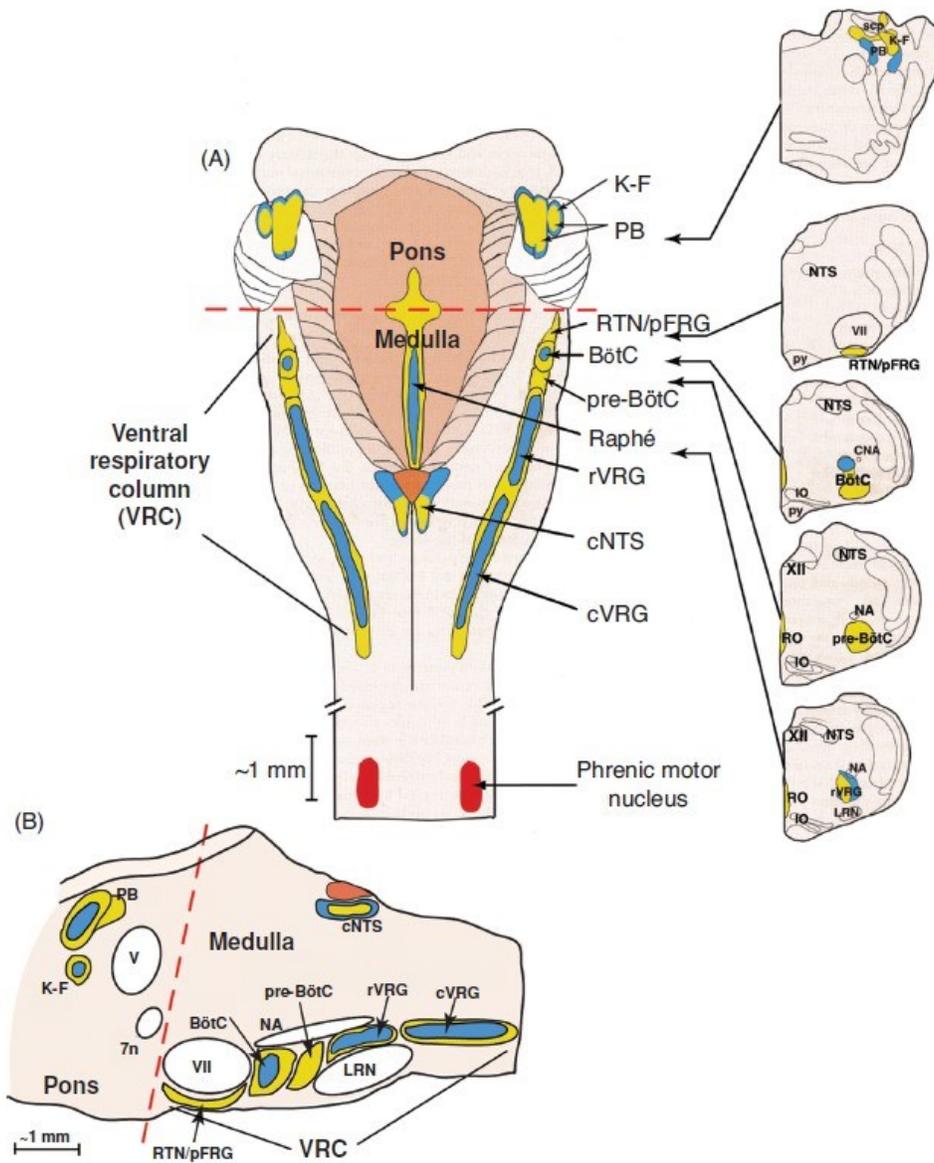
permettant aux poumons de s'allonger créant ainsi une dépression favorisant une entrée d'air au sein de ces derniers. La relaxation subséquente du diaphragme marque le début de la phase expiratoire passive, définie par un affaissement de la cage thoracique qui combiné au poids des viscères entraîne une réduction du volume d'air contenu dans les poumons. Chez les mammifères, le diaphragme est contrôlé par des motoneurones situés au niveau de la moelle épinière cervicale, entre les segments C3 et C7 (Mantilla et al., 2014). Ces motoneurones reçoivent des projections issues de la partie rostrale du groupe respiratoire ventral (rVRG) et du groupe respiratoire dorsal (DRG) (Lee et Fuller, 2011).

En soutien au diaphragme, les muscles intercostaux externes sont également impliqués lors de la phase inspiratoire. De par leur localisation anatomique, la contraction de ces muscles contribue à accroître le volume de la cage thoracique. Concernant l'expiration, les principaux muscles impliqués sont les muscles intercostaux internes ainsi que les muscles abdominaux. En effet, la contraction des muscles intercostaux internes et des muscles abdominaux participent à l'abaissement et l'affaissement des côtes augmentant ainsi la pression intra-abdominale et l'élévation du diaphragme, favorisant ainsi la vidange des poumons. Des travaux menés chez le rat ont permis de déterminer que les muscles intercostaux sont innervés par des motoneurones localisés entre les segments C7 et T13, alors que les motoneurones des muscles abdominaux se trouvent entre les segments T8 et L2 (Giraudin et al., 2008). Une population de neurones du noyau rétro-ambigu (NRA), comprise dans la partie caudale du VRG (cVRG), est quant à elle responsable de l'activation des motoneurones impliqués dans l'innervation des muscles intercostaux et abdominaux (Boers et al., 2006).

*Régions du tronc cérébral impliquées dans la respiration (Fig. 1)*

Les expériences basées sur des lésions du tronc cérébral ont grandement contribué à la découverte des régions centrales impliquées dans la genèse du rythme respiratoire. Les travaux pionniers de Lumsden (1923a,b,c) ont ainsi permis d'identifier trois régions du tronc cérébral nécessaires à la coordination entre les phases inspiratoire et expiratoire chez le chat. Il démontra notamment qu'une lésion séparant le pont et le bulbe rachidien engendrait une activité respiratoire caractérisée par des inspirations prolongées (apneuse), alors qu'une lésion plus caudale au niveau du bulbe rachidien rostral abolissait la respiration apneustique. Lumsden dénomma la région comprise entre le pont et la partie rostrale du bulbe rachidien le « centre apneustique ». Une fois ce centre séparé de la partie caudale du bulbe rachidien, seule une activité inspiratoire haletante persistait. Finalement, il observa qu'une lésion de la partie caudale du bulbe rachidien induisait un arrêt total de l'activité inspiratoire.

Il est maintenant admis que le complexe preBötC, situé dans le bulbe rachidien, constitue la structure essentielle à la genèse du rythme inspiratoire (révisé dans Feldman et Del Negro, 2006). En effet, le preBötC comprend des neurones rythmiques actifs pendant l'inspiration et sa lésion entraîne l'abolition de la respiration (Smith et al., 1991).



**Figure 1. Anatomie respiratoire.** A: Illustration du tronc cérébral des mammifères sur le plan frontal indiquant les régions connues pour être impliquées dans le contrôle de la respiration. B : Illustration d'une coupe sagittale du tronc cérébral illustré en A. Noter que le complexe post-inspiratoire (PiCo), récemment découvert, serait localisé à proximité du NA, dorsal au BötC, rostral au preBötC et caudal au RTN/pFRG. Illustration tiré de Lindsey et al., 2012.

### *Le complexe Pre-Bötzinger*

Le preBötC est situé dans le bulbe, accolé à la partie caudale du complexe Bötzinger (BötC) et ventral aux neurones moteurs du noyau ambigu (Smith et al., 1991; Reikling et Feldman, 1998). Les travaux de Smith (1991) ont permis de déterminer le rôle du preBötC dans la rythmogenèse respiratoire. Une série de sections transversales réalisées sur une préparation de tronc cérébral isolé *in vitro* de rat nouveau-né a permis de montrer qu'une lésion complète du preBötC abolissait le rythme inspiratoire. La genèse du rythme reposerait à la fois sur des neurones présentant des propriétés rythmiques intrinsèques, ainsi que sur des interactions neuronales spécifiques au sein du preBötC (pour revue, voir Feldman et Kam, 2015). En effet, il a été montré que l'activité rythmique du preBötC impliquerait des populations de neurones exprimant soit des conductances membranaires voltage-dépendantes sodiques persistantes ( $I_{NaP}$ ), soit des conductances calciques non-spécifiques ( $I_{can}$ ) (Thoby-Brisson et Ramirez, 2001; Del Negro et al., 2002). Par ailleurs, il a été démontré que le blocage des récepteurs glutamatergiques de type rapide (AMPA et Kainate) par l'application de 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) abolit le rythme respiratoire (Greer et al., 1991; Smith et al., 1991). En ce sens, la destruction sélective par laser des neurones glutamatergiques exprimant le gène homéotique *Dbx1* dans le preBötC provoque l'arrêt du rythme inspiratoire (Wang et al., 2014). De plus, l'inactivation du gène « *Robo 3* » impliqué dans le contrôle de la décussation des axones des interneurons glutamatergiques, entraîne une désynchronisation de l'activité générée dans le preBötC (Bouvier et al., 2010). Ces résultats soulignent non seulement l'importance du preBötC dans la genèse du rythme inspiratoire,

mais également le rôle crucial des neurones glutamatergiques dans l'élaboration de ce même rythme.

### *Le complexe Bötzinger*

Au repos, le complexe BötC présente des neurones rythmiquement actifs après l'inspiration (post-I) et durant la phase expiratoire passive (E2). En plus de participer au contrôle de la transition entre les phases inspiratoire et expiratoire, cette structure est également une source majeure d'activité expiratoire (Merrill, 1981; Ezure et al., 2003; pour revue, voir Richter et Smith 2014). Les neurones du BötC sont interconnectés avec ceux du preBötC via des projections inhibitrices. Ces projections ont pour rôle de façonner le patron d'activité inspiratoire généré par le preBötC (Richter et Smith, 2014). Le BötC possède également des projections excitatrices vers les neurones reliés à l'expiration dans le cVRG et dans la moelle épinière, ainsi que des connexions inhibitrices vers les régions plus caudales du VRG et de la moelle épinière (Bongianni et al., 1990; Anders et al., 1991; Song et Shao, 2000). En effet, il a été démontré que des stimulations appliquées dans la moelle épinière et dans le NRA induisent des réponses antidromiques au niveau des neurones du complexe Bötzinger (Fedorko et Merrill, 1984). Enfin, des connexions diffuses vers le côté controlatéral et vers le noyau Kölliker-Fuse du pont ont également été identifiées par marquage anatomique (Ezure et al., 2003).

### *RTN/pFRG*

Alors que le preBötC est considéré comme le centre de genèse de la respiration, un groupe de chercheurs a longtemps soutenu que le siège de la rythmogenèse respiratoire est

plutôt constitué de neurones localisés en périphérie du noyau moteur facial (VIIIn) (Onimaru et Homma, 2003). En ce sens, Onimaru et Homma (2003) ont observé que des neurones localisés à la surface ventrale de cette région sont actifs avant l'apparition des bouffées inspiratoires enregistrées au niveau du nerf phrénique. Ces neurones sont connus sous le nom de neurones pré-inspiratoires (pre-I) (Onimaru et al., 1997) et leur existence supporte l'hypothèse selon laquelle ils pourraient participer à l'élaboration du rythme respiratoire (Mellen et al., 2003; Onimaru et Homma, 2003; Feldman et Del Negro, 2006).

Cette région nommée groupe respiratoire parafacial (pFRG) comprend également les neurones de la partie ventrale du noyau rétro-trapézoïde (RTN). C'est pourquoi, ce centre respiratoire est plus communément nommé RTN/pFRG (Onimaru et Homma, 2003). Il reçoit entre autres des afférences sensorielles du noyau du tractus solitaire (NTS) (Smith et al., 1989; Connelly et al., 1990; révisé dans Guyenet et Mulkey, 2010), connu pour être un centre intégrateur des afférences provenant des chimiorécepteurs périphériques (Davies et Edwards, 1973; Jordan et Spyer, 1977; Lipski, 1979). Des travaux ont également montré que les neurones pre-I sont sensibles aux variations de pCO<sub>2</sub> (Onimaru et al., 2008) et pourraient donc jouer un rôle crucial dans la chimiosensibilité centrale ainsi que dans l'adaptation de la fréquence respiratoire lors d'hypercapnie. Cette classe de neurones correspond à une population spécifique exprimant les récepteurs à la neurokinine 1, ainsi que le facteur de transcription paired-like homeobox 2b (Phox2b) (Onimaru et al., 2008; Guyenet et Mulkey, 2010).

En raison de ses propriétés rythmogènes et chimiosensibles, le RTN/pFRG a également été proposé comme étant le générateur de l'activité expiratoire (Onimaru et al., 2003). En

effet, des sections transversales du tronc cérébral au niveau de cette région entraînent un arrêt de l'activité expiratoire, alors que l'activité inspiratoire n'est pas affectée (Janczewski et Feldman, 2006). L'hypothèse concernant le rôle du RTN/pFRG dans la genèse de l'expiration active est appuyée par une étude récente : l'activation optogénétique de neurones exprimant la rhodopsine 2 dans cette même région engendre des contractions des muscles abdominaux similaires à celles observées lors de l'expiration active (Pagliardini et al., 2011).

### *PiCo*

Récemment, une étude d'Anderson et al. (2016) a découvert l'existence d'un nouvel oscillateur respiratoire impliqué dans l'activité post-inspiratoire. Le complexe post-inspiratoire (PiCo) est localisé à proximité du NA, dorsal au BötC, rostral au preBötC et caudal au RTN/pFRG. Les neurones du PiCo sont caractérisés par la colocalisation de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase, et le transporteur vésiculaire VGlut2. Le PiCo interagit avec le preBötC via des connexions inhibitrices GABAergiques et des connexions excitatrices glutamatergiques durant la phase pré-inspiratoire. Il pourrait jouer un rôle dans l'adaptation de la respiration à des comportements moteurs post-inspiratoires tels que la déglutition et la vocalisation.

### *Groupe respiratoire ventral*

Le groupe respiratoire ventral (VRG) comprend la partie rostrale (rVRG) et caudale (cVRG) du NRA, localisé dans la région ventrale du bulbe rachidien jusqu' à l'obex (Feldman et al., 1985). Le cVRG contient des groupes de neurones pré-moteurs expiratoires, alors que le rVRG comprend des neurones pré-moteurs inspiratoires. Le NRA reçoit des afférences de

nombreuses régions du tronc cérébral impliquées dans la respiration, telles que : le BötC et le preBötC, la région para-ambigu du noyau solitaire, la partie ventro-latérale du noyau parabrachial, ainsi que le noyau Kölliker-Fuse et le noyau rétro-trapézoïde dans le pont (Gerrits et Holstege, 1996). Le NRA reçoit également des afférences en provenance de la substance grise périaqueducule (PAG) dans le mésencéphale (Holstege, 1989). En retour, le NRA projette directement aux motoneurones du larynx et du pharynx (Holstege, 1989; Boers et al., 2002) ainsi qu'aux motoneurones du diaphragme, des muscles intercostaux et des abdominaux (Merril, 1970).

Le NRA n'est pas impliqué dans la genèse de la respiration, mais de par les nombreuses connexions qu'il entretient avec les régions respiratoires, il contribuerait à coordonner la respiration avec d'autres activités motrices, telles que le vomissement, la toux, et l'éternuement (Subramanian et Holstege, 2009). La coordination des groupes de neurones du NRA est en partie régulée par des régions supra-spinales telles que le PAG (Subramanian et Holstege, 2009).

#### *Groupe respiratoire dorsal*

Le groupe respiratoire dorsal (DRG) est une structure localisée dans la partie médio-dorsale du bulbe. Il est constitué de la partie ventrolatérale du NTS (Monteau et Hilaire, 1991; de Castro et al., 1994). Les neurones respiratoires du DRG sont localisés dans le NTS et présentent majoritairement une activité de type inspiratoire. Le NTS est une structure clé dans l'intégration des informations sensorielles issues de nombreuses fonctions physiologiques, telles que les fonctions respiratoire, cardiovasculaire et digestive. Le NTS est la cible

principale des afférences issues des chimiorécepteurs périphériques localisés dans les sinus carotidiens (Davies et Edwards, 1973; Jordan et Spyer, 1977; Lipski, 1979). Ces chimiorécepteurs sont impliqués dans la détection des variations de l'O<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub> et du pH dans le sang artériel. Les afférences issues de ces chimiorécepteurs projettent au NTS via le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf vague (X). Le NTS reçoit également d'autres influences via le nerf vague, telles que: des afférences qui véhiculent les informations des récepteurs broncho-pulmonaires sensibles à l'étirement (Kalia et Mesulam, 1980a, b); des informations issues des récepteurs participant à la régulation de la résistance des voies aériennes; des influences provenant des récepteurs laryngo-trachéaux (Bellingham et Lipski, 1992) impliqués dans le réflexe de la toux (Jordan, 1996). Enfin, le NTS est également connecté aux structures ventrales impliquées dans la genèse du rythme respiratoire, notamment avec le preBötC (Norgren, 1978; Otake et al., 1989; Zheng et al., 1998).

#### *Groupe respiratoire pontique*

Le groupe respiratoire pontique (PRG) est composé de deux structures localisées dans la partie dorso-latérale du pont : le noyau Kölliker-Fuse (KF) et le noyau parabrachial (PB). La région du KF/PB interagit avec plusieurs centres respiratoires et constitue un relai important dans l'intégration de l'information sensorielle. La région du KF/PB envoie des projections vers toutes les régions de la colonne respiratoire ventrale (VRC) (Ellenberger et Feldman, 1990; Herbert et al., 1990). Au niveau spinal, cette même région a pour cible les motoneurones phréniques (Fulwiler et Saper, 1984; Rikard-Bell et al., 1984) ainsi que ceux responsables de la contraction des muscles respiratoires intercostaux (Rikard-Bell et al., 1985). Le KF/PB reçoit également des afférences du NTS, relayant des informations sensorielles

d'origine gustative (Norgren et Leonard, 1971), viscérale (Loewy et Burton, 1978; Ricardo et Koh, 1978), ainsi que des informations reliées au réflexe d'Hering-Breuer (révisé dans Mörschel et Dutschmann, 2009).

Les travaux de Lumsden (1923a,b,c) ont été les premiers à souligner le rôle du pont dans la respiration normale. En effet, il a démontré qu'une section transversale séparant le pont du reste du bulbe rachidien entraîne une respiration qualifiée d'apneustique, caractérisée par des inspirations prolongées (Lumsden, 1923a,b,c; Bertrand et al., 1971; Feldman et Gautier, 1976). Des enregistrements unitaires réalisés au niveau de la région du KF/PB ont démontré la présence de neurones respiratoires rythmiques (Ezure et Tanaka, 2006). Des lésions de cette même région abolissent la phase post-I du cycle respiratoire normal (Dutschmann et Herbert, 2006), alors que des lésions du PB perturbent la transition entre les phases expiratoire et inspiratoire (Cohen, 1971; von Euler, 1977; St-John et Zhou, 1991; Alheid et al., 2004; Rybak et al., 2008; Arata et al., 2010). Les expériences de lésions et le fait que plusieurs populations de neurones du KF/PB soient actives entre les deux phases respiratoires appuient l'hypothèse selon laquelle le PRG serait impliqué dans la transition entre la phase inspiratoire et expiratoire (Cohen, 1971; Cohen et Shaw, 2004).

La région du KF/PB joue également un rôle clé dans la coordination entre la respiration et les réflexes de protection des voies aériennes, tels que la toux (Shannon et al., 2004) et l'éternuement (Wallois et al., 1995). De plus, de par ses connexions descendantes vers le noyau moteur hypoglosse (XII), elle est également impliquée dans la coordination entre la respiration et la déglutition (Gestreau et al., 2005; Bonis et al., 2011). Malgré l'accumulation de nombreux résultats supportant le rôle du KF/PB dans la transition et la coordination entre

les phases inspiratoires et expiratoires, des chercheurs préconisent que le pont est une région essentielle à la genèse du rythme respiratoire normal (St-John et Paton, 2004; St-John, 2009). Selon ces derniers, le rythme respiratoire étudié dans les préparations bulbaires *in vitro* ne serait que de la respiration haletante. Leur hypothèse est basée sur le fait qu'une activité rythmique peut être enregistrée au niveau du nerf trijumeau (V) après une section séparant le pont du bulbe rachidien. Cependant, ce rythme pourrait être de nature respiratoire autant que masticatoire (St-John et Paton, 2004). Toutefois, tel que mentionné ci-dessus, les structures respiratoires pontiques sont nécessaires pour la genèse d'un rythme respiratoire triphasique tel qu'observé *in vivo*. Pour compléter, il a été démontré que la région du KF/PB joue un rôle primordial dans le couplage entre les rythmes locomoteurs et respiratoires via l'activation des afférences proprioceptives spinales (Giraudin et al. (2012).

The neural control of respiration in lampreys

Kianoush Missaghi<sup>1</sup>, Jean-Patrick Le Gal<sup>1,2</sup>, Paul A. Gray<sup>3</sup> and Réjean Dubuc<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), Département de neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup> Groupe de Recherche en Activité Physique Adaptée (GRAPA), Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

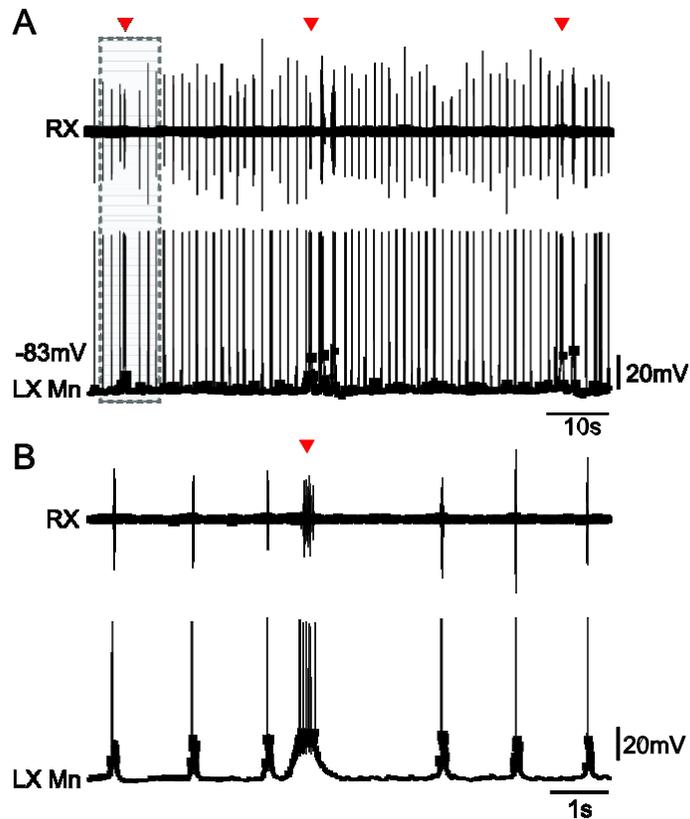
<sup>3</sup> Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University School of Medicine, St. Louis MO 63110, USA

### **Summary**

This review focuses on past and recent findings that have contributed to characterize the neural networks controlling respiration in the lamprey, a basal vertebrate. As in other vertebrates, respiration in lampreys is generated centrally in the brainstem. It is characterized by the presence of a fast and a slow respiratory rhythm. The anatomical and the basic physiological properties of the neural networks underlying the generation of the fast rhythm have been more thoroughly investigated; less is known about the generation of the slow respiratory rhythm. Comparative aspects with respiratory generators in other vertebrates as well as the mechanisms of modulation of respiration in association with locomotion are discussed.

## **1. Introduction**

Respiration is a vital rhythmic motor function, essential for regulating oxygen uptake, expel carbon-dioxide, and control pH levels both at rest and during movement. In the lamprey, a basal vertebrate, the neural circuitry underlying the generation of respiration is located in the brainstem as in other vertebrates (Kawasaki, 1981, 1984; Rovainen, 1985; Martel et al., 2007; Mutolo et al., 2007; Gariépy et al., 2012a,b). The lamprey respiratory apparatus in the periphery consists of elastic cartilaginous branchial baskets, seven on each side, containing a vascularized gill sac (Rovainen, 1977). Gas exchange in water is ensured by the synchronous contractions of muscles associated with their respective branchial pores to expel water from the gill sacs (Rovainen, 1977; Russell, 1986). Relaxation of the muscles allows the passive recoil of the branchial baskets resulting in filling the gills with fresh oxygenated water (Rovainen, 1977).



**Figure 2. Respiratory activity recorded from an in vitro isolated brainstem of lamprey.** A: Simultaneous extracellular (RX) and intracellular (LX) recordings of the vagal motoneuron pool. B: Expanded neurographic signal corresponding to the boxed area in (A). Respiration consists of two rhythms (fast and slow). Note that the fast respiratory rhythm is interrupted by long bursts of discharge (Red arrowheads).

Two distinct respiratory rhythms were described in lampreys (Fig. 1; Rovainen, 1974, 1977, 1985; Thompson, 1985; Russell, 1986; Martel et al., 2007). There is a fast respiratory rhythm (mean  $1.5 \pm 0.2$  Hz *in vivo*;  $1.0 \pm 0.3$  Hz *in vitro*) being the functional equivalent of respiration in mammals. It is generated in an area homologous to the pons of mammals, in the rostral rhombencephalon (Martel et al., 2007; Mutolo et al., 2007, 2010, 2011; Gariépy et al., 2012a,b; Cinelli et al., 2013, 2014). This generator region was named the paratrigeminal respiratory group (pTRG) (Mutolo et al., 2007). A second slower rhythm consists of longer

bursts of discharge occurring sporadically (mean period  $86.2 \pm 57.2$  s *in vivo*;  $37.4 \pm 24.9$  in semi-intact lampreys; Martel et al., 2007). It is characterized by stronger bilateral contractions of the gills. The activity occurs as single or multiple bursts uninterrupted by the fast bursts. It was shown that this activity was generated in the caudal half of the completely isolated rhombencephalon (Kawasaki, 1979; 1984; Thompson, 1985; Martel et al., 2007), in an area homologous to the medulla oblongata of mammals (Butler and Hodos, 1996; Brocard and Dubuc, 2003). We will henceforth refer to it as the caudal respiratory generator (CRG).

The neural mechanisms underlying respiration are not fully understood in vertebrates. By using *in vitro* mammalian preparations, significant advances have been made, which further our understanding of the mechanisms responsible for respiratory control. However, *in vitro* mammalian preparations present some disadvantages including: the pattern (Smith et al., 1990) and the frequency of the respiratory rhythm produced *in vitro* are different compared to the rhythm observed *in vivo*; the brainstem core is partly anoxic when isolated (Okada et al., 1993; Brockhaus et al., 1993); the use of transverse brainstem slices is generally needed to record single neurons with intracellular or patch electrodes. On the other hand, the lamprey preparation provides advantages that include: a relatively simpler nervous system compared to that of mammals; a respiratory rhythm output that can be recorded for several hours from the entire CNS isolated *in vitro* with a frequency similar to the intact animal (Rovainen, 1979, 1985; Kawasaki, 1984; Martel et al., 2007); the possibility to record from groups and/or single neurons in the *in vitro* preparation. In addition, it is also possible to maintain both the locomotor and the respiratory networks in an *in vitro* preparation, making this model well

adapted to study the central neural mechanisms involved in the respiratory adjustments during locomotion (Gravel et al., 2007; Gariépy et al., 2012b)

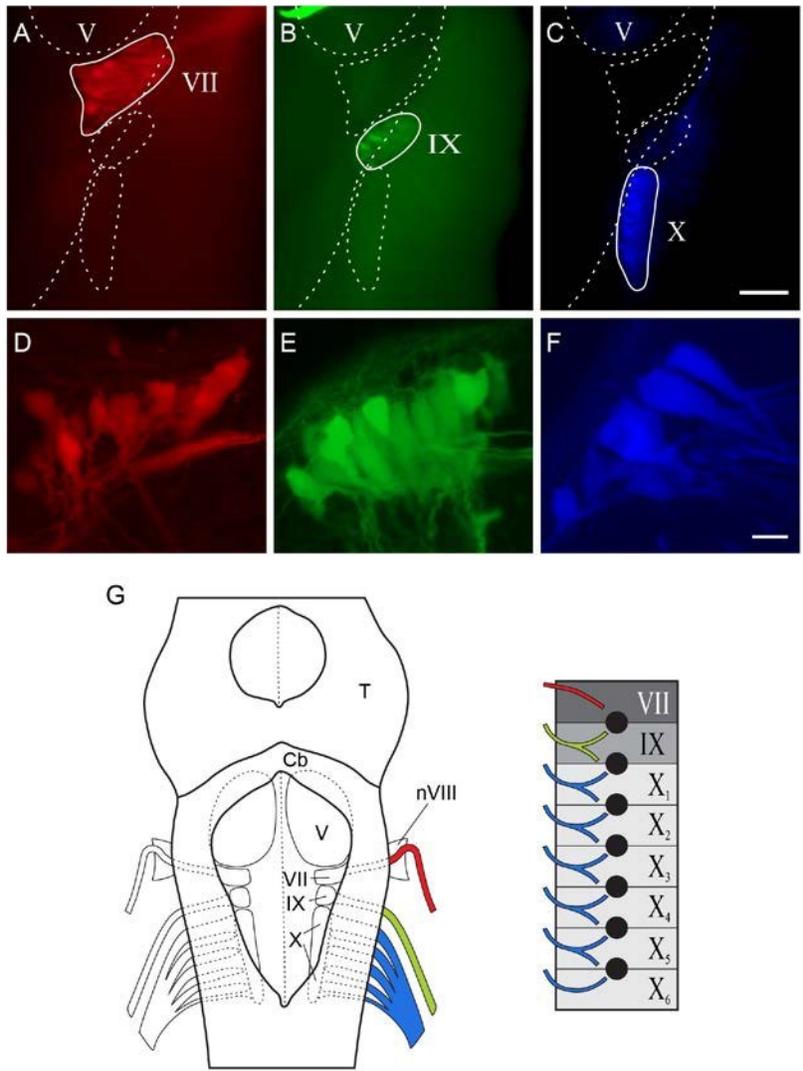
This review focuses on the regions underlying the neural control of respiration in the lamprey and on their interactions. The last part discusses the modulation of the respiratory rhythm during locomotion.

## **2. Respiratory Motoneurons**

In lampreys, the respiratory motoneurons innervating the gill muscles are located in the caudal half of the rhombencephalon (Johnston, 1908; Tretjakoff, 1927; Lindstrom, 1949; Rovainen, 1974; Russell, 1986; Guimond et al., 2003). They have been characterized anatomically and found to innervate the majority of the gills through the IX and X nerves. Early anatomical studies based on standard histological staining reported that some motor fibers from the VII nerve could innervate the muscles around the first gill pore (Johnston, 1908; Tretjakoff, 1927; Lindstrom, 1949). Much later, Rovainen (1974) provided the first physiological characterization of the respiratory motoneurons in lampreys, using an *in vitro* semi-intact brainstem preparation where the peripheral respiratory apparatus was left attached to the brain. Intracellular depolarizations of motoneurons located in the IX and X motor nuclei produced one-to-one contractions of gill muscles confirmed with electromyographic recordings. The motoneurons were antidromically activated by electrical stimulation of the IX or X nerve. Rovainen (1974) failed to evoke gill contractions following intracellular stimulation of VII motoneurons. These results conflicted with the previous anatomical studies mentioned earlier and with the results of a later study from Kawasaki (1984), who found that

cutting the IX and X nerves bilaterally abolished respiratory movements in all the gills except the first one. The movements in the first gill eventually stopped after cutting the VII nerve. On the other hand, when the VII nerve was cut first, the activity of the first gill seemed to remain unchanged until the IX and X nerves were subsequently cut.

The detailed motoneuronal innervation of the respiratory apparatus in lampreys was not settled until more recently (Guimond et al., 2003). Retrograde tracing following injections of fluorescent dyes in the VII, IX and X nerves, revealed that the respiratory motoneuronal column comprised three distinct motor nuclei (VII, IX and X) each corresponding to a labelled nerve (Fig. 2). Anterograde labeling of the respiratory motor nuclei (VII, IX and X) revealed



**Figure 3. Photomicrographs of respiratory motoneurons.** A–C: The three respiratory motoneuron pools were labeled by a tracer injected in their respective nerve in the periphery. They are seen from a dorsal view of the right side of the brainstem in toto. D–F: Photomicrographs from another animal showing the three groups of motoneurons on transverse sections. G: Schematic drawings illustrating the localization of VII, IX and X motor nuclei in the brainstem of a lamprey (left) and the pattern of gill innervation by cranial nerves VII, IX and X (right). Filled circles, gill pores; V, trigeminal motor nucleus; VII, facial; IX, glossopharyngeal; X, vagal; Cb, cerebellum; nVIII, vestibular nerve; T, optic tectum. A–C, scale bar =100  $\mu$ m; D–F, scale bar = 25  $\mu$ m. (Adapted from Guimond et al., 2003)

that the VII nerve innervates the anterior muscles of the 1<sup>st</sup> gill, the IX nerve innervates the posterior muscles of the 1<sup>st</sup> gill and the anterior muscles of the 2<sup>nd</sup> gill, while the X nerve innervates the rest of the gills (Fig. 2) (Guimond et al., 2003). These anatomical results demonstrated for the first time that the anterior muscles of the 1<sup>st</sup> gill are innervated by the VII nerve.

Electromyographic recordings from branchial muscles conducted by Rovainen (1974) revealed a rostro-caudal delay in the activation of the gill (20-50 ms). In addition, Russell (1986) observed a similar delay when recording from the VII and the X motor roots (20-70 ms). It was proposed that a sequential rostro-caudal activation of the motor nuclei (VII, IX and X) was responsible for the delay (Russell, 1986). On the other hand, extracellular recordings from the VII, IX and X motor nuclei themselves revealed that the respiratory motoneurons were activated almost synchronously with a delay of less than 5 ms (Guimond et al., 2003). The authors suggested that the motoneurons of the three motor nuclei (VII, IX, and X) received a synchronous input from the respiratory generator neurons and that the difference in nerve length, with the VII nerve being shorter than the X nerve, was responsible for the observed branchial pore contraction delays.

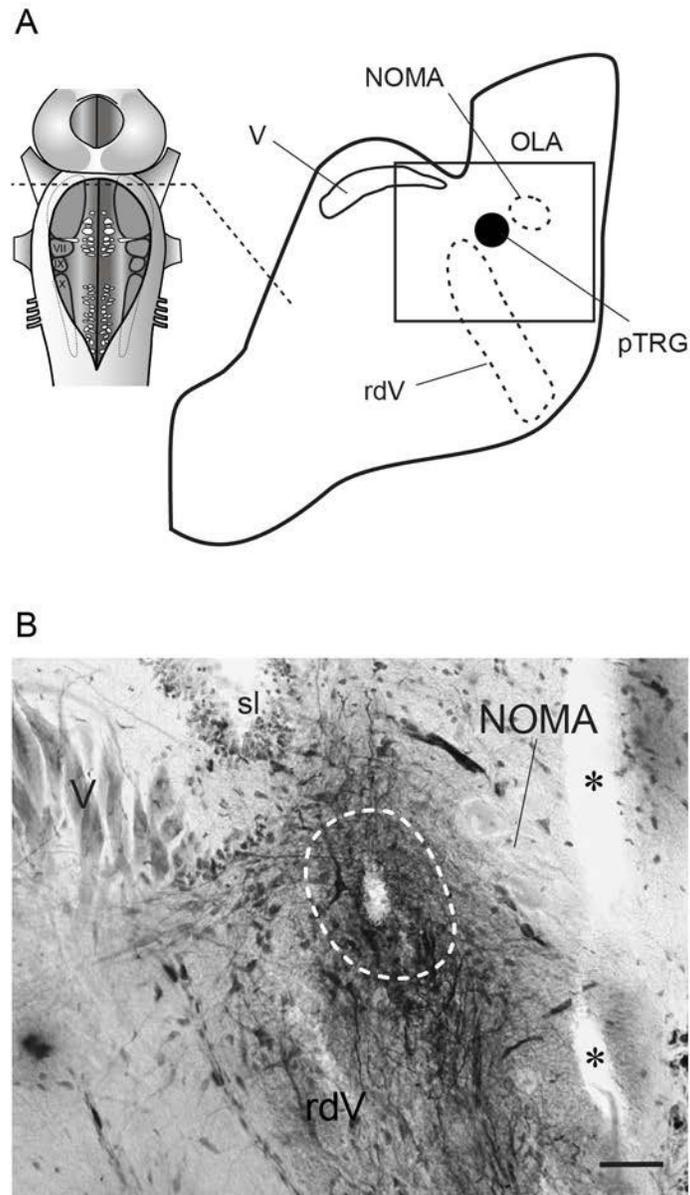
### **3. On the localization of the generator of the fast respiratory rhythm**

A few decades ago, experiments were carried out to identify the brainstem site (or sites) responsible for the generation of the fast respiratory rhythm in lampreys. Rovainen (1974) initially proposed that respiratory motoneurons received a direct input from a generator located rostro-laterally in the rhombencephalon. He later extracellularly recorded respiratory

bursts on the midline at the level of  $V_m$  in the rostral rhombencephalon (Rovainen, 1985). The bursts preceded motoneuronal firing and electrical stimulation at the same site induced a reset of the respiratory rhythm. The bursts persisted along the midline after a complete transverse lesion of the rhombencephalon caudal to  $V_m$ . A midline lesion in the caudal rhombencephalon, separating the respiratory motoneurons on each side, but sparing the rostral region where the respiratory bursts had been recorded from the midline, did not abolish the respiratory bursts or the bilateral synchrony in motoneurons. It was suggested that a crossed pathway, emerging from the generators on both sides of the brain participated in the bilateral synchronization of respiration (Rovainen, 1985). A transverse hemi-section caudal to  $V_m$  abolished the fast rhythm recorded extracellularly in ipsilateral, but not contralateral motoneurons. Sub-threshold rhythmic oscillations persisted in the respiratory motoneurons on the lesioned side when recorded intracellularly (Thompson, 1985). These observations suggested that the respiratory generators on each side innervated respiratory motoneurons through direct and crossing projections, ensuring robust respiratory bursts and bilateral synchrony.

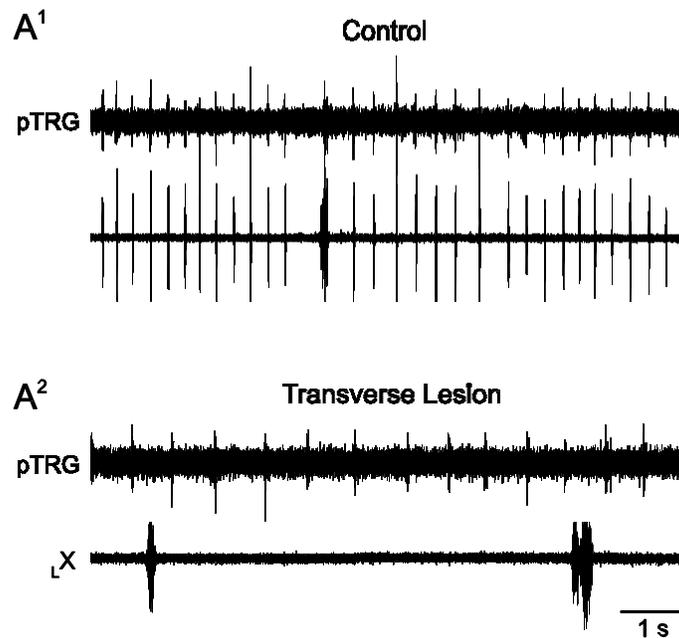
Kawasaki (1981, 1984) provided seemingly conflicting results when he suggested that the rostral rhombencephalon was not essential for respiration in lampreys. His interpretation was based on the fact that following a transection caudal to the  $V_m$ , rhythmic movements of the gill baskets were maintained. The author, however, did not specify the frequency of the visually assessed rhythmic activity, and it may have been in the range of the slow respiratory rhythm, which persists in such conditions and was shown to be generated in the caudal half of the rhombencephalon (see section 4).

To identify the population of neurons responsible for the generation of respiration in lampreys, Russell (1986) performed extracellular and intracellular recordings in the lateral tegmentum at the level of the motor root of the V nerve. Neural discharges were found in phase and preceding firing in respiratory motoneurons. Electrical stimulation in the recorded area elicited a reset in the respiratory discharges (Russell, 1986). In a more recent study, Martel et al (2007) used pharmacological activation and inactivation to pinpoint the location of the neurons generating the fast respiratory rhythm (Fig. 3). Localized pressure injections of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) were made in the pTRG. The injections resulted in the acceleration of the fast respiratory rhythm, whereas injections of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX), or (2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5) in the same region on one side only abolished the fast rhythm, but not the slow rhythm. It was proposed that mutual excitation from rhythm generating areas on both sides was necessary for respiratory activity to reach suprathreshold levels in motoneurons. After making a complete transverse section caudal to  $V_m$ , the fast rhythm was still present in the pTRG, but absent in respiratory motoneurons, located more caudally. Only a slow rhythm persisted in respiratory motoneurons as shown by extracellular recordings (Fig. 4). This indicated that two respiratory rhythms in lampreys were generated in two different areas of the brainstem: the fast rhythm is generated in the rostral half of the rhombencephalon, whereas the slow rhythm is generated in the caudal half.



**Figure 4. Localization of the region controlling the fast rhythm in the pTRG.** A: Left: Schematic dorsal view of the lamprey brainstem illustrating the level of the cross section to the right. Right: Anatomical localization of the pTRG (filled circle) on a sketch of a transverse hemisection. The empty square indicates the location of the photomicrograph in (B). B: Photomicrograph showing the site of the extracellular recording pipette into the pTRG. NOMA, anterior octavomotor nucleus; rdV, trigeminal sensory root; V, trigeminal motor nucleus; OLA, octavolateral area; sl, sulcus limitans of His. \* Sectioning artifacts. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . (Adapted from Martel et al., 2007)

Other physiological experiments confirmed that the fast rhythm generator was located in the pTRG. Localized pressure injections of a  $\mu$ -opioid receptor agonist [D-Ala<sup>2</sup>, NMe-Phe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]-enkephalin (DAMGO) in this region produced dramatic respiratory depression leading to apnea, whereas more medial injections (about 0.5 mm) had no effects (Mutolo et al., 2007). It was also found that bath or local applications of Substance P (SP) revived the respiratory rhythm previously abolished by the bath applications of riluzole and flufenamic acid (Mutolo et al., 2010). The latter two drugs respectively block sodium persistent currents ( $I_{NaP}$ ) and calcium-activated non-specific cation current ( $I_{CAN}$ ), which have been described to be involved in the respiratory rhythm generation in mammals (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001; Del Negro et al., 2002). Similarly, local application of SP can restore the respiratory rhythm previously abolished after the local application of CNQX and AP-5 in the pTRG (Cinelli et al., 2013). Microinjections of nicotine in the rostro-lateral region of  $V_m$  increased respiratory frequency, in support of a role of acetylcholine in respiratory modulation in lampreys. The injection of nicotine 0.5 mm more medial had no effect (Mutolo et al., 2011). In addition, it was shown that blocking  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors in the pTRG suppressed the fast rhythm, suggesting that pTRG neurons expressing nicotinic receptors may have a rhythmogenic role (Mutolo et al., 2011; Cinelli et al., 2013). These findings suggest that there is a phylogenetic conservation of the respiratory rhythm generating properties from lampreys to mammals.



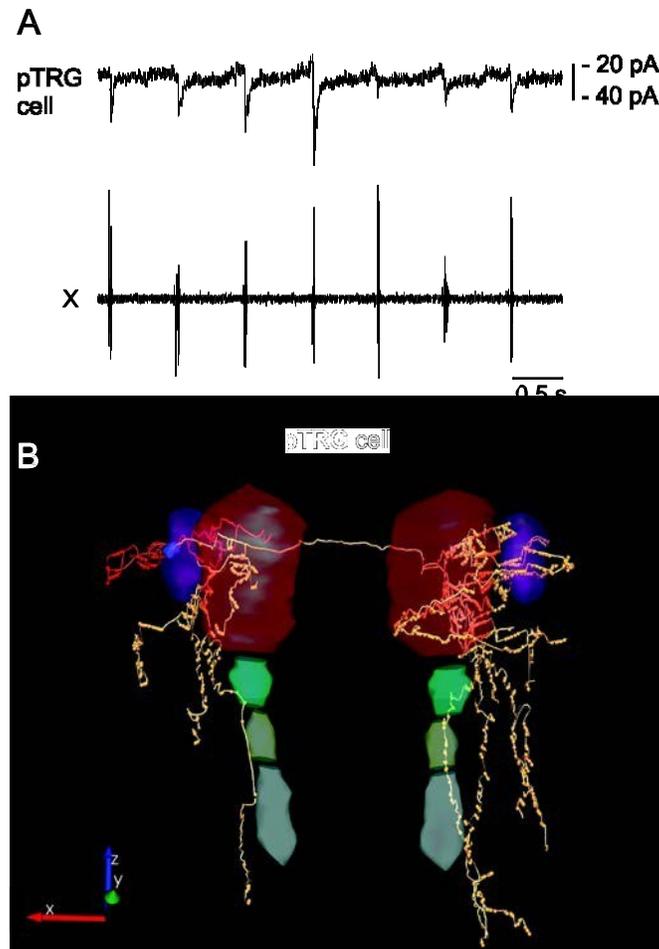
**Figure 5. Physiological characterization of the pTRG location.** Ipsilateral neurographic recordings from the pTRG in the rostral rhombencephalon and the vagal motor nucleus in the caudal rhombencephalon before (A<sup>1</sup>) and after (A<sup>2</sup>) a complete transverse section of the brainstem just caudal to the trigeminal motor nucleus. (Adapted from Martel et al., 2007)

The connections between the respiratory rhythm generating areas and respiratory motoneurons were recently investigated anatomically. Injections of fluorescent dyes were made in a region including not only the cell bodies but also the extensive ventrolateral dendrites of the respiratory motoneurons (Gariépy et al., 2012a, 2012b). From these injections, three populations of neurons were retrogradely labeled in the rostral rhombencephalon. One consisted of small cells located laterally to V<sub>m</sub>, close to the sulcus limitans of His and the isthmic Müller cell I2 (Fig. 3). A second consisted of large cells located somewhat more ventrally in the trigeminal sensory root. Interestingly, the location of these two cell populations corresponds to the two groups of neurons that Russell (1986) previously recorded and identified as rostral synchronous cells and ventral early units, respectively. A third

population was found in a more rostro-medial position, dorsal to the anterior rhombencephalic reticular nucleus (ARRN), close to the Isthmic Müller cell I1 (Gariépy et al., 2012b; Cinelli et al., 2013). This neural population is located in a region previously described as the dorsal part of the mesencephalic locomotor region (MLR) in lampreys (Le Ray et al., 2003; Ryczko et al., 2013; for review, see Ryczko and Dubuc, 2013). It was reported that stimulation of the dorsal part of the MLR elicits synaptic responses in intracellularly recorded pTRG cells (Gariépy et al., 2012b).

Gariépy et al. (2012a) injected an anatomical tracer in the respiratory motoneuron nuclei combined with a tracer injection close to I2 in the pTRG, where extracellular recordings of the fast rhythm had been carried out previously by Martel et al., (2007). They found that the pTRG on one side sends projections to motoneurons on both sides as well as to the contralateral pTRG (Gariépy et al., 2012a). The commissural projections between the pTRGs consisted of a thick bundle of axons located at the rostro-caudal level of the  $V_m$ , where Rovainen (1985) recorded extracellular respiratory bursts at the midline. The function of the projections between the pTRG and the respiratory motoneurons was also examined. Double intracellular recordings of respiratory motoneurons (one on each side) were carried out while the pTRG on one side was microstimulated. The electrical stimulation (up to 40 Hz) elicited a one-for-one synaptic response in the two simultaneously recorded motoneurons. The responses on the ipsilateral side displayed a shorter latency (Gariépy et al., 2012a). To identify the projections of the fast respiratory rhythm generators, Xylocaine was microinjected on the midline where the commissural fibers are known to travel. The injections abolished the synaptic responses of a motoneuron to stimulation of the pTRG on the opposite side (Gariépy

et al., 2012a). Additional experiments suggested that the fast rhythm generators activate respiratory motoneurons via both mono- and di-synaptic projections (Gariépy et al., 2012a). To confirm these observations, single pTRG cells were patch recorded and injected with biocytin conjugated to Alexa-fluor 488. It was found that one pTRG cell (Fig. 5) could project to respiratory motoneurons on both sides as well as to the contralateral pTRG (Gariépy et al., 2012a). Most importantly, these cells displayed rhythmic activity synchronized with the respiratory motoneurons. Altogether, these results show that the populations of neurons found at the rostro-lateral pole of the  $V_m$  (pTRG) and at the rostro-caudal level of I2, possess the necessary connections to confer them a role of generator neurons involved in the bilateral control of the fast respiratory rhythm in lampreys.

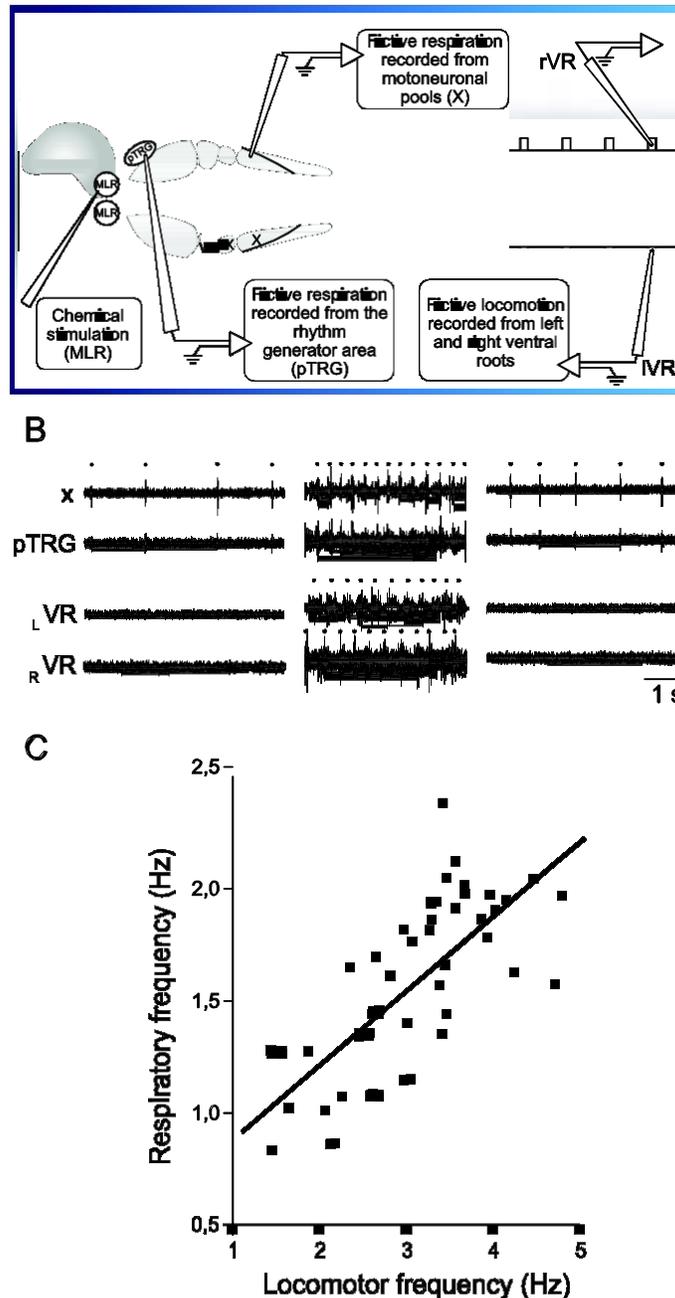


**Figure 6. Electrophysiological and anatomical characterization of a pTRG neuron.** A: Voltage-clamp whole-cell recording of a neuron in the fast rhythm respiratory generator, the pTRG. Excitatory currents occurred in-phase with respiratory activity recorded from the vagal motor nucleus (X). B: 3D reconstruction of the axonal projections of the recorded pTRG neuron seen from a dorsal view of the rhombencephalon. Varicosities and dendritic spines are represented as circles. Dendrites, red arborizations; soma, blue; axons, yellow arborizations; V, red; VII, light blue; IX, light yellow; X, light gray; pTRG, purple. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$  in B (the three axes). (Adapted from Gariépy et al., 2012a,b).

It should be noted however, that the population of neurons in the dorsal part of the MLR (third population described above) was recently proposed to correspond to the respiratory generator of lampreys (Cinelli et al., 2013). This conclusion was drawn from pharmacological and anatomical experiments. In this study, Cinelli et al. (2013) did not find

any pTRG cells rostral-lateral to the  $V_m$  and thus concluded that they could not be generator neurons. The tracer injections were restricted to the cell body region of the respiratory motoneurons (Cinelli et al., 2013), missing their extensive ventro-lateral dendrites, whereas the injections made by Gariépy et al. (2012a, 2012b) included both the cell bodies and ventro-lateral dendrites. Gariépy et al. (Fig. 6 in 2012a; Fig. 4 in 2012b) has shown examples of respiratory modulated pTRG cells (rostral-lateral to the  $V_m$ ) filled intracellularly with a dye, that send ipsilateral and contralateral axons deep in the lateral tegmentum, among the ventro-lateral dendrites of the respiratory motoneurons.

Altogether, the experiments carried out to localize the respiratory generator in lampreys suggest that three populations of neurons could be involved. Two of the three populations are closer to the isthmus Müller cells I2 cell, whereas a third is closer to isthmus Müller cells I1. The three populations are physically very close to one another in the small lamprey brainstem and more studies are thus needed to determine which of these three populations do indeed contribute to the generation of respiration in lampreys.



**Figure 7. Electrophysiological characterization of the locomotion/respiration interaction in the lamprey.** A: Schematic drawing of a lamprey brainstem and rostral spinal cord illustrating the placement of the chemical stimulation and the recording electrodes. B: Respiratory changes following the chemical activation of the MLR before (Left), during (Center) and after (Right) fictive locomotion induced by MLR activation. Dots indicate respiratory and locomotor bursts. C: Graph illustrating the respiratory frequency vs. the locomotor frequency following the chemical activation of the MLR. (Adapted from Gariépy et al., 2012b)

#### 4. On the slow respiratory rhythm

As of now, most of the studies aimed at understanding the neural mechanisms of respiration in lampreys focussed on the fast rhythm with little attention on the slow rhythm. Rovainen (1974) was the first to record long bursts of discharge from the X and the IX nerves *in vitro*. The long bursts occurred spontaneously between the short bursts of the fast rhythm. The long bursts could also be elicited by mechanical stimulation of the gill openings or electrical stimulation of the X nerve (Rovainen, 1974, 1977). Rovainen suggested that the slow respiratory rhythm originated from the caudal rhombencephalon (Rovainen, 1985). He proposed (Rovainen 1977, 1979, 1985) that the long bursts were used to dislodge particles obstructing the gills, similar to the function of cough in mammals, which helps to clear the respiratory airways. However, coughing is a reflex initiated by sensory inputs (Pantaleo et al., 2002), whereas the slow rhythm in lampreys is rhythmical and centrally generated in the completely isolated brainstem. Because of this, the slow rhythm is unlikely to be mechanistically equivalent to a cough reflex. Later on, Thompson (1985) confirmed the presence of a slow rhythm and proposed two types of long bursts: “weak” long bursts (200 - 400 ms) and “arousal” long bursts (500 -1000 ms).

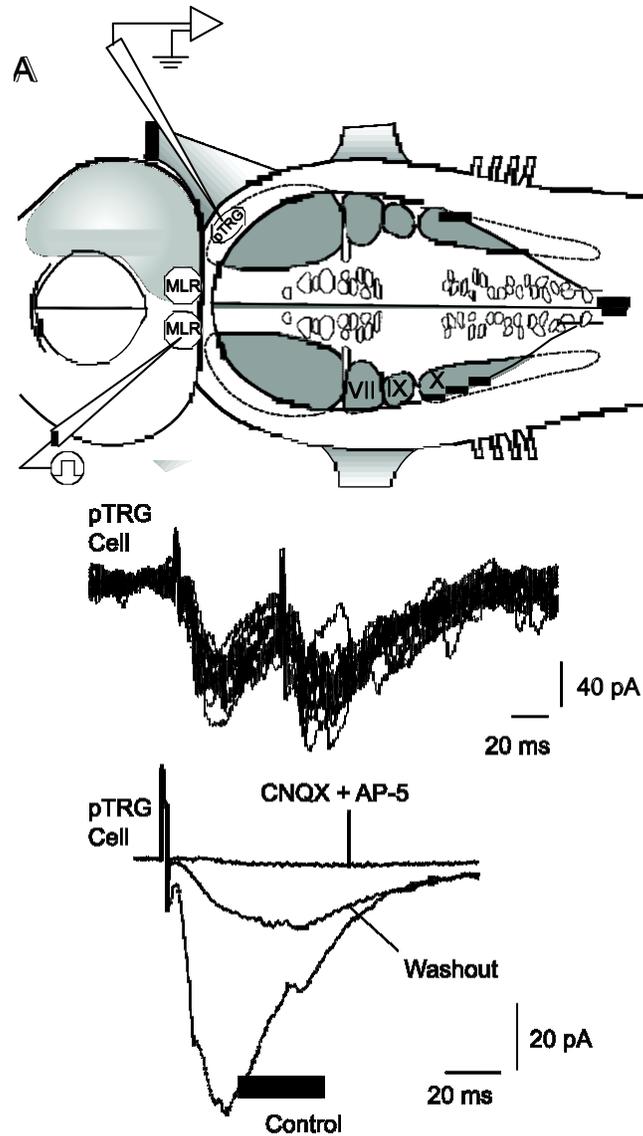
The slow respiratory rhythm was investigated more thoroughly by Martel et al (2007). Experiments were carried out on the *in vitro* isolated brainstem of the lamprey. Following a transection below  $V_m$ , the slow rhythm persisted in the respiratory motoneurons with a mean period of  $102 \pm 114$  s and a mean burst duration of  $506 \pm 174$  ms. The fast rhythm ceased in motoneurons, but was still present in the pTRG. The authors concluded that the slow rhythm

was generated in the caudal half of the rhombencephalon, whereas the fast respiratory rhythm was generated in the rostral half of the rhombencephalon. The interactions between the fast and slow respiratory rhythms were also investigated in that study. The authors showed that the fast rhythm recorded in motoneurons temporarily ceased during and after long bursts of discharge. The temporary arrest of the fast rhythm during the slow rhythmic bursts was referred to as a respiratory pause (Martel et al., 2007). Following such a brief respiratory pause, the fast rhythm resumed with an increased frequency that gradually slowed down again until another long burst of discharge occurred. It was suggested that the slow respiratory rhythm generator sends ascending projections to the fast rhythm generator. Cinelli et al. (2014, 2016) have recently shown that a population of neurons located within the VII, IX, and X motor nuclei regions send glutamatergic ascending projections to the pTRG. It was also shown that these excitatory neurons are subject to an inhibitory control by GABAergic and glycinergic inputs (Cinelli et al., 2014, 2016). The disinhibition of the excitatory neurons by injection of bicuculline or strychnine results in an increase in the fast respiratory rhythm. Interestingly, Kawasaki (1984) had suggested that neurons in and around the VII, IX and X motor nuclei played a key role in the generation of the slow respiratory rhythm in adult lampreys. Further studies are needed to identify the neurons and mechanisms underlying the slow respiratory rhythm as well as the interactions between the fast and slow rhythm generators.

## **5. Comparative aspects in vertebrates**

### **5.1 Anatomy**

From studies carried out in different vertebrate models, there appears to be an emerging consensus for the presence of multiple oscillators involved in generating the respiratory rhythm (Wilson et al., 2006; Martel et al., 2007; Kinkead, 2009; Feldman et al., 2013). In lampreys, pTRG neurons generate a fast respiratory rhythm that is the functional equivalent of respiration in humans (Martel et al., 2007). Therefore, the pTRG has been compared to the preBötzinger (preBötC) complex in mammals (Martel et al., 2007; Mutolo et al., 2007, 2010, 2011; Gariépy et al., 2012a, 2012b; Cinelli et al., 2013; 2014) and to the lung oscillator in frogs (Wilson et al., 2002; Cinelli et al., 2014). The lamprey pTRG is located rostrally, in a region that would be the equivalent of the pons of mammals, whereas the preBötC complex is located in the medulla oblongata, in a region ventral to the compact division of the nucleus ambiguus, midway between the facial nucleus and the obex (Smith et al., 1991). The lung oscillator in frogs is also located between the VII and IX nerve (Wilson et al., 2002; Baghdadwala et al., 2015). Based on its anatomical location alone, the pTRG would rather be comparable to the medial parabrachial and the Kölliker-Fuse nuclei of mammals, a region that has been shown to control the transition between inspiration and expiration (Cohen, 1971; von Euler et al., 1976; von Euler, 1977; St-John and Zhou, 1991; Alheid et al., 2004; Rybak et al., 2008; Arata et al., 2010; reviewed in Dutschmann and Dick, 2012). It could also be comparable to the nucleus isthmi of anuran amphibians, which is suggested to inhibit hypoxic and hypercapnic drive during breathing (Kinkead et al., 1997; reviewed in Gargaglioni and Branco. 2004).



**Figure 8. Electrophysiological characterization of the connection between the MLR and the pTRG.** A: Top, schematic drawing of a lamprey brainstem illustrating the placement of the electrical stimulation and the “patch” electrode in the pTRG. Center, EPSCs in a pTRG neuron following high-frequency electrical stimulation in the MLR. Bottom, effect of a bath application of CNQX and AP-5 on the MLR-induced EPSCs. (Adapted from Gariépy et al., 2012b)

The slow rhythm generator of lampreys could be compared to the lung oscillator of amphibians with regards to its motor output. The anatomical location of this generator in the

caudal part of the rhombencephalon is similar to the mammalian ventral respiratory column in the medulla. The latter region contains the neural structures responsible for the generation of both inspiratory and expiratory rhythms (Feldman and Del Negro, 2006). Interestingly, it was very recently shown that the slow respiratory rhythm generator of lampreys is modulated by  $\text{CO}_2/\text{pH}$  (Hoffman et al., 2015). According to the authors, the presence of central  $\text{CO}_2/\text{pH}$ -sensitive chemoreceptors associated with the slow respiratory rhythm generator of lampreys may have provided an important substrate for the evolution of vertebrate air breathing (Hoffman et al., 2015). Both lung and buccal oscillators in amphibians are located in the medulla (Wilson et al., 2002), but a homology with the slow rhythm generator in lampreys is not established. To address such homologies in different species of vertebrates, further knowledge on the developmental origins of the respiratory generators is required.

## **5.2 Function**

As in other species, the mechanisms underlying the respiratory rhythm generation in lampreys are not fully understood. Pharmacological and electrophysiological experiments have been traditionally used to clarify the role of intrinsic and synaptic properties of respiratory neurons underlying the generation of the rhythm.

### **5.2.1 Pacemaker properties and glutamate transmission**

Most of the studies on respiratory network rhythmicity were done in mammals. It was initially believed that intrinsic properties of preBötC cells played a crucial role in generating respiration (Johnson et al., 1994; Koshiya and Smith, 1999; Thoby-Brisson and Ramirez, 2001; Peña et al., 2004; Peña and Ramirez, 2004). Indeed, it was demonstrated that both  $I_{\text{NaP}}$

and  $I_{CAN}$  currents play a role in the pacemaker properties of preBötC neurons (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Koizumi and Smith, 2008). In lampreys, the membrane properties of pTRG neurons have not been characterized yet, and the presence of pacemaker neurons has not been established. However because riluzole and flufenamic acid abolished respiration in lampreys,  $I_{NaP}$  and  $I_{CAN}$  currents may contribute to respiratory rhythmogenesis (Mutolo et al., 2010). Nevertheless, the application of exogenous excitatory agents (Substance P) restored the respiratory rhythm and similar observations were made for the PreBötC (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001; Del Negro et al., 2002, 2005; Peña et al., 2004), the pFRG (Lin and Onimaru, 2014) of mammals, and the respiratory generator in turtles (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2014). These results indicate that pacemaker properties are not essential for the respiratory rhythm generation.

A "group pacemaker" hypothesis (Del Negro and Hayes, 2008) was proposed by which inspiratory bursts resulted from activity in groups of intrinsically-bursting neurons interacting together through glutamatergic transmission (reviewed in Feldman et al., 2013). In agreement with this hypothesis, fast glutamatergic transmission was shown to play a crucial role in respiratory rhythmogenesis (Greer et al., 1991). In addition, ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors were found to activate  $Ca^{2+}$  currents that in turn activate an  $I_{CAN}$  (Pace et al., 2007; Pace and Del Negro, 2008). In lampreys, microinjections of CNQX or AP-5 in the pTRG induce a temporary arrest of the fast respiratory rhythm (Martel et al., 2007; Cinelli et al., 2013), whereas local applications of AMPA accelerated the rhythm (Martel et al., 2007; Cinelli et al., 2013). In addition, perfusion of mGluRs I and II agonists increased respiratory frequency and burst amplitude, whereas antagonists decreased the frequency

(Bongianni et al., 2002). Altogether, these results highlight the important role of glutamatergic synaptic connections in the respiratory rhythm generation of lamprey.

### **5.2.2 Role of inhibition**

Inhibition has been shown to play a crucial role in rhythmic movements. For example, it underlies the left-right alternation during locomotion. The involvement of reciprocal inhibition in the respiratory rhythm was also investigated (Galante et al., 1996; Broch et al., 2002; Johnson et al., 2002, 2007; Bongianni et al., 2006; Janczewski et al., 2013). In lampreys, removing Cl<sup>-</sup> from the perfusing medium did not affect the respiratory rhythm (Rovainen, 1983). In addition, GABA and glycine receptors were shown to powerfully modulate respiration (Bongianni et al., 2006). It was also demonstrated that blocking GABAergic transmission in the pTRG reactivates the fast rhythm after apnea has been induced by perfusion of CNQX and AP-5 (Cinelli et al., 2014). Altogether, these results show that inhibitory inputs exert a modulatory control on the pTRG, but are not essential for the generation of the fast respiratory rhythm. This was also shown for the lung rhythm in amphibians but not for buccal ventilation (Galante et al., 1996; Broch et al., 2002). Indeed, the superfusion of a Cl<sup>-</sup> free medium in the bullfrog tadpole abolished buccal ventilation (Galante et al., 1996; Broch et al., 2002). In rodents, blocking fast synaptic inhibition in the PreBötC and the BötC had little effect on the respiratory rhythm, but reshaped the respiratory pattern (Janczewski et al., 2013). These results were confirmed by the same group using optogenetics (Sherman et al., 2015). Altogether, the results suggest that postsynaptic inhibition is not essential for the generation of the fast respiratory rhythm in lampreys, or for the rhythm generation of preBötC neurons in mammals. The same goes for lung ventilation in frogs, but

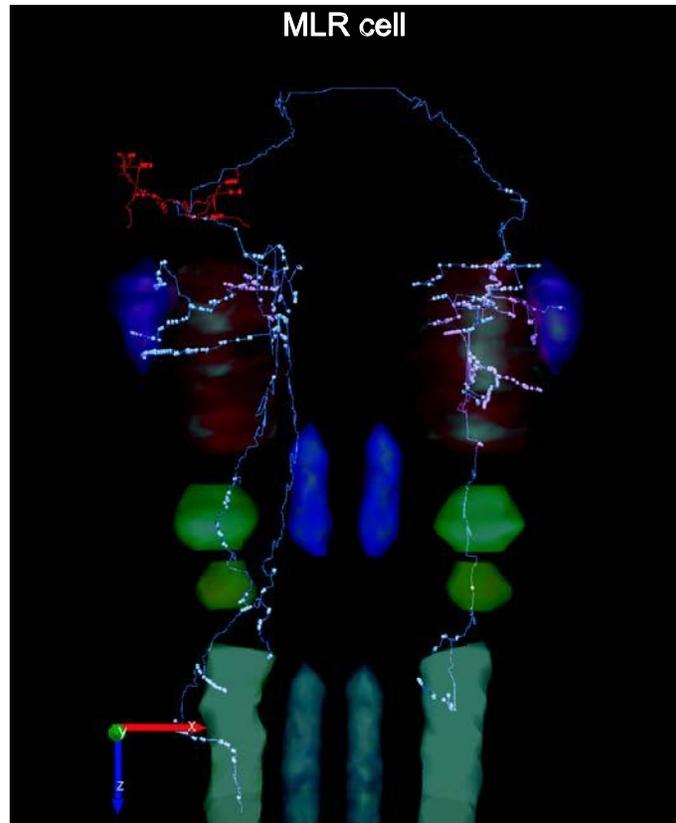
not the buccal rhythm. No studies have explored the role of postsynaptic inhibition in the slow rhythm generation of lampreys.

### **5.2.3 Other neuromodulators**

The respiratory networks display functional flexibility in response to neuromodulators. Pharmacological experiments carried out on different species have provided significant insights on neuromodulatory mechanisms.

- Opiates

Opiates are known to depress breathing. In mammals, the activation of  $\mu$ -opioid receptors on PreBötC neurons reduce their excitability (Gray et al., 1999), inducing bouts of apnea. Similarly, injections of  $\mu$ -opioid receptor agonists in the pTRG of lampreys and in the lung oscillator of frogs elicit apnea (Vasilakos et al., 2005; Mutolo et al., 2007). However,  $\mu$ -opiates do not act on all respiratory regions. No effects were seen when injected in the RTN/pFRG of mammals or in the buccal oscillator of frogs (Janczewski et al., 2002; Vasilakos et al., 2005). In that sense, it would be of interest to determine if  $\mu$ -opioid receptor agonists act on the slow rhythm generator of lampreys.



**Figure 9. Anatomical characterization of individual MLR neurons projecting to the respiratory nuclei.** A: Three-dimensional reconstruction of the rhombencephalon showing the axonal projections of a MLR neuron filled intracellularly with a dye during patch recording. This neuron had previously been labeled with another dye transported retrogradely from an injection in the respiratory motoneurons, and it was located just dorsal to the anterior rhombencephalic reticular nucleus and I1, close to the sulcus limitans of His. Varicosities and dendritic spines are represented as circles. The y-, z-, and x-axis scales represent 500  $\mu\text{m}$ . Color correspondence: dendrites and cell body, light red; axons, light grey; V, dark red; VII, light green, IX, dark yellow; X, dark grey; MRRN, dark blue; PRRN, light blue; pTRG, purple. (Adapted from Gariépy et al., 2012b)

- Substance P

Von Euler and Pernow (1956) first showed in cats and rabbits how SP powerfully increases respiratory activity, and similar results were later obtained in dogs (Hahxiu et al., 1990). In rodents, micro-injections of SP in the PreBötC markedly increase the respiratory

rhythm (Gray et al., 1999), an effect mediated by Neurokinin 1 (NK1) receptors expressed in PreBötC neurons (Gray et al., 1999). In addition, SP is also known to induce a significant depolarization in the membrane potential of the pre-inspiratory neurons located in the RTN/pFRG (Honimaru et al., 2012). Similar results were obtained in lampreys where bath application or micro-injections of SP in the pTRG induced a significant increase in both the respiratory frequency and the amplitude of the fast bursts (Mutolo et al., 2010). In addition, similar to the preBötC (Del Negro et al., 2005), SP restarted the fast respiratory rhythm during apnea induced by bilateral injection of riluzole and flufenamic acid (Mutolo et al., 2010). In frogs, bath application of SP increased the respiratory frequency of the lung, but not the buccal oscillator (Chen and Hedrick, 2008).

Altogether, the pharmacological experiments targeting the respiratory generators in various vertebrate species strongly suggest that some of the neural mechanisms underlying respiratory rhythmogenesis are conserved. However, a lack of understanding of the cellular mechanisms underlying the slow respiratory rhythm in lampreys limits our knowledge regarding the evolution of the respiratory networks in vertebrates. This question can now be addressed with the help of genetic tools. Indeed, it was shown that the rhythmogenic neurons of preBötC are derived from *Dbx1*-expressing progenitor (Bouvier et al., 2010; Gray et al., 2010) whereas *Phox2b* is a marker for the RTN/pFRG cells (Onimaru et al., 2008).

Characterizing the expression of specific markers in the interneuronal populations comprising the respiratory networks in lamprey would be an important step for establishing homologies with other species. *In situ* hybridization can now be carried out in lampreys (Albersheim-Carter et al., 2015), which should help determine whether neurons in the respiratory networks

of lampreys express Dbx1 or Phox2b. This information could contribute to increase our knowledge on the developmental origins of these generators.

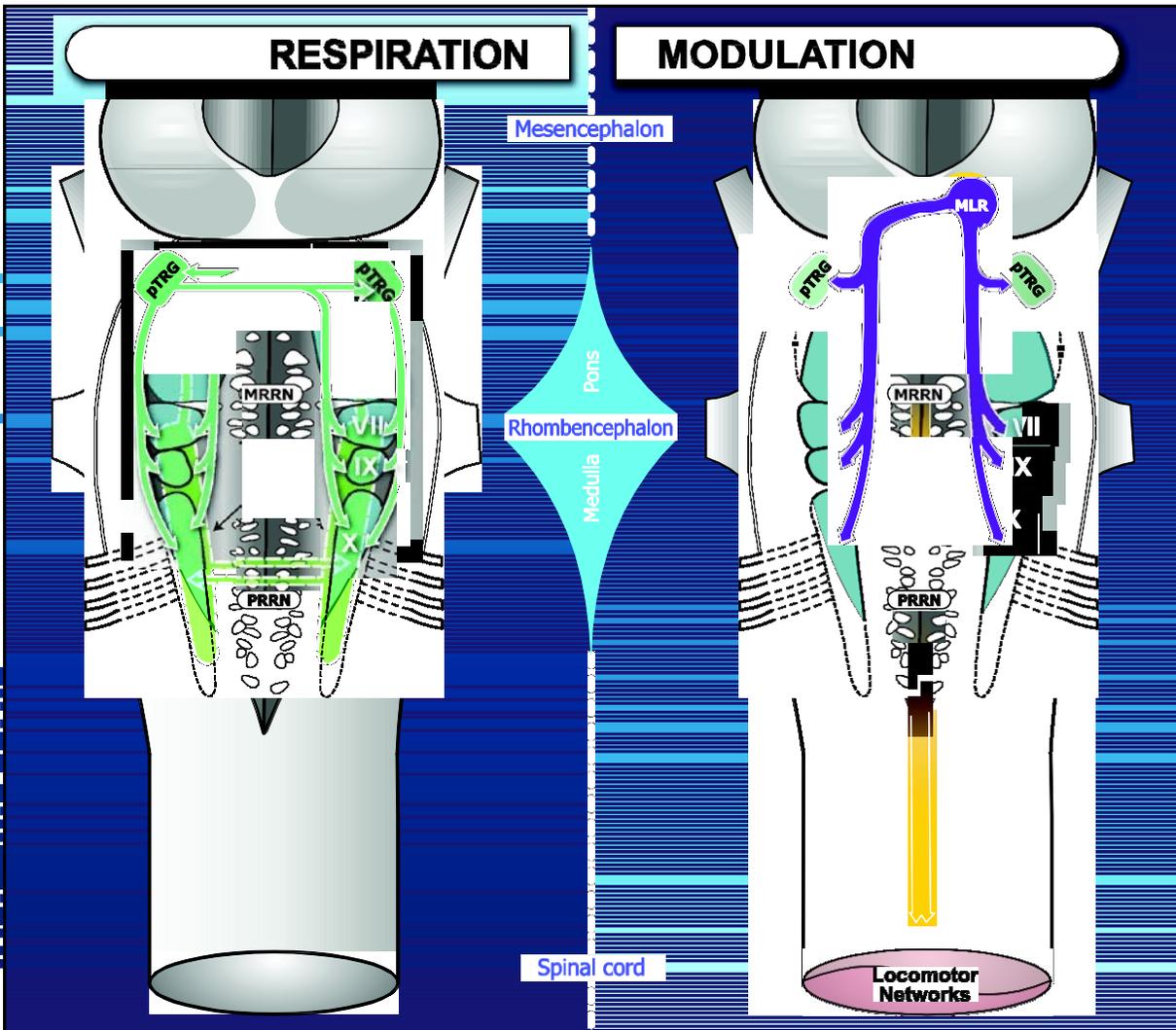
## **7. Interactions between locomotion and respiration in the lamprey**

Mechanical stimulation of the skin increases respiratory drive in intact lampreys and this effect has been referred to as arousal breathing (Thompson, 1990). Similar effects were seen when stimulating the spinal dorsal columns that project to relay cells in the brainstem (Dubuc et al., 1993a,b). Intracellular stimulation of primary sensory neurons, the dorsal cells, also increases the respiratory frequency (Thompson, 1990). A transection caudal to the  $V_m$  prevented the increases in respiratory frequency, suggesting that the rostral brainstem plays a crucial role in the modulation of respiratory activity by sensory afferents (Thompson, 1990). More recently, it was shown that mechanical stimulation of the skin of the tail or the head of lampreys in a semi-intact preparation, increased the respiratory frequency and the amplitude of the respiratory bursts (Gravel et al., 2007). The increase in respiratory drive was associated with swimming movements and was maintained after removing the spinal cord and all brain tissue rostral to the mesencephalon (Gravel et al., 2007). The authors suggested the presence of a modulatory mechanism in the rhombencephalon and that sensory inputs acting on the respiratory CPG were responsible for the increase in respiratory drive.

Moving around in the environment or exercising induces an increase in respiratory activity. The mechanisms underlying the increase in respiratory frequency during movement have been examined in humans as well as in animal models. Both central (Krogh and Lindard, 1913; Waldrop et al., 1982; Gariépy et al., 2012; Le Gal et al., 2014) and peripheral (Funk et

al., 1992; Morin and Viala, 2002; Potts et al., 2005; Giraudin et al., 2012) mechanisms were proposed to play a role (For reviews, see Mateika and Duffin, 1995; Gariépy et al., 2010). However, the contribution of central vs. peripheral mechanism is not established and is the subject of an ongoing debate (Haouzi, 2006; Waldrop and Iwamoto, 2006). The interactions between respiration and locomotion were recently examined in lampreys and the neural mechanisms identified. Significant increases in respiratory activity occurred during, and even just before spontaneous swimming episodes, both *in vitro* and *in vivo* (Gravel et al., 2007; Gariépy et al., 2012b). It was suggested that a feedforward mechanism played a role in increasing respiratory activity during locomotion through central connections between locomotor and respiratory centers. Such connections have also been proposed in other species. For instance, it was shown that fictive locomotion induced by forebrain stimulation was associated with increased respiratory activity in cats (Eldridge et al., 1981, 1985; Waldrop et al., 1986). It was then proposed that locomotor control areas could project to respiratory centers. It is only recently that such connections were identified (Gariépy et al., 2012b). It is well established that stimulation of the MLR initiates and controls locomotion in a graded fashion across vertebrates (Sirota et al., 2000; Cabelguen et al., 2003; Skinner and Garcia-Rill, 1984; Bernau et al., 1991; Musienko et al., 2008; Marlinsky and Voitenko, 1991; Eidelberg et al., 1981; Shik et al., 1966; for an review, see Ryczko and Dubuc, 2013). In lampreys, stimulation of the MLR also elicited marked increases in respiration activity. There was a strong correlation between the intensity of stimulation and the increase in respiratory activity (Fig. 6; Gariépy et al., 2012b). The authors further showed a direct connection between the MLR and the central pattern generator for respiration in lampreys. This connection was shown to be the most likely source of respiratory modulation during locomotion. To further

characterize the connection, whole-cell patch recordings and pharmacological experiments were performed. MLR stimulation induced short-latency EPSCs and glutamatergic antagonists (CNQX and AP-5) dramatically reduced the amplitude of the EPSCs (Fig. 7) in patched pTRG neurons. Single cell labeling of patched MLR neurons revealed bilateral axonal projections to both the pTRGs and to the respiratory motoneurons (Fig. 8; Gariépy et al., 2012b). Altogether, these results suggested that MLR neurons send monosynaptic glutamatergic inputs to the pTRG and the respiratory motoneurons on both sides, and that a part of the respiratory increases that occur during locomotion relies on direct neural inputs from MLR neurons to the respiratory CPG (Fig. 9).



**Figure 10. Schematics of the neural networks underlying respiration (left) and its modulation (right) in the lamprey.** pTRG, paratrigeminal respiratory group; CRG, caudal respiratory generator; MLR, mesencephalic locomotor region; V, trigeminal; VII, facial; IX, glossopharyngeal; X, vagal; MRRN, medial reticular rhombencephalic nucleus; PRRN, posterior reticular rhombencephalic nucleus.

## Conclusions

Research on the control of respiration in lampreys has shown that there are two independent respiratory generators located in the rhombencephalon (Fig. 9). The fast respiratory rhythm generator (pTRG) is located at the rostro-lateral pole of the  $V_m$  in the pons,

whereas the slow respiratory rhythm generator is located caudally in the medulla. Due to its functional equivalence as well as a few shared physiological and anatomical properties, the pTRG of lampreys has been compared to the PreBötC, despite their markedly different locations in the brainstem. Concerning the slow respiratory generator, further anatomical and physiological characterizations are needed to make comparisons with generators of other vertebrate species. How the respiratory generators have evolved in vertebrates is an important question to be answered in order to further our understanding of the neural control of respiration. Genetic tools that are now beginning to be used in lampreys will likely play a crucial role to answer that question. Knowledge gained in basal vertebrates such as the lamprey will undoubtedly be useful to understand the neural control of respiration in mammals including man.

## References

Albersheim-Carter J, Blubaum A, Ballagh IH, Missaghi K, Siuda ER, McMurray G, Bass AH, Dubuc R, Kelley DB, Schmidt MF, Wilson RJ, Gray PA. Testing the evolutionary conservation of vocal motoneurons in vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* pii: S1569-9048(15)30013-6. 2015

Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR. Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol.* 143(2-3):105-14. 2004

Arata A, Tanaka I, Fujii M, Ezure K. Active inspiratory-expiratory phase switching mechanism exists in the neonatal nucleus parabrachialis. *Adv Exp Med Biol.* 669:135-8. 2010

Baghdadwala MI, Duchcherer M, Paramonov J, Wilson RJ. Three brainstem areas involved in respiratory rhythm generation in bullfrogs. *J Physiol.* 593(13):2941-54. 2015

Bernau NA, Puzdrowski RL, Leonard RB. Identification of the midbrain locomotor region and its relation to descending locomotor pathways in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Brain Res.* 557:83-94. 1991

Bongianni F, Mutolo D, Nardone F, Pantaleo T. GABAergic and glycinergic inhibitory mechanisms in the lamprey respiratory control. *Brain Res.* 23;1090(1):134-45. 2006

Bongianni F, Mutolo D, Carfi M, Pantaleo T. Group I and II metabotropic glutamate receptors modulate respiratory activity in the lamprey. *Eur J Neurosci.* 16(3):454-60. 2002

Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chédotal A, Fortin G. Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci.* 13(9):1066-74. 2010

Brocard F, Dubuc R. Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90:1714–1727. 2003

Broch L, Morales RD, Sandoval AV, Hedrick MS. Regulation of the respiratory central pattern generator by chloride-dependent inhibition during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J. Exp. Biol.* 205, 1161–1169. 2002

Brockhaus J, Ballanyi K, Smith JC, Richter DW. Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. *J Physiol.*462:421-45. 1993

Butler AB, Hodos W. *Comparative vertebrate neuroanatomy: Evolution and adaptation.* New York: Wiley-Liss. 1996

Cabelguen JM, Bourcier-Lucas C, Dubuc R. Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*. *J Neurosci.* 23:2434-9. 2003

Chen AK, Hedrick MS. Role of glutamate and substance P in the amphibian respiratory network during development. *Respir Physiol Neurobiol.* 30;162(1):24-31. 2008

Cinelli E, Robertson B, Mutolo D, Grillner S, Pantaleo T, Bongianni F. Neuronal mechanisms of respiratory pattern generation are evolutionary conserved. *J Neurosci.* 22;33(21):9104-12. 2013

Cinelli E, Mutolo D, Robertson B, Grillner S, Contini M, Pantaleo T, Bongianni F. GABAergic and glycinergic inputs modulate rhythmogenic mechanisms in the lamprey respiratory network. *J Physiol.* 15;592(Pt 8):1823-38. 2014

Cinelli E, Mutolo D, Contini M, Pantaleo T, Bongianni F. Inhibitory control of ascending glutamatergic projections to the lamprey respiratory rhythm generator. *Neuroscience.* 21;326:126-40. 2016

Cohen MI. Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *J Physiol* 217:133–158. 1971

Del Negro CA, Koshiya N, Butera RJ Jr, Smith JC. Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-bötzinger complex inspiratory neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 88(5):2242-50. 2002

Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL. Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron.* 34:821–30. 2002

Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL. Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci.* Jan 12;25(2):446-53. 2005

Del Negro CA, Hayes JA. A 'group pacemaker' mechanism for respiratory rhythm generation. *J Physiol.* 1;586(9):2245-6. 2008

Dubuc R, Bongianni F, Ohta Y, Grillner S. Dorsal root and dorsal column mediated synaptic inputs to reticulospinal neurons in lampreys: involvement of glutamatergic, glycinergic, and GABAergic transmission. *J Comp Neurol* 327:251–259. 1993a

Dubuc R, Bongianni F, Ohta Y, Grillner S. Anatomical and physiological study of brainstem nuclei relaying dorsal column inputs in lampreys. *J Comp Neurol* 327:260–270. 1993b

Dubuc R, Brocard F, Antri M, Fénelon K, Gariépy JF, Smetana R, Ménard A, Le Ray D, Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Sirota MG, Derjean D, St-Pierre M, Zielinski B, Auclair F, Veilleux D. Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Res Rev.* 57(1):172-82. 2008

Dutschmann M, Dick TE. Pontine mechanisms of respiratory control. *Compr Physiol.* 2(4):2443-69. 2012

Eidelberg E, Walden JG, Nguyen LH. Locomotor control in macaque monkeys. *Brain.* 104: 647-63. 1981

Eldridge FL, Millhorn DE, Waldrop TG. Exercise hyperpnea and locomotion: parallel activation from the hypothalamus. *Science* 211:844–846. 1981

Eldridge FL, Millhorn DE, Kiley JP, Waldrop TG. Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. *Respir Physiol* 59:313–337. 1985

Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci.* 7:232–242. 2006

Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol.* 75:423-52. 2013

Funk GD, Milsom WK, Steeves JD. Coordination of wingbeat and respiration in the Canada goose. I. Passive wing flapping. *J Appl Physiol.* 73:1014-24. 1992

Galante RJ, Kubin L, Fishman AP, Pack AI. Role of chloride-mediated inhibition in respiratory rhythmogenesis in an *in vitro* brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. *J. Physiol. (Lond.)* 492, 545–558. 1996

Gargaglioni LH, Branco LG. Nucleus isthmi and control of breathing in amphibians. *Respi Physiol Neurobiol.* 143(2-3):177-86. 2004

Gariépy JF, Missaghi K, Dubuc R. The interactions between locomotion and respiration. *Prog Brain Res.* 187:173-88. 2010

Gariépy JF, Missaghi K, Chartré S, Robert M, Auclair F, Dubuc R. Bilateral connectivity in the brainstem respiratory networks of lampreys. *J Comp Neurol.* 1;520(7):1442-56. 2012a

Gariépy JF, Missaghi K, Chevallier S, Chartré S, Robert M, Auclair F, Lund JP, Dubuc R. Specific neural substrate linking respiration to locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 10;109(2):E84-92. 2012b

Giraudin A, Le Bon-Jégo M, Cabirol MJ, Simmers J, Morin D. Spinal and pontine relay pathways mediating respiratory rhythm entrainment by limb proprioceptive inputs in the neonatal rat. *J Neurosci.* 32(34):11841-53. 2012

Gravel J, Brocard F, Gariépy JF, Lund JP, Dubuc R. Modulation of respiratory activity by locomotion in lampreys. *Neuroscience.* 9;144(3):1120-32. 2007

Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science.* 286:1566–1568. 1999

Gray PA, Hayes JA, Ling GY, Llona I, Tupal A, Pircado MC, Ross SE, Hirita T, Corbin JG, Eugenin J, Del Negro CA. Developmental origin of PreBötzinger complex respiratory neurons. *J Neurosci.* 30(44):14883-95. 2010

Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J Physiol.* 437:727-49. 1991

Guimond JC, Auclair F, Lund JP, Dubuc R. Anatomical and physiological study of respiratory motor innervation in lampreys. *Neuroscience.* 122(1):259-66. 2003

Haouzi, P. Counterpoint: Supraspinal locomotor centers do not contribute significantly to the hyperpnea of dynamic exercise. *J Appl Physiol.* 100(3):1077–1083. 2006

Haxhiu MA, Cherniack NS, van Lunteren E. Central action of tachykinins on activity of expiratory pumping muscles. *J Appl Physiol.* 69(6):1981-6. 1990

Hoffman M, Taylor BE, Harris MB. Evolution of lung breathing from a lungless primitive vertebrate. *Respir Physiol Neurobiol.* pii: S1569-9048(15)30053-7. 2015

Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. *J Physiol.* 15;545(Pt 3):1017-26. 2002

Janczewski WA, Tashima A, Hsu P, Cui Y, Feldman JL. Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci.* 27;33(13):5454-65. 2013

Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL. Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol.* 72(6):2598-608. 1994

Johnson SM, Wilkerson JE, Wenninger MR, Henderson DR, Mitchell GS. Role of synaptic inhibition in turtle respiratory rhythm generation. *J Physiol.* 1;544(Pt 1):253-65. 2002

Johnson SM, Wiegel LM, Majewski DJ. Are pacemaker properties required for respiratory rhythm generation in adult turtle brain stems in vitro? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(2):R901-10. 2007

Johnson SM, Hedrick MS, Krause BM, Nilles JP, Chapman MA. Respiratory neuron characterization reveals intrinsic bursting properties in isolated adult turtle brainstems (*Trachemys scripta*). *Respir Physiol Neurobiol.* pii: S1569-9048(14)00299-7. 2014

Johnston JB. Additional notes on the cranial nerves of petromyzonts. *J Comp Neurol.* 18:569-608. 1908

- Kawasaki R. Breathing rhythm-generation in the adult lamprey, *Entosphenus japonicus*. *Jpn J Physiol* 29: 327-338. 1979
- Kawasaki R. Artificial pacemaking of breathing movements by medullary stimulation in adult lampreys. *Jpn J Physiol*. 31(4):571-83. 1981
- Kawasaki R. Breathing rhythm-generation mechanism in the adult lamprey (*Lampetra japonica*). *Jpn J Physiol*. 34(2):319-35. 1984
- Kinkead R, Harris MB, Milsom WK. The role of the nucleus isthmi in respiratory pattern formation in bullfrogs. *J Exp Biol*. 200(Pt 12):1781-93. 1997
- Kinkead R. Phylogenetic trends in respiratory rhythmogenesis: insights from ectothermic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol*. 31;168(1-2):39-48. 2009
- Koizumi H, Smith JC. Persistent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex in vitro. *J Neurosci*. 13;28(7):1773-85. 2008
- Koshiya N, Smith JC. Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400(6742):360-3. 1999
- Krogh A, Lindhard J. The regulation of respiration and circulation during the initial stages of muscular work. *J Physiol*. 47(1-2), 112-136. 1913
- Le Gal JP, Juvin L, Cardoit L, Thoby-Brisson M, Morin D. Remote control of respiratory neural network by spinal locomotor generators. *PLoS One* 9:e89670. 2014

Le Ray D, Brocard F, Bourcier-Lucas C, Auclair F, Lafaille P, Dubuc R. Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in lampreys. *Eur J Neurosci.* 17(1):137-48. 2003

Lindström T. On the cranial nerves of cyclostomes with special reference to n. trigeminus. *Acta Zool* 30:315–458. 1949

Lin ST, Onimaru H. Effects of riluzole on respiratory rhythm generation in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Neurosci Res.* pii: S0168-0102(14)00317-4. 2014

Marlinsky VV, Voitenko LP. The effect of procaine injection into the medullary reticular formation on forelimb muscle activity evoked by mesencephalic locomotor region and vestibular stimulation in the decerebrated guinea-pig. *Neuroscience.* 45:753-9. 1991

Martel B, Guimond JC, Gariépy JF, Gravel J, Auclair F, Kolta A, Lund JP, Dubuc R. Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon. *Neuroscience.* 10;148(1):279-93. 2007

Mateika JH, Duffin J. A review of the control of breathing during exercise. *Eur J Appl Occup Physiol.* 71:1-27. 1995

Morin D, Viala D. Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. *J Neurosci.* 22:4756-65. 2002

Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Orlovsky GN, Deliagina TG. Postural performance in decerebrated rabbit. *Behav Brain Res.* 190:124-34. 2008

Mutolo D, Bongianni F, Einum J, Dubuc R, Pantaleo T. Opioid-induced depression in the lamprey respiratory network. *Neuroscience*. 12;150(3):720-9. 2007

Mutolo D, Bongianni F, Cinelli E, Pantaleo T. Role of neurokinin receptors and ionic mechanisms within the respiratory network of the lamprey. *Neuroscience*. 1;169(3):1136-49. 2010

Mutolo D, Cinelli E, Bongianni F, Pantaleo T. Identification of a cholinergic modulatory and rhythmogenic mechanism within the lamprey respiratory network. *J Neurosci*. 14;31(37):13323-32. 2011

Okada Y, Mückenhoff K, Holtermann G, Acker H, Scheid P. Depth profiles of pH and PO<sub>2</sub> in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respir Physiol*. 93(3):315-26. 1993

Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. CO<sub>2</sub>-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci*. 26;28(48):12845-50. 2008

Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. Postsynaptic mechanisms of CO<sub>2</sub> responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *J Physiol*. 590(7):1615-24. 2012

Pace RW, Mackay DD, Feldman JL, Del Negro CA. Inspiratory bursts in the preBötzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. *J Physiol*. 582(Pt1):113-25. 2007

Pace RW, Del Negro CA. AMPA and metabotropic glutamate receptors cooperatively generate inspiratory-like depolarization in mouse respiratory neurons in vitro. *Eur J Neurosci.* 28(12):2434-42. 2008

Peña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron.* 8;43(1):105-17. 2004

Peña F, Ramirez JM. Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J Neurosci.* 24(34):7549-56. 2004

Pantaleo T, Bongianni F, Mutolo D. Central nervous mechanisms of cough. *Pulm Pharmacol Ther.* 15(3):227-33. 2002

Potts JT, Rybak IA, Paton JF. Respiratory rhythm entrainment by somatic afferent stimulation. *J Neurosci.* 25:1965-78. 2005

Rovainen CM. Respiratory motoneurons in lampreys. *J Comp Physiol.* 94(1): 57-68. 1974

Rovainen CM. Neural control of ventilation in the lamprey. *Fed Proc.* 36(10):2386-9. 1977

Rovainen CM. Neurobiology of lampreys. *Physiol Rev.* 59(4):1007-77. 1979

Rovainen CM. Generation of respiratory activity by the lamprey brain exposed to picrotoxin and strychnine, and weak synaptic inhibition in motoneurons. *Neuroscience*. 10(3):875-82. 1983

Rovainen CM. Respiratory bursts at the midline of the rostral medulla of the lamprey. *J Comp Physiol A*. 157(3):303-9. 1985

Russell DF. Respiratory pattern generation in adult lampreys (*Lampetra fluviatilis*): interneurons and burst resetting. *J Comp Physiol A*. 158(1):91-102. 1986

Rybak IA, O'Connor R, Ross A, Shevtsova NA, Nuding SC, Segers LS, Shannon R, Dick TE, Dunin-Barkowski WL, Orem JM, Salomon IC, Morris KF, Lindsey BG. Reconfiguration of the pontomedullary respiratory network: a computational modeling study with coordinated in vivo experiments. *J Neurophysiol*. 100(4):1770-99. 2008

Ryczko D, Dubuc R. The multifunctional mesencephalic locomotor region. *Curr Pharm Des* 19:4448-70. 2013

Ryczko D, Grätsch S, Auclair F, Dubé C, Bergeron S, Alpert MH, Cone JJ, Roitman MF, Alford S, Dubuc R. Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(34):E3235-42. 2013

Sherman D, Worrell JW, Cui Y, Feldman JL. Optogenetic perturbation of preBötzinger complex inhibitory neurons modulates respiratory pattern. *Nat Neurosci*. 18(3):408-14. 2015

Shik ML, Severin FV, Orlovskii GN. Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain. *Biofizika*. 11:659-66. 1966

Sirota MG, Di Prisco GV, Dubuc R. Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci.* 12:4081-92. 2000

Skinner RD, Garcia-Rill E. The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. *Brain Res.* 323:385-9. 1984

Smith JC, Greer JJ, Liu GS, Feldman JL. 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):1149-69. 1990

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1;254(5032):726-9. 1991

St John WM, Zhou D. Rostral pontile mechanisms regulate durations of expiratory phases. *J Appl Physiol.* 71(6):2133-7. 1991

Thoby-Brisson M, Ramirez JM. Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol.* 86(1):104-12. 2001

Thompson KJ. Organization of inputs to motoneurons during fictive respiration in the isolated lamprey brain. *J Comp Physiol A.* 157(3):291-302. 1985

Thompson KJ. Control of respiratory motor pattern by sensory neurons in spinal cord of lamprey. *J Comp Physiol A.* 166(5):675-84. 1990

Tretjakoff D. Das Periphere nervensystem des Fluneunauges. *Z Wiss Zool.* 129:359–452. 1927

Vasilakos K, Wilson RJ, Kimura N, Remmers JE. Ancient gill and lung oscillators may generate the respiratory rhythm of frogs and rats. *J Neurobiol.* 15;62(3):369-85. 2005

von Euler C, Marttila I, Remmers JE, Trippenbach T. Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta Physiol Scand* 96:324–337. 1976

von Euler C. The functional organization of the respiratory phase-switching mechanisms. *Fed Proc.* 36(10):2375-80. 1977

von Euler US, Pernow B. Neurotropic effects of substance P. *Acta Physiol Scand.* 36(3):265-75. 1956

Waldrop TG, Eldridge FL, Millhorn DE. Prolonged post-stimulus inhibition of breathing following stimulation of afferents from muscle. *Respir Physiol.* 50: 239-54. 1982

Waldrop TG, Mullins DC, Millhorn DE. Control of respiration by the hypothalamus and by feedback from contracting muscles in cats. *Respir Physiol* 64:317–328. 1986

Waldrop TG, Iwamoto GA. Point: Supraspinal locomotor centers do contribute significantly to the hyperpnea of dynamic exercise. *J Appl Physiol.* 100(3):1077–1083. 2006

Wilson RJ, Vasilakos K, Harris MB, Straus C, Remmers JE. Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *J Physiol.* 15;540(Pt 2):557-70. 2002

Wilson RJ, Vasilakos K, Remmers JE. Phylogeny of vertebrate respiratory rhythm generators: the Oscillator Homology Hypothesis. *Respir Physiol Neurobiol.* 154(1-2):47-60. 2006

## **Description de mes contributions**

L'introduction de ma thèse comprend une revue de question pour laquelle je suis premier auteur publiée dans le *Journal of Respiratory Physiology and Neurobiology* intitulé « Neural Control of Respiration in Lampreys » (Missaghi et al., 2016). Cette revue de question porte sur les découvertes scientifiques en lien avec le contrôle de la respiration chez la lamproie. Elle aborde aussi les aspects comparatifs entre les réseaux de la respiration de la lamproie et ceux des autres vertébrés. Ma contribution à cet article a été d'avoir écrit le texte.

La section résultat de ma thèse est divisée en deux parties, soit : la connectivité des réseaux neuronaux du rythme rapide chez la lamproie et la connectivité des réseaux neuronaux responsables du rythme lent chez le même animal. La première partie portant sur le rythme rapide a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Comparative Neurology* intitulée « Bilateral connectivity in the brainstem respiratory networks of lampreys » (Gariépy et al., 2016a), Ma contribution à cet article a été la réalisation et l'analyse de la majorité des expériences physiologiques et anatomiques s'y retrouvant. Les expériences de patch ont été réalisées par le premier auteur Jean-François Gariépy.

En ce qui concerne la deuxième partie des résultats de ma thèse portant sur le rythme lent, les résultats physiologiques et anatomiques ont été réalisés par moi.

# **Méthodologie**

#### A) Préparation de tronc cérébral de la lamproie isolé *in vitro*

Les expériences anatomiques et physiologiques décrites dans cette thèse ont été réalisées sur une préparation de tronc cérébral de lamproie isolé *in vitro* au stade développemental de jeunes adultes. Les animaux ont été anesthésiés par application de MS-222 (Sigma; 100 mg/litre) dans l'eau. Après vérification de l'anesthésie par absence de réponse réflexe comme après le pincement de la queue, les lamproies étaient euthanasiées par décapitation. Puis, le tronc cérébral était rapidement disséqué, en prenant soin de conserver une partie du cartilage crânien pour aider à fixer la préparation. Les préparations étaient ensuite maintenues entre 7-9°C dans une solution de Ringer oxygénée, dont la composition est (en mM) : NaCl, 130; KCl, 2.1; CaCl<sub>2</sub>, 2.6; MgCl<sub>2</sub>, 1.8; HEPES, 4; dextrose, 4; NaHCO<sub>3</sub>, 1.. Le pH de cette solution était ensuite ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Lors des expériences de physiologie, des sections transversales de la préparation ont été réalisées au niveau de la partie caudale des bulbes olfactifs, ainsi qu'au niveau du premier segment de la moelle épinière. Ces dernières avaient pour but de minimiser l'occurrence d'éventuelles influences excitatrices et/ou inhibitrices qui s'exerceraient sur les centres respiratoires. Pour les expériences portant exclusivement sur le CRG, une préparation isolée *in vitro* spécifique a été développée. Une section transversale était réalisée au niveau de la partie caudale du noyau moteur du V, afin d'isoler les réseaux du rhombencéphale caudal des projections descendantes du pTRG. Dans cette préparation comprenant la moitié caudale du rhombencéphale isolé *in vitro*, seul le rythme respiratoire lent pouvait être enregistré au niveau des motoneurones respiratoires.

## B) Anatomie

### a. Marquage rétrograde

Les connexions du pTRG et du CRG ont été étudiées par traçage axonal avec des injections de biocytine (Sigma, St. Louis, MO) et/ ou de dextran amines conjuguées à du Texas Red (3,000 MW, Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR). Ces deux types de traceurs axonaux sont transportés autant de façon antérograde que rétrograde. Les sites visés par les injections ont d'abord été lésés avec précision à l'aide de micropipettes de verre sous stéréomicroscope. Dans les secondes suivantes, des cristaux de traceurs anatomiques ont été insérés jusqu'à leur dissolution complète, afin de permettre aux axones lésés précédemment d'absorber une quantité dissoute de traceur (Glover et al., 1986). Le transport du traceur dans l'axone se fait par la suite de façon passive.

Afin d'identifier les populations neuronales du pTRG, des injections de traceurs rétrogrades ont été réalisées au niveau du IX<sub>m</sub> et/ou du X<sub>m</sub>. Toutefois, le X<sub>m</sub> étant connu pour innover 5 des 7 branchies chez la lamproie (Guimond et al., 2003), cette structure a constitué une cible prioritaire pour l'injection de traceurs. À l'inverse, afin de mettre en évidence les projections antérogrades des neurones du pTRG et en même temps, marquer rétrogradement les neurones du rhombencéphale caudal qui projettent à cette structure, potentiellement des neurones du CRG, des injections de traceurs ont été réalisées dans la partie rostro-latérale du rhombencéphale où le signal du pTRG obtenu par enregistrement extracellulaire était le plus fort (*cf.* Fig. 8 de Martel et al., 2007).

Dans le but de caractériser davantage les circuits de neurones du CRG dans le rhombencéphale caudal, notamment les neurones commissuraux responsables de la synchronisation bilatérale des CRGs gauche et droit, des injections de traceurs ont été effectuées dans le tegmentum latéral du rhombencéphale caudal, avec ou sans injection concurrente dans le pTRG. Pour ces dernières, un micro-scalpel chirurgical (#10318-14, Fine Science Tools, Foster City, CA) a été utilisé pour réaliser une incision longitudinale le long de la frontière médiane de la colonne de motoneurones respiratoires composée par VII<sub>m</sub>, IX<sub>m</sub> et du X<sub>m</sub>. La profondeur de l'incision représentait approximativement les 2/3 de l'épaisseur du tegmentum.

*b. Révélation*

Les traceurs axonaux injectés ont besoin de temps pour diffuser passivement dans les axones. Les préparations étaient donc conservées une nuit après l'injection de traceur dans une solution de Ringer gardée à 7-9°C et oxygénée constamment. Par la suite, les cerveaux étaient fixés dans une solution de paraformaldehyde 4% dans du PBS (tampon phosphate 0.1 M ; pH 7.4 avec 0.9% de NaCl) pendant 24 heures à 4°C, puis transférés dans une solution de sucrose à 20% dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) à des fins de cryo-protection. Après congélation, les cerveaux étaient coupés en sections transverses d'une épaisseur de 25 µm à l'aide d'un cryostat.

Les coupes de tissu nerveux étaient ensuite collectées sur des lamelles ColorFrost Plus (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) et séchées sur une plaque chauffante à 37°C pendant une nuit. Dans les cas d'injections aux dextran amines, les lames étaient directement montées avec

lamelles et du Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Les cas ayant été injectés à la biocytine demandent une étape de révélation de celle-ci : trois rinçages de 10 minutes au PBS, une incubation de 60 minutes dans une solution de streptavidine conjuguée à de l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) et diluée 1 :200 dans du PBS à température ambiante, trois autres rinçages au PBS. Les lamelles étaient ensuite montées avec du Vectashield contenant du DAPI pour visualiser l'ADN contenu dans les noyaux cellulaires.

Enfin, les coupes de tissu ont été observées et photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence E600 équipé d'une caméra digitale DXM1200 (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada) utilisant des filtres pour l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), ou des filtres pour le Texas Red. L'assemblage des photomicrographies a été réalisé avec le logiciel Photoshop CS5 (Adobe) et les figures dessinées avec CorelDraw X4 (Corel, Ottawa, ON, Canada) ou Illustrator CS5 (Adobe Systems, San José, CA).

La taille des neurones marqués dans le pTRG a été mesurée à l'aide d'un objectif de 40x et d'une échelle micrométrique incorporée dans l'oculaire du microscope à fluorescence. Seuls les neurones avec un noyau identifiable sur la coupe ont été mesurés selon leur axe le plus long. Dans le but d'obtenir une valeur de diamètre la plus représentative possible, 101 neurones de pTRGs issus de trois animaux différents ont été comptabilisés.

Les projections axonales des neurones du pTRG ont été analysées à l'aide de la microscopie à fluorescence. La reconstruction 3D d'un neurone du pTRG et de ses projections a été réalisée à l'aide du logiciel Neurolucida (MBF Neuroscience, Williston, VT). Il est à noter que les contours du MRRN, du PRRN ainsi que des noyaux moteurs (V, VII, IX et X)

ont été tracés suivant la localisation des corps cellulaires des neurones constituant chacune de ces régions.

Pour la reconstruction 3D du rhombencéphale caudal illustrant les neurones rétrogradement marqués à partir d'injections dans le pTRG et du tegmentum latéral, nous avons choisi deux animaux représentant le plus fidèlement possible les résultats obtenus. Pour ce faire, le contour d'une tranche sur trois a été dessiné dans Illustrator (CS5) à partir de photomicrographies. Seul le côté opposé aux injections a été analysé, car le côté injecté présentait bien souvent une fluorescence de fond trop importante pour permettre l'identification certaine des neurones. Les corps cellulaires neuronaux ont été représentés par un point sur les photomicrographies puis confirmés sous microscope en s'aidant du marquage DAPI. Les structures analysées correspondent aux régions dans lesquelles des effets physiologiques ont pu être observés. Ces dernières incluent le tegmentum dans son intégralité, la racine descendante du nerf trijumeau ainsi que la région du sulcus limitans de His. Les nombreux neurones trouvés dans la région octavolatérale (OLA) ont été exclus de l'analyse, car cette région pouvait être retirée de la préparation sans qu'aucun effet physiologique ne soit observé sur l'activité enregistrée du CRG. Les illustrations provenant d'Illustrator ont ensuite été importées dans AutoCAD (v.2014, Autodesk Canada, Montréal, Québec) et converties en 3D. Les illustrations 3D ont finalement été réimportées dans Illustrator afin d'être assemblées en figures.

### *C) Physiologie*

#### *a. Enregistrements extracellulaires*

Les enregistrements extracellulaires des motoneurones ont été réalisés avec des électrodes de verres. Ces dernières ont été obtenues à partir de capillaires de verre (0.58mm de diamètre interne, borosilicate, World Precision Instruments) chauffés et étirés (étireuse P-87, Sutter Instrument Company). Puis l'extrémité de chaque électrode a été coupée afin d'obtenir un diamètre compris entre 20-40  $\mu\text{m}$ . Les électrodes ont ensuite été fixées à un micromanipulateur (Narishige), remplies de solution de Ringer et placées à la surface du  $X_m$ . Le signal enregistré était ensuite amplifié (modèle 1800, A-M systems, Sequim, WA; fréquence plancher: 100 Hz; fréquence plafond: 500 Hz), numérisé (DigiData 1200 serie, Axon Instruments) et visualisé sur ordinateur (pClamp 8.1, Axon Instruments).

*b. Enregistrements unitaires*

*i. Enregistrements intracellulaires (« sharp electrodes »)*

Dans certaines expériences, des motoneurones respiratoires ont été enregistrés individuellement à l'aide de microélectrodes de verre étirées via une étireuse à filament (étireuse P-87, Sutter Instrument Company). Les électrodes (80–120  $M\Omega$ ) ont ensuite été remplies d'acétate de potassium (4M KAc) puis plongées dans le Ringer à l'aide d'un micromanipulateur (Sutter Instrument Company). Afin de visualiser les variations de résistance à l'approche des neurones, des créneaux de courant hyperpolarisant étaient continuellement injectés lors de la descente de la pipette dans le noyau moteur du X. Le signal était amplifié (Axoclamp 2A, Axon Instruments, Foster City, CA; échantillonnage: 10 kHz), numérisé (DigiData 1200 serie, Axon Instruments) et visualisé sur ordinateur (Clampex 8.1, Axon Instruments).

ii. *Enregistrements « patch clamp » mode cellule entière*

Des enregistrements de «patch clamp» en configuration cellule-entière ont également été effectués dans le but de caractériser les projections et l'activité des neurones du pTRG et du CRG. Afin d'identifier les populations neuronales à enregistrer, des marquages rétrogrades ont été réalisés sur des animaux *in vivo*. À cet effet, des cristaux de dextran amines conjugués au Texas Red ont été injectés dans le X<sub>m</sub> ou le pTRG afin de marquer respectivement les neurones du pTRG et du CRG. Pour cela, l'animal était anesthésié profondément et le tronc cérébral exposé grâce à une ouverture de 2 mm au-dessus du crâne. Les dextran amines étaient ensuite injectés dans le tissu nerveux et le crâne refermé avec de la colle Vetbond (3M produits de soins animaliers, St. Paul, MN). Puis, les animaux étaient déposés dans un aquarium rempli d'une solution de Ringer oxygénée à température ambiante pour la nuit. Le lendemain, ces derniers étaient disséqués pour obtenir une préparation de tronc cérébral isolé *in vitro* comme décrit précédemment. Enfin, pour accéder aux neurones du pTRG, certaines structures du rhombencéphale dorsal ont dû être coupées à l'aide d'un vibratome : la plaque alaire au niveau de V<sub>m</sub>, la partie dorsale de V<sub>m</sub>, la région isthmique dorsale ainsi que le tectum optique. En ce qui concerne l'accès aux neurones du CRG, la plaque alaire au niveau de VII<sub>m</sub>, IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub>, ainsi qu'une partie de celle de V<sub>m</sub> étaient coupées.

Pour cibler les populations neuronales à enregistrer, les neurones étaient d'abord visualisés sous fluorescence à l'aide d'un microscope Eclipse FN-1 (Nikon Instruments, Melville, NY). Ce microscope est adapté pour permettre l'utilisation de matériel d'enregistrement de « patch clamp ». Les enregistrements des neurones étaient ensuite réalisés avec des microélectrodes de verre (0.58mm de diamètre interne, borosilicate, World Precision

Instruments) étirées à l'aide d'une étireuse à filament (modèle P-87, Sutter Instrument Company). Les électrodes ( $\pm 5 \text{ M}\Omega$ ) étaient remplies d'une solution composée de (en mM) : méthane sulfonate de césium 102.5, NaCl 1, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 5, HEPES 5, et 0.1% de biocytine. Le pH de la solution était ajusté à 7.2 avec du CsOH. Pour les neurones du pTRG, les enregistrements étaient réalisés en configuration cellule-entière avec un voltage imposé de -70 mV. Les neurones du CRG étaient enregistrés en configuration courant imposé afin de pouvoir observer leurs épisodes d'activité spontanée. Les signaux étaient amplifiés (modèle 2400, A-M systems, Sequim, WA), numérisés (DigiData 1200 serie, Axon Instruments) et visualisés sur ordinateur (pClamp 8.1, Axon Instruments).

### *iii. Stimulation électrique*

Au cours de certaines expériences, des stimulations électriques du tissu nerveux ont été réalisées à l'aide de microélectrodes de tungstène recouvertes de verre (0.8–2 M $\Omega$ ) et d'un stimulateur (Grass, Natus Medical Incorporated). Ainsi, les stimulations du pTRG consistaient en l'application de chocs électriques unitaires (1–10  $\mu\text{A}$ , 2 ms) appliqués à une fréquence de 0.05 Hz, alors que les stimulations du CRG reposaient sur des séries de 3 chocs électriques (1–15  $\mu\text{A}$  ; 30 Hz) répétées toutes les 50-80 secondes.

### *D) Applications pharmacologiques*

Pour déterminer la localisation anatomique des projections descendantes du pTRG vers les motoneurones respiratoires, des injections de Xylocaïne (Xylocaïne 2%, AstraZeneca, Mississauga, ON, Canada) ont été réalisées à l'aide de micropipettes (Picospritzer, General Valve, Fairfield, NJ). Dans d'autres expériences, les antagonistes glutamatergiques 6-cyano-7-

nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 1 mM) et (2R)-amino-5-acide phosphonoalérique (AP-5; 500  $\mu$ M) ont été injectés au niveau des motoneurones respiratoires. Afin de suivre l'étendue des injections, le colorant Fast Green était systématiquement ajouté aux solutions de drogues (Brocard and Dubuc, 2003; Derjean et al., 2010; Gariépy et al., 2012b). La durée des injections était adaptée au flux de la solution sortante des micropipettes, variant entre quelques secondes à quelques minutes.

Les activations pharmacologiques du CRG étaient quant à elles réalisées à l'aide d'une solution de DL-glutamate (2.5 mM; Sigma) diluée dans une solution de Ringer. Dans ces séries expérimentales, le Picospritzer était connecté à l'unité de stimulation GRASS S88, afin que les injections de DL-glutamate soient réalisées sous forme de train (5 Hz ; 5-10 s ; 1-3 psi, 5-10 ms par impulsion) toutes les 80-120s.

Dans d'autres séries d'expériences, des injections bilatérales de Xylocaïne et de [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO, 1 mM) (E 7384, Sigma, Oakville, ON) (Mutolo et al., 2007) ont été réalisées manuellement via un Picospritzer (1-3 psi, 10 ms par impulsion) dans le but d'inactiver les réseaux respiratoires du CRG. Les injections bilatérales étaient exécutées à l'aide de la même micropipette. Celle-ci étant déplacée le plus rapidement possible d'un côté à un autre. Les volumes injectés ont été estimés à l'aide du diamètre d'une gouttelette éjectée de la micropipette (diamètre  $\approx$  10-40  $\mu$ m) après avoir appliqué une impulsion de simple de 3-4 psi. Le volume de la gouttelette a été calculé par l'équation d'une sphère ( $\approx$  0.04-3 nL).

Finalement, la substance P (1  $\mu$ M) (S 6883, Sigma, Oakville, ON) et un mélange composé de CNQX (30  $\mu$ M) et d'AP-5 (200  $\mu$ M) ont été perfusés en bain sur des préparations de moitié caudale de rhombencéphale isolé *in vitro*. Les concentrations choisies ont été basées sur des études précédentes chez la lamproie (Mutolo et al., 2007; Mutolo et al., 2010; Martel et al., 2007).

#### *E) Analyses des données*

Les données dans le texte et les figures sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  l'écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SigmaStat version 3.5 (Systat Software, Chicago, IL). L'analyse des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSEs) a été réalisée avec Spike2 version 5.9 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) à l'aide d'un script programmé dans notre laboratoire. Les moyennes de 20 à 100 PPSEs par animal ont été utilisées pour comparer les phases témoin, d'effet et de récupération. Un test-t était appliqué lorsque la moyenne de deux groupes devait être comparée. Lorsque deux distributions ne respectaient pas une distribution normale des valeurs ou une répartition égale de la variance, un test non-paramétrique Mann-Whitney était utilisé pour comparer les moyennes. Finalement, une ANOVA sur des mesures répétées était utilisée lors de comparaisons à plus de deux groupes. Les résultats étaient considérés significatifs lorsque la valeur du *P* était inférieure à 0.05.

Les longues bouffées rythmiques caractérisant le rythme lent sont facilement détectables sur le signal neurographique. Dans les expériences d'inactivation par injection de Xylocaïne, les bouffées de décharge ont été détectées manuellement à l'aide du logiciel

Spike2. Lors des expériences réalisées sur les préparations de tronc cérébral intact *in vitro*, un épisode de rythme lent était défini comme étant : soit une longue bouffée de décharge comprise entre deux bouffées de rythme rapide, soit une série de longues bouffées de décharge non-interrompue par une bouffée de rythme rapide. Dans le cas des expériences réalisées sur des préparations de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, un épisode de rythme lent était considéré comme étant une longue bouffée de décharge isolé, ou bien une série de longues bouffées espacées au maximum de 3 secondes. Passé outre les 3 secondes, les longues bouffées de décharge étaient considérées comme un nouvel épisode. La période d'un cycle a été déterminée comme étant la durée entre le début d'une longue bouffée de décharge et le début de la prochaine. La variation de la moyenne des périodes de 10 cycles a été utilisée pour comparer les phases témoin, d'effet et de récupération.

Concernant les expériences physiologiques basées sur des stimulations électriques et des applications pharmacologiques, les épisodes de rythme lent ont été détectés à l'aide d'un script de *réinitialisation du voltage intégré* conçue au laboratoire (Guertin et Dubuc, 1997). Le signal neurographique brut était d'abord rectifié puis intégré et réinitialisé avec un seuil de détection préétabli. La densité des barres dans les trames est proportionnelle à l'énergie du signal neurographique brut. Le nombre de potentiel d'action (PA) était ensuite compté à l'intérieur d'une fenêtre de temps de 20 ms sur une période de 5 secondes précédant et suivant les épisodes de stimulation.

# Résultats

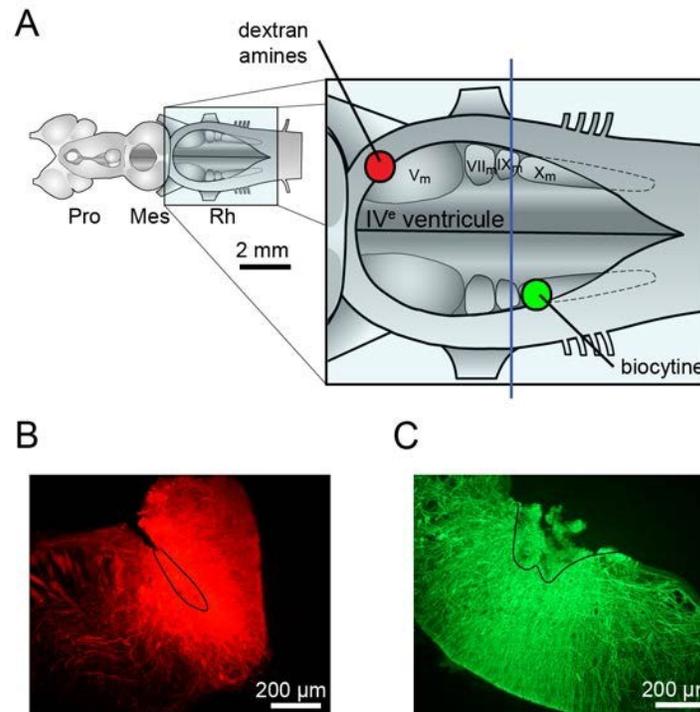
## **Connectivité des réseaux neuronaux du rythme respiratoire rapide chez la lamproie.**

Chez la lamproie, la respiration peut être enregistrée en plaçant des électrodes sur les nerfs crâniens VII, IX et X, ou directement au-dessus des pools de motoneurones de ces mêmes nerfs, situés dans la portion caudale du rhombencéphale. Les travaux de Martel et al. (2007) ont démontré que le rythme rapide provient de neurones localisés dans le pTRG. Ils ont également montré, par des expériences de lésions, que le rythme rapide enregistré dans le pTRG persiste lorsque cette région est complètement isolée des motoneurones respiratoires plus caudaux. Dans ces conditions, le rythme rapide disparaît dans les motoneurones respiratoires. Le rythme rapide enregistré dans le pTRG persiste même lorsqu'une lésion additionnelle isole celui-ci du pTRG controlatéral. Des expériences de traçage axonal ont été réalisées pour identifier et caractériser les projections pTRG.

### *A) Caractérisation anatomique des neurones du pTRG et de leurs projections*

Des injections unilatérales de biocytine au niveau des motoneurones respiratoires (n = 21) ont été effectuées pour identifier les populations de neurones dans la région rostro-latérale du rhombencéphale, à l'endroit où le signal respiratoire enregistré dans le pTRG est le plus fort. Dans d'autres expériences, les injections au niveau des motoneurones respiratoires ont été combinées à des injections de dextran amines fluorescentes dans le pTRG ipsilatéral (n = 6), ou controlatéral (n = 6) (Fig. 10) pour évaluer la proportion de neurones du pTRG qui projetait à la fois au pTRG controlatéral et aux motoneurones respiratoires. Lors de l'analyse au microscope de ces populations de neurones, une coupe transverse de rhombencéphale a été ignorée entre chaque coupe analysée, afin d'éviter que des neurones ne soient comptés deux

fois. Cela a toutefois inévitablement influencé à la baisse le nombre total de neurones répertoriés, mais la distribution de ces derniers était notre principal intérêt.

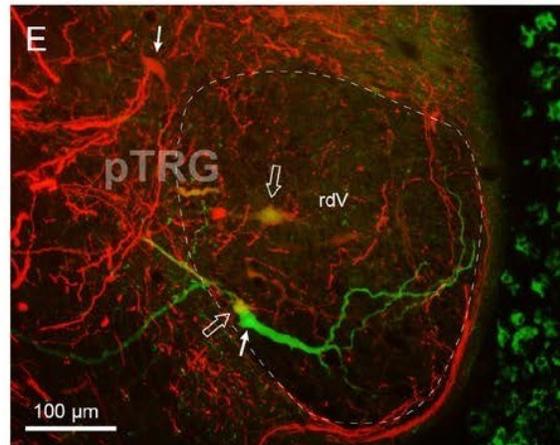
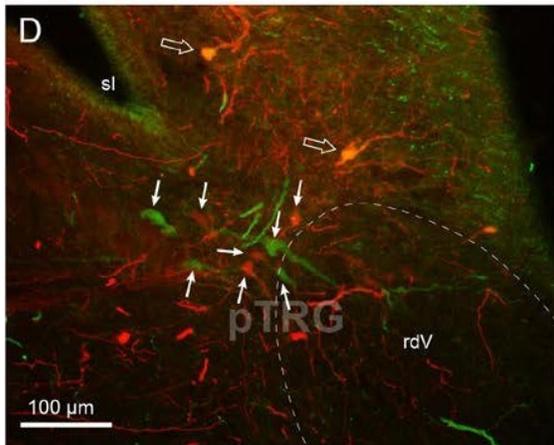
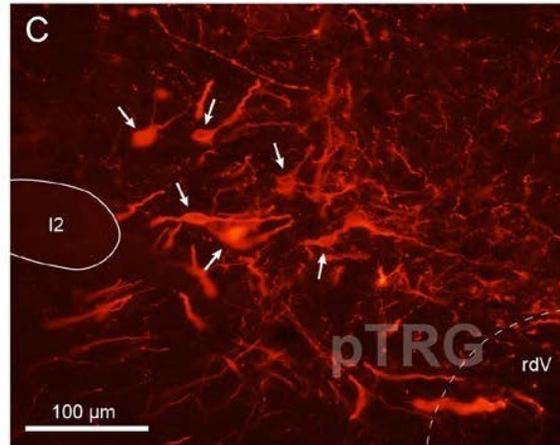
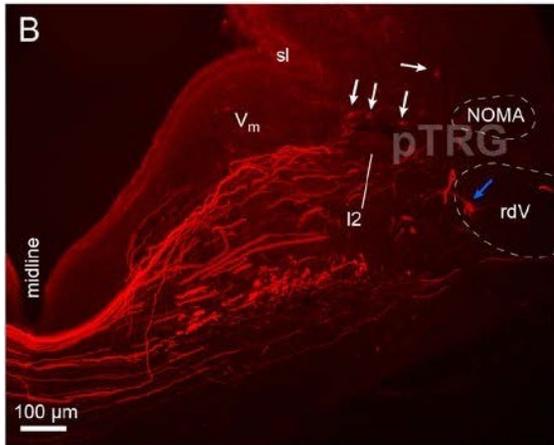
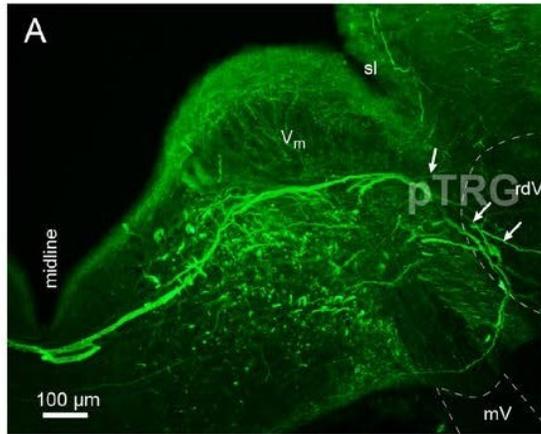


**Figure 11. Sites d'injection des traceurs anatomiques.** A: Schéma d'une vue dorsale d'un cerveau de lamproie adulte illustrant un exemple de sites controlatéraux d'injections des traceurs anatomiques dans le pTRG (rouge) et les motoneurones respiratoires (vert). B,C : Photomicrographies de coupes transverses illustrant un exemple de site d'injection dans le pTRG avec des dextran amines conjugués au Texas Red (B) et à la biocytine au niveau des motoneurones respiratoires (C). Les régions du tissu nerveux lésées par les pipettes d'injections et qui constituent les sites d'injection effectifs des traceurs ont été délimitées par une ligne noire

Les injections unilatérales au niveau des motoneurones respiratoires ont révélé deux populations de neurones dans la région du pTRG. La première population était constituée de cellules (corps cellulaires de 25-40 μm) localisées bilatéralement, mais surtout controlatéralement, près de la frontière médiane de la racine descendante du nerf trijumeau

(rdV; Figs. 11A,E, neurones verts et jaunes). Ces cellules ont un arbre dendritique imposant qui s'étend surtout dans le rdV (Fig. 11E, neurone vert), et un axone de grand diamètre qui croise la ligne médiane au même niveau que le corps cellulaire (Fig. 11A). La deuxième population était constituée de cellules plus petites (corps cellulaires de 10-23  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 11D, neurones verts et jaunes indiqués par des flèches vides et pleines). Ces neurones sont légèrement plus rostraux que la première population de cellules et se trouvent plus près du sulcus limitans de His (sl). Leur arbre dendritique est plus restreint mais s'étend aussi parfois dans le rdV.

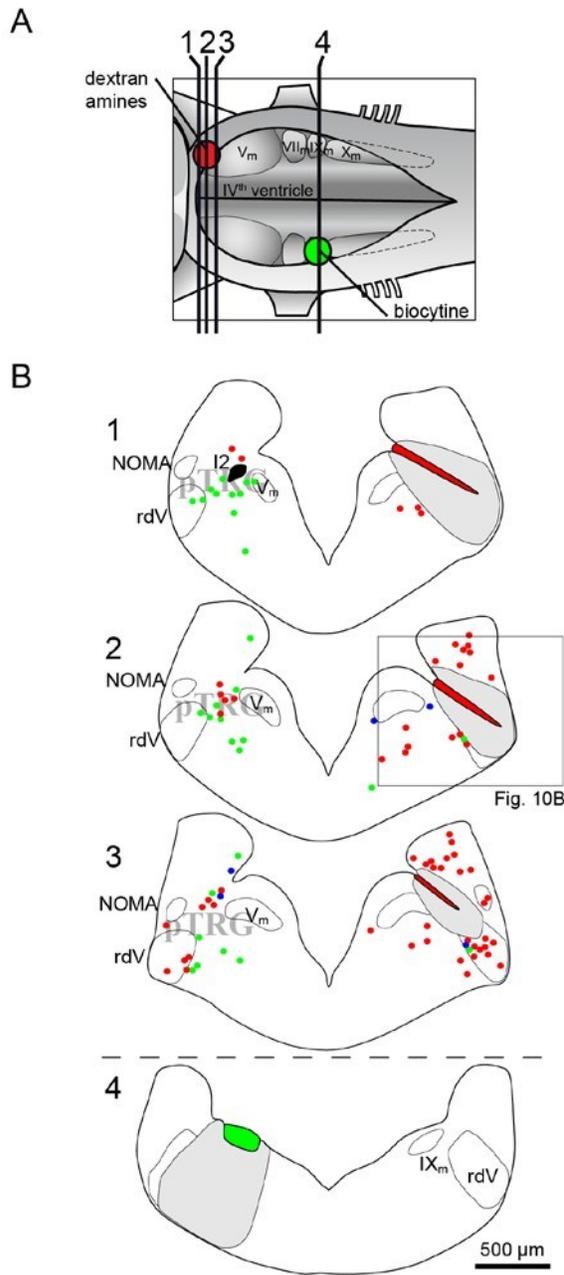
Dans le cas d'animaux ayant reçu une injection unilatérale de biocytine dans le pTRG, le pTRG controlatéral comptait un bon nombre de neurones de petite taille (10-23  $\mu\text{m}$ , Fig. 11B-D, neurones rouges et jaunes) de même que quelques neurones beaucoup plus gros et ventraux, souvent à l'intérieur des limites du rdV (Fig. 11B, flèche bleue et 11E, neurones jaunes). En somme, les populations de neurones du pTRG marquées par une injection dans le pTRG controlatéral et celles marquées par une injection dans les motoneurones respiratoires partagent beaucoup de similitudes en terme de morphologie cellulaire et de localisation.



**Figure 12. Neurones marqués rétrogradement dans le pTRG projetant au pTRG controlatéral et aux motoneurones respiratoires.** A : Photomicrographie d'une coupe transverse illustrant des neurones marqués rétrogradement (flèches) dans la région du pTRG après une injection de biocytine dans les pools de motoneurones respiratoires controlatéraux. Une population de grands neurones possédant un arbre dendritique important a été observée dans le pTRG controlatéral. Ces neurones projetaient un axone de grand diamètre qui croisait la ligne médiane au niveau de leur corps cellulaire respectif. De plus petites cellules étaient également présentes, latéralement au noyau moteur du nerf trijumeau ( $V_m$ ), près du sulcus limitans de His (sl). B : Photomicrographie d'une coupe transverse au niveau du noyau octavomoteur antérieur (NOMA). Une population de petits neurones (flèches blanches) localisés près du sulcus limitans (sl) a été marquée après une injection dans le pTRG controlatéral. De grands neurones, tel que décrits en A ont également été marqués (flèche bleu). C : Photomicrographie à plus fort grossissement de neurones marqués dans le pTRG après une injection dans le pTRG controlatéral. Noter la présence de nombreuses fibres marquées antérogradement et portant des varicosités. D,E : Photomicrographies de neurones du pTRG dans des animaux ayant reçu une injection dans le pTRG controlatéral (rouge) et dans les motoneurones respiratoires (vert) controlatéraux. Des neurones doublement marqués (flèche vides) ont été systématiquement observés dans le pTRG controlatéral aux deux injections. Beaucoup de neurones marqués par seulement l'une ou l'autre des deux injections ont aussi été vus (flèches pleines). I2, cellule isthmique de Müller #2; mV, racine motrice trigéminal; NOMA : noyau octavomoteur antérieur; rdV, racine descendante du nerf trijumeau ; sl : sulcus limitans de His ;  $V_m$  : noyau moteur du nerf trijumeau.

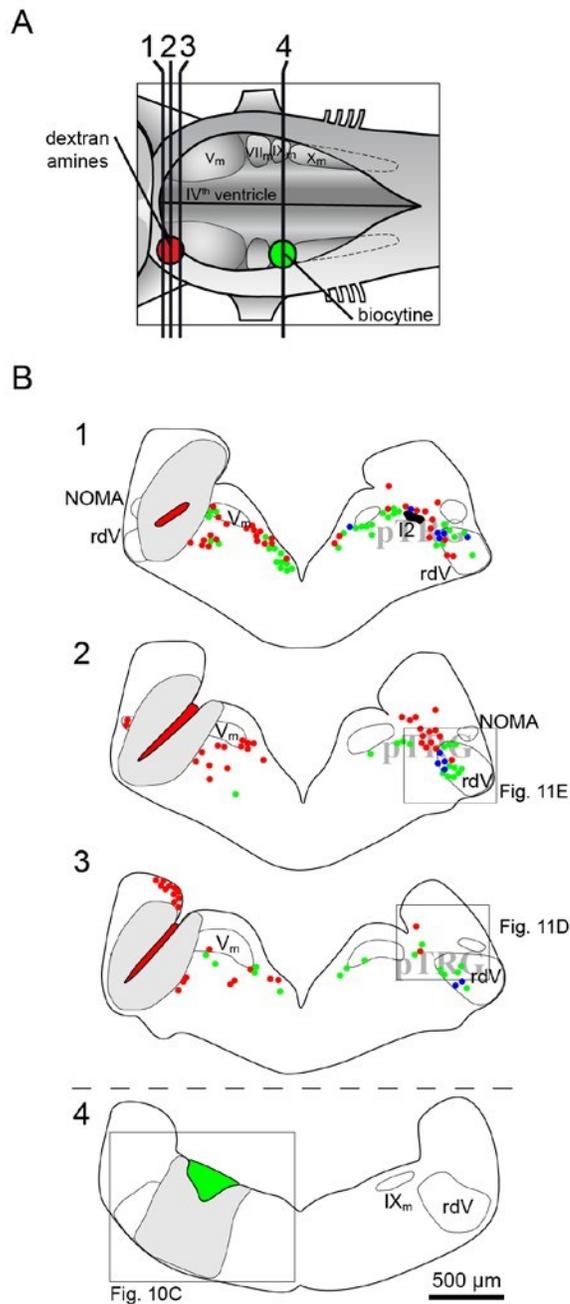
Par la suite, une série d'expériences a été entreprise pour voir si des neurones du pTRG projetaient à la fois au pTRG controlatéral et aux motoneurones respiratoires. La distribution des neurones rétrogradement marqués dans le pTRG chez les animaux ayant reçu des doubles injections de traceur (pTRG/motoneurones respiratoires), de côtés opposés (Fig. 12) ou du même côté (Fig. 13) a été étudiée. Dans tous les cas, des neurones du pTRG doublement marqués ont pu être observés (Figs. 12 et 13, points bleus). Par contre, le nombre de ces cellules était plus important lorsque les injections étaient effectuées du même côté. Bien que des cellules doublement marquées aient été observées dans les deux populations décrites précédemment (Fig. 11D,E, flèches vides), leur proportion est plus grande parmi la population ventro-latérale, celle comprenant des cellules très grandes avec un arbre dendritique imposant et un axone commissural de grand diamètre. Des injections dans le pTRG d'un côté ont marqué de nombreuses fibres antérogradement dans le pTRG de l'autre côté, en plus des neurones rétrogradement marqués (Fig. 11B, C). Elles portent des varicosités et semblent se terminer près des neurones rétrogradement marqués.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la région du pTRG comprend des neurones qui projettent vers leurs homologues controlatéraux et d'autres qui envoient des projections descendantes vers les motoneurones respiratoires des deux côtés du cerveau. Le pTRG comprend également des neurones qui projettent à la fois au pTRG du côté opposé et aux motoneurones respiratoires ipsi- ou controlatéraux.



**Figure 13. Distribution des neurones marqués dans le pTRG après des injections controlatérales de traceurs rétrogrades dans le pTRG et la région des motoneurones respiratoires.**

**A:** Schéma d'une vue dorsale du rhombencéphale illustrant le niveau rostro-caudal des sections transverses montrées en B et les sites d'injection. Les lignes 1-3 et 4 illustrent respectivement le niveau des coupes à la hauteur du pTRG et le niveau de l'injection dans la région des motoneurones respiratoires. **B :** Coupes transverses schématisées tirées d'une préparation ayant reçu une injection dans le pTRG et dans les motoneurones respiratoires du côté opposé. Les points illustrés sur chaque coupe représentent les neurones marqués provenant de trois coupes adjacentes et mises en commun. Chaque point représente une cellule marquée. Les neurones doublement marqués apparaissent en bleu. Les régions en gris autour des sites d'injections représentent les régions non-retenues pour l'analyse en raison de la trop forte fluorescence (voir Fig. 10 B,C). Les régions remplies de vert ou de rouge correspondent aux régions d'injection effective, où le tissu a été lésé par les micropipettes lors des injections. Le rectangle réfère à la localisation de la photomicrographie de la Fig. 10B. I2, cellule isthmique de Müller #2; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien; NOMA, noyau octavomoteur antérieur; rdV, racine descendante du nerf trijumeau ; V<sub>m</sub>, noyau moteur du nerf trijumeau.



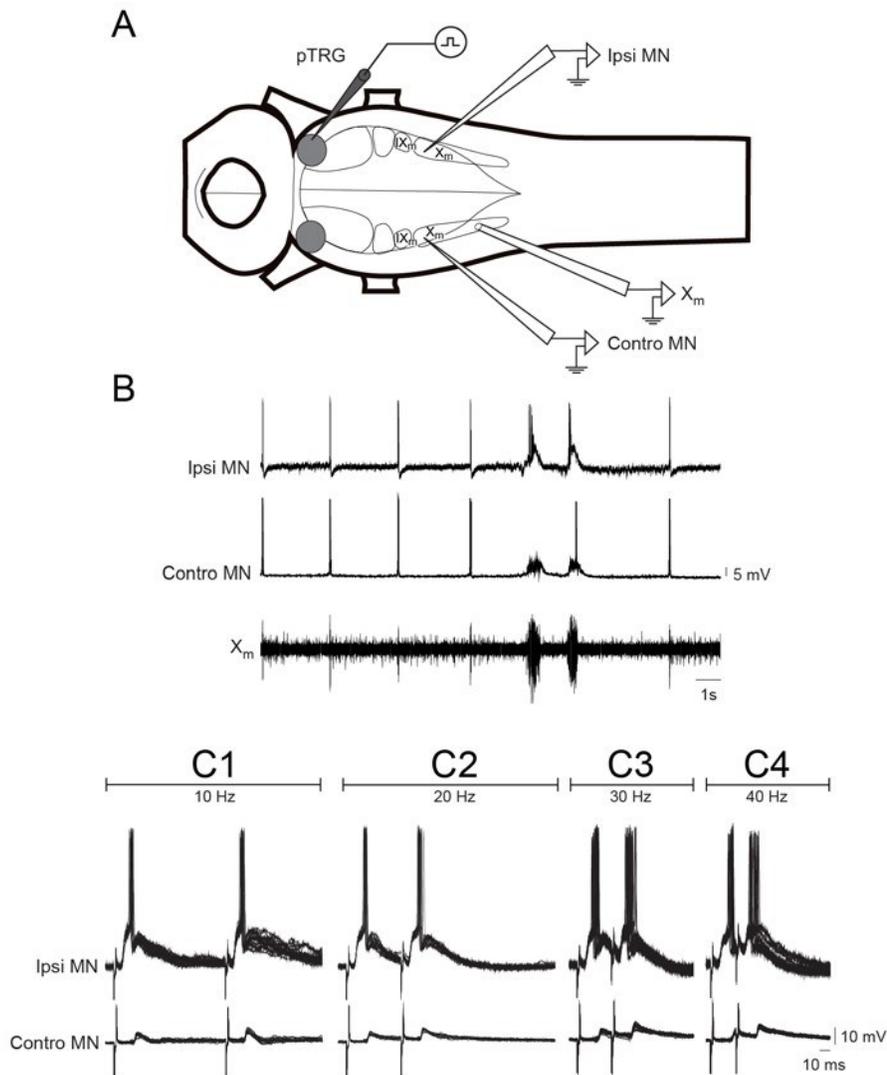
**Figure 14. Distribution des neurones marqués dans le pTRG après une injection de traceurs dans le pTRG et la région des motoneurones respiratoires du même côté.** A: Schéma d'une vue dorsale du rhombencéphale illustrant le niveau rostro-caudal des sections transverses montré en B et les sites d'injection des traceurs. Les lignes 1-3 et 4 illustrent respectivement le niveau des coupes à la hauteur du pTRG et dans la région des motoneurones respiratoires. B : Coupes transverses schématisées d'une préparation ayant reçu une injection dans le pTRG et dans les motoneurones respiratoires du même côté. Les points illustrés sur chaque coupe représentent les neurones marqués provenant de trois coupes adjacentes et mises en commun. Chaque point représente une cellule marquée. Les neurones doublement marqués apparaissent en bleu.

B) *Caractérisation physiologique des projections du pTRG vers les motoneurones respiratoires*

a. *Bilatéralité*

Les expériences anatomiques montrent que des neurones du pTRG projettent vers les motoneurones respiratoires des deux côtés du cerveau. Pour évaluer la fonctionnalité des projections descendantes du pTRG vers les motoneurones, des enregistrements intracellulaires des motoneurones respiratoires pendant la stimulation électrique de la région du pTRG ont été réalisés. À cet effet, des intensités de stimulations croissantes (1-10  $\mu$ A), sous-liminaires au déclenchement de potentiels d'action ont été utilisées. Tous les motoneurones enregistrés ont démontré des PPSEs de grande amplitude en réponse aux stimulations du pTRG ipsi- ou controlatéral. Cependant, la latence d'apparition des PPSEs a été plus longue pour les stimulations du pTRG controlatéral ( $10.2 \pm 3.8$  vs.  $7.4 \pm 4.0$  ms; test-t apparié;  $P < 0.05$ ;  $n = 4$  animaux). L'amplitude maximale de la réponse a aussi été légèrement plus élevée pour les stimulations controlatérales ( $1.35 \pm 0.57$  vs.  $1.07 \pm 0.23$  mV/ms; test-t apparié;  $P < 0.05$ ;  $n = 4$  animaux).

Nous avons ensuite déterminé si les motoneurones respiratoires situés des deux côtés recevaient un input exciteur du pTRG d'un seul côté. Le pTRG d'un côté a donc été stimulé électriquement pendant l'enregistrement intracellulaire simultané de deux motoneurones respiratoires du  $X_m$  situés de part et d'autre du cerveau (Fig. 14;  $n = 2$  animaux). Comme les expériences précédentes, la latence des PPSEs a été plus longue dans le motoneurone controlatéral à la stimulation ( $13.7 \pm 3.1$  vs.  $4.8 \pm 0.6$  ms; test-t bilatéral;  $P < 0.001$ ;  $n = 2$  animaux) (Fig. 14 C1-C4). De plus, les PPSEs enregistrés simultanément dans les deux motoneurones pouvaient suivre une cadence imposée par des stimulations de hautes fréquences (10-40 Hz, Fig. 14 C1-C4). Ces résultats confirment que le pTRG d'un côté est en mesure d'activer les motoneurones respiratoires des deux côtés et que ces connexions sont robustes et efficaces.

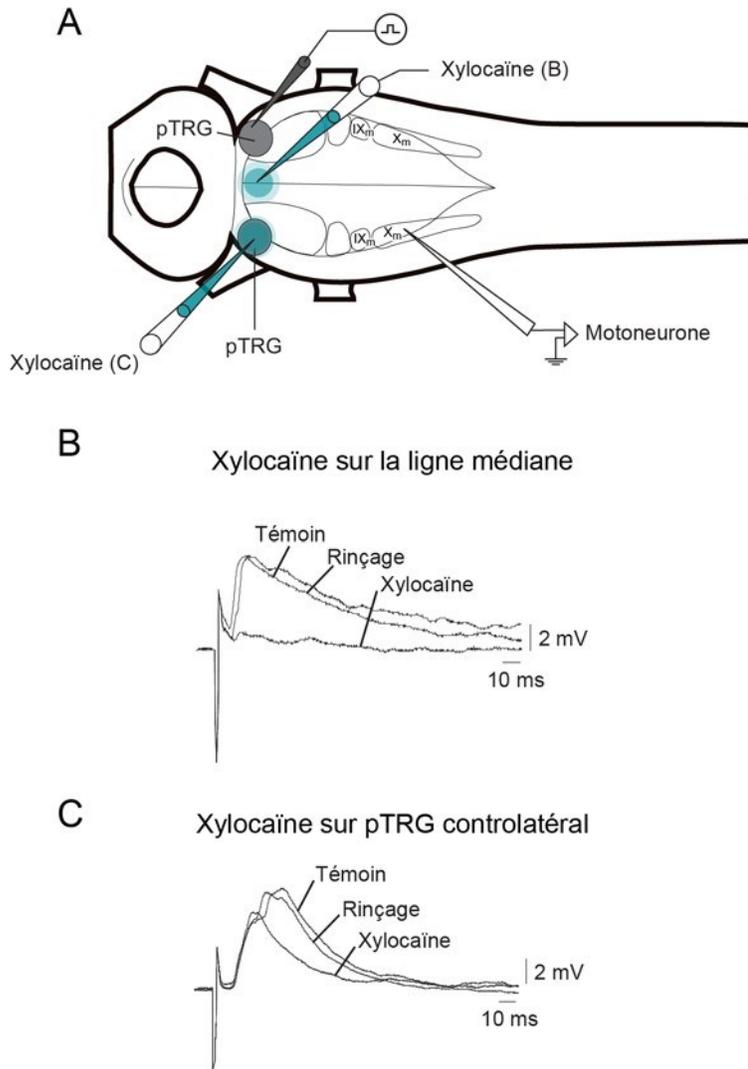


**Figure 15. Inputs descendants du pTRG vers les motoneurones respiratoires.** A : Schéma du tronc cérébral de la lamproie. L'enregistrement simultané d'un motoneurone respiratoire de chaque côté du cerveau est illustré par les deux électrodes situées au niveau du X<sub>m</sub>. L'électrode de stimulation est placée dans le pTRG d'un côté. B : Enregistrement de l'activité respiratoire spontanée dans deux motoneurones (MN) de chaque côté du cerveau. Les enregistrements intracellulaires (2 traces du haut) des bouffées respiratoires sont en phase avec celles enregistrées de manière extracellulaire (trace du bas) à partir des motoneurones respiratoires du noyau moteur du nerf vague (X<sub>m</sub>). C1-C4 : Réponse excitatrice enregistrée de manière intracellulaire en réponse à une double stimulation augmentant en fréquence (C1, C2, C3 et C4 correspondent respectivement à 10, 20, 30 et 40 Hz). IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; MN, motoneurone; X<sub>m</sub>, noyau moteur du nerf vague; ipsi, ipsilatéral; contro, controlatéral.

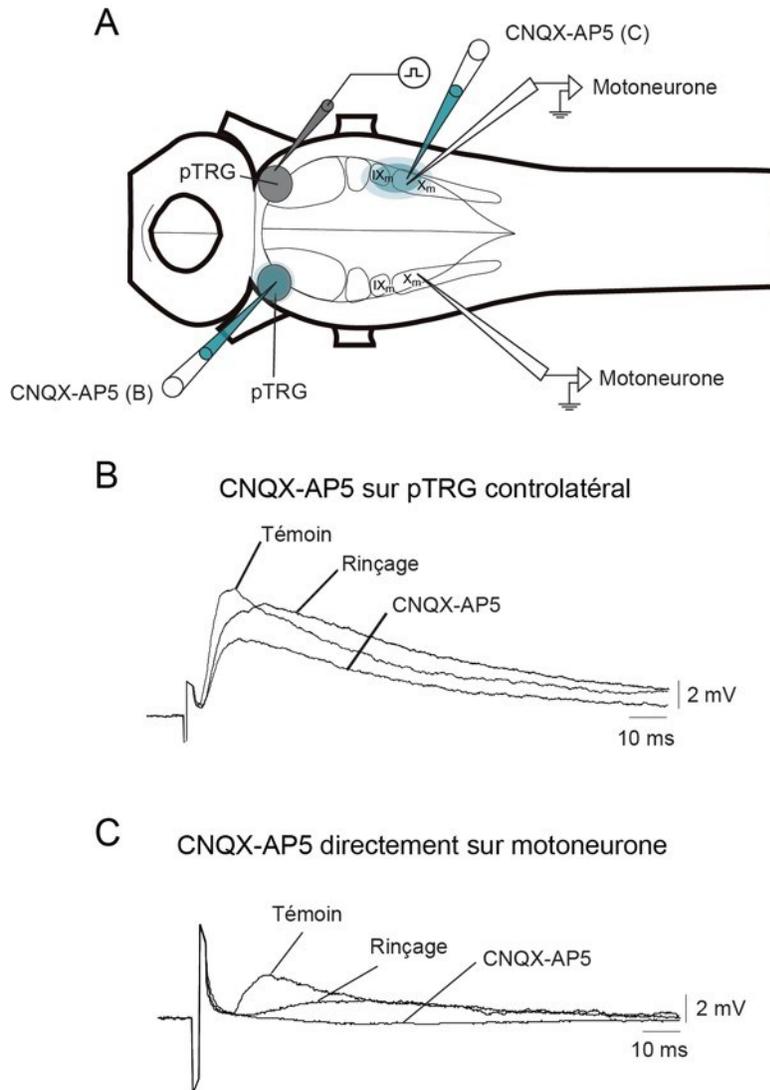
b. *Trajectoire des projections descendantes du pTRG*

Les expériences anatomiques démontrent que deux populations de neurones dans la région du pTRG envoient des projections vers les motoneurones respiratoires des deux côtés. Les expériences physiologiques montrent aussi que les motoneurones respiratoires des deux côtés reçoivent des inputs du pTRG, mais la trajectoire des axones descendants est inconnue. Pour localiser ces projections issues du pTRG vers les motoneurones, nous avons effectué des micro-injections de Xylocaïne, un bloqueur des canaux sodiques responsables du déclenchement du potentiel d'action. Une première série d'expériences a consisté à stimuler électriquement le pTRG d'un côté en enregistrant de façon intracellulaire un motoneurone respiratoire de l'autre côté. Sachant que les fibres commissurales du pTRG croisent la ligne médiane au niveau de  $V_m$  (*cf.* section A), de la Xylocaïne a été injectée à cet endroit (Fig. 15A). Ces injections ont eu pour effet d'atténuer de manière importante l'aire des PPSEs enregistrés dans les motoneurones respiratoires (Fig. 15B ;  $60.6 \pm 22.5\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P < 0.05$ ;  $n = 7$  animaux;). Après une période de récupération, l'aire des PPSEs est revenue à des tailles similaires à celles observées lors de la situation témoin (Fig. 15B;  $77.1 \pm 27.9\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P > 0.05$ ). Avec le même positionnement des électrodes de stimulation et d'enregistrement, des injections de Xylocaïne ont cette fois été faites dans le pTRG controlatéral à la stimulation. Encore une fois, ces injections ont engendré des diminutions importantes de la taille des PPSEs dans les motoneurones enregistrés (Fig. 15C;  $47.0 \pm 19.8\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$  animaux). Après une période de récupération, les PPSEs sont revenus à des tailles similaires à celles observées lors de la situation témoin (Fig. 15C;  $95.5 \pm 49.7\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P > 0.05$ ).

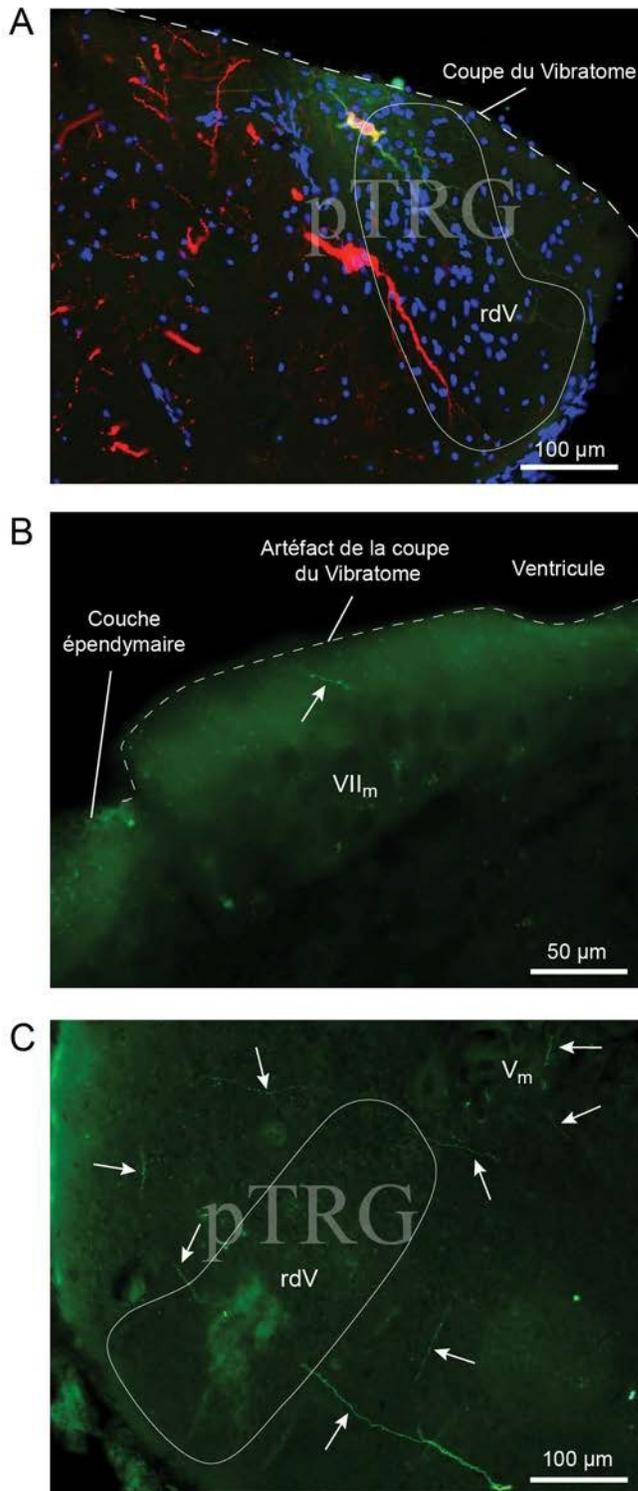
Afin d'inactiver les connexions synaptiques entre les deux pTRGs, un cocktail de CNQX et d'AP-5 a été injecté dans le pTRG controlatéral à celui stimulé (Fig. 16). Comme pour la Xylocaïne, ces injections ont également engendré une diminution notable de l'aire des PPSEs dans les motoneurones respiratoires controlatéraux à la stimulation (Fig. 16B;  $59.5 \pm 20.3\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P < 0.05$ ;  $n = 4$  animaux). Ces résultats indiquent que les axones commissuraux du pTRG croisent la ligne médiane au niveau de  $V_m$  et qu'une partie de ces projections rejoignent ensuite les motoneurones, alors que l'autre partie fait relai dans le pTRG opposé.



**Figure 16. Effet des injections de Xylocaine sur les connexions descendantes du pTRG vers les motoneurones respiratoires.** A : Schéma du tronc cérébral isolé de lamproie avec le positionnement des pipettes d'injection, de stimulation et d'enregistrement. B : PPSEs enregistrés dans un motoneurone respiratoire en réponse aux stimulations électriques du pTRG controlatéral. De la Xylocaine a été appliquée le long de la ligne médiane au niveau de  $V_m$ . C : PPSEs enregistrés dans un motoneurone respiratoire en réponse aux stimulations électriques du pTRG controlatéral. De la Xylocaine a été appliquée dans le pTRG ipsilatéral à l'enregistrement.

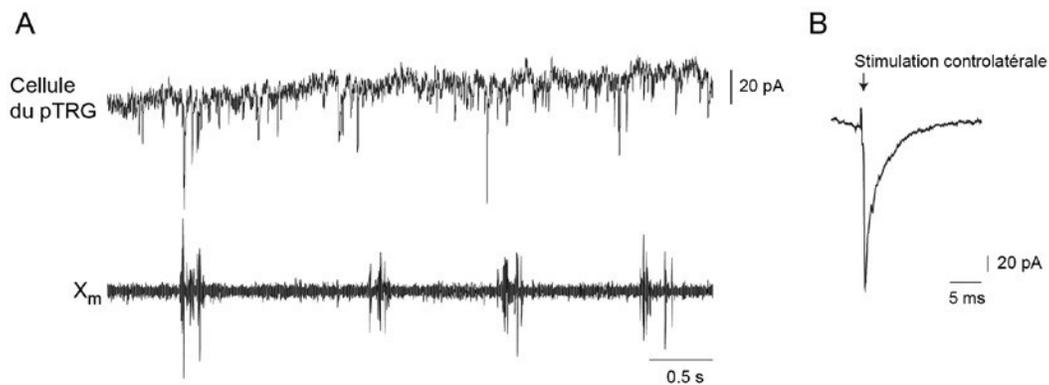


**Figure 17. Effets des antagonistes glutamergiques sur les connexions descendantes du pTRG vers les motoneurones respiratoires.** A : Schéma du tronc cérébral de lamproie avec le positionnement des pipettes d'injection, de stimulation et d'enregistrement. B : PPSEs enregistrés dans un motoneurone respiratoire en réponse aux stimulations électriques du pTRG controlatéral. Du CNQX (1 mM) et de l'AP-5 (500  $\mu$ M) ont été injectés dans le pTRG ipsilatéral à l'enregistrement. C : enregistrement d'un motoneurone respiratoire durant la stimulation du pTRG ipsilatéral. Du CNQX/AP-5 a été injecté directement au-dessus du motoneurone enregistré. ipsi, ipsilatéral; contra, controlatéral.



**Figure 18. Localisation d'un neurone respiratoire enregistré dans le pTRG.** A : superposition de 3 photomicrographies d'un neurone du pTRG enregistré en patch. Le neurone a été rempli de biocytine (vert) et marqué rétrogradement par une injection de dextran amines (rouge) dans le noyau X. Le marquage au DAPI (bleu) démontre la localisation de l'ADN du noyau de la cellule. B : photomicrographies démontrant des branches axonales du neurone du pTRG innervant le noyau moteur facial (VII) ipsilatéral. C : photomicrographies démontrant des branches axonales du neurone du pTRG innervant le pTRG controlatéral. Les flèches blanches indiquent les branches axonales. VII<sub>m</sub> : noyau moteur facial ; rdV, racine descendante du nerf trijumeau ; V<sub>m</sub> : noyau moteur du nerf trijumeau.

Enfin, le même cocktail de CNQX et d'AP-5 a cette fois été employé afin de déterminer la nature des connexions entre le pTRG et les motoneurones respiratoires. Des micro-injections de ce mélange ont été réalisées au niveau des noyaux moteurs IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub> alors que le pTRG du même côté était stimulé. Ces injections ont entraîné l'abolition de leur activité respiratoire telle qu'enregistrée de façon extracellulaire. En intracellulaire, les injections directement sur les motoneurones enregistrés ont engendré de larges réductions de la taille des PPSEs et même parfois une abolition des réponses aux stimulations du pTRG du même côté (Fig. 16C;  $70.2 \pm 30.2\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P < 0.05$ ;  $n = 7$  animaux). Après une période de récupération, la taille des PPSEs est revenue près des valeurs observées durant la situation témoin ( $84.06 \pm 24.7\%$ ; ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P > 0.05$ ).

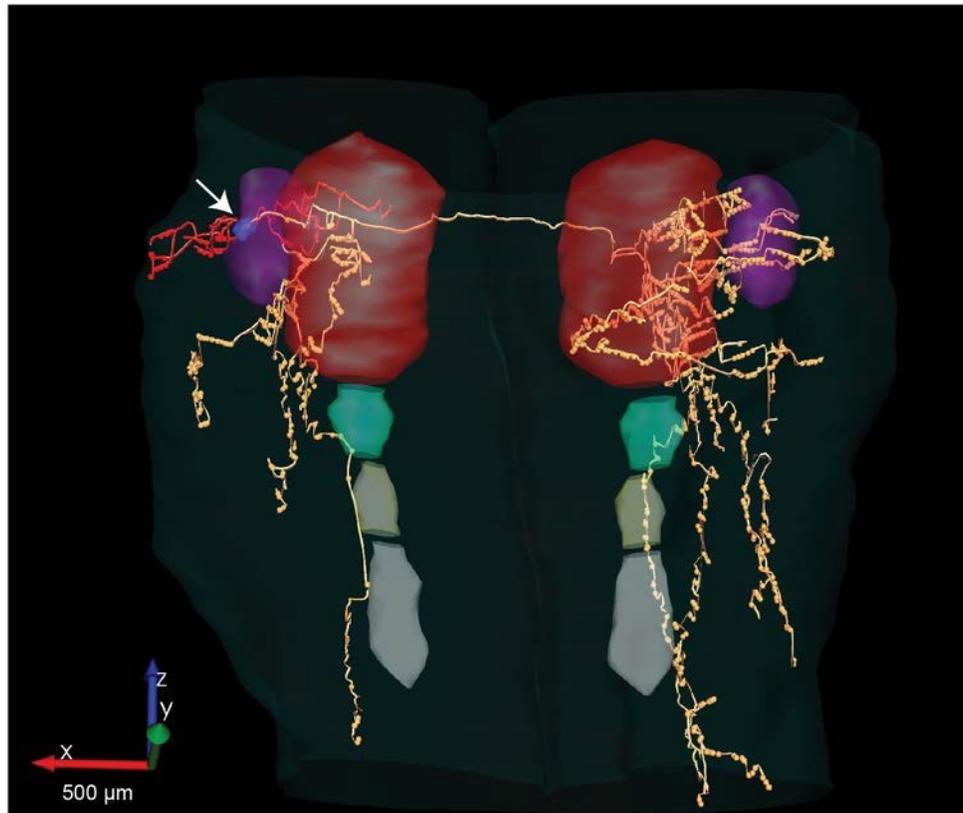


**Figure 19. Enregistrement de patch des cellules du pTRG.** A : Enregistrement intracellulaire en patch. Le neurone démontre des courants entrants en phase avec l'activité respiratoire enregistrée sur le noyau moteur du vague (X<sub>m</sub>). B : Moyenne des courants entrants produits par la stimulation électrique du pTRG controlatéral.

Les expériences anatomiques précédentes ont révélé que la région du pTRG comprend des neurones projetant vers leurs homologues controlatéraux ainsi qu'aux motoneurones respiratoires des deux côtés. Toutefois, les projections des neurones demeurent inconnues. Pour répondre à cette question, une préparation de tronc cérébral isolé de la lamproie a été modifiée afin de pouvoir utiliser la technique d'enregistrement et de marquage intracellulaire de « patch ». Il s'agit de la même préparation *in vitro* que les expériences physiologiques précédentes, mais certaines structures du rhombencéphale dorsal ont été retirées délicatement à l'aide d'un vibratome, pour accéder aux neurones du pTRG : la plaque alaire au niveau de  $V_m$ , la partie dorsale de  $V_m$ , la région isthmique dorsale ainsi que le tectum optique (Fig. 17). Les neurones du pTRG ont d'abord été marqués rétrogradement par des injections dans les pools de motoneurones respiratoires (marquage rouge, Fig. 17). Les neurones du pTRG marqués rétrogradement et enregistrés avec la méthode de « patch » ont montré des courants entrants rythmiques précédant les bouffées respiratoires enregistrées extracellulairement sur les motoneurones respiratoires (Fig. 5A,18A). Ils ont également démontré de larges courants entrants lorsque le pTRG du côté opposé était stimulé (Fig. 18B).

Ces mêmes neurones du pTRG ont de plus été marqués avec un deuxième traceur (marquage vert, Fig. 17) pendant la phase d'enregistrement, ce qui a permis de visualiser leurs projections individuellement. On a ainsi pu constater que la plupart des neurones possédaient des projections controlatérales vers l'autre pTRG, ainsi que des projections bilatérales vers les motoneurones respiratoires des noyaux moteurs  $VII_m$ ,  $IX_m$  et  $X_m$  (Figs. 17, 19;  $n = 8$  animaux ; Tableau 1). Ces résultats confirment que les projections de neurones individuels du pTRG sont similaires aux patrons de projections des différentes populations de neurones du pTRG que nous avons observées lors des expériences anatomiques précédentes. De plus, ces résultats

démontrent également qu'un neurone du pTRG peut posséder ces trois types de projections à la fois. Un neurone peut donc à la fois projeter au pTRG et aux motoneurones respiratoires des deux côtés.



**Figure 20. Reconstruction 3D d'un neurone du pTRG.** Projections axonales d'un neurone du pTRG (flèche blanche), enregistré de manière intracellulaire (Fig. 18). Les varicosités et les dendrites sont représentées par des cercles. Le diamètre des axones, des dendrites et des corps cellulaires a été augmenté pour une meilleure visibilité. Dendrites, arborisation rouge ; Corps cellulaires, bleu ; axones, jaune ;  $V_m$ , rouge ;  $VII_m$ , bleu pâle ;  $IX_m$ , jaune pâle ;  $X_m$ , gris pâle ; pTRG, violet.

| Neuron no. | c. pTRG | iVII | iiX | iX | cVII | ciX | cX |
|------------|---------|------|-----|----|------|-----|----|
| 01         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |
| 02         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |
| 03         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |
| 04         |         | ✓    | ✓   | ✓  |      |     |    |
| 05         | ✓       |      |     |    | ✓    | ✓   | ✓  |
| 06         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |
| 07         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |
| 08         | ✓       | ✓    | ✓   | ✓  | ✓    | ✓   | ✓  |

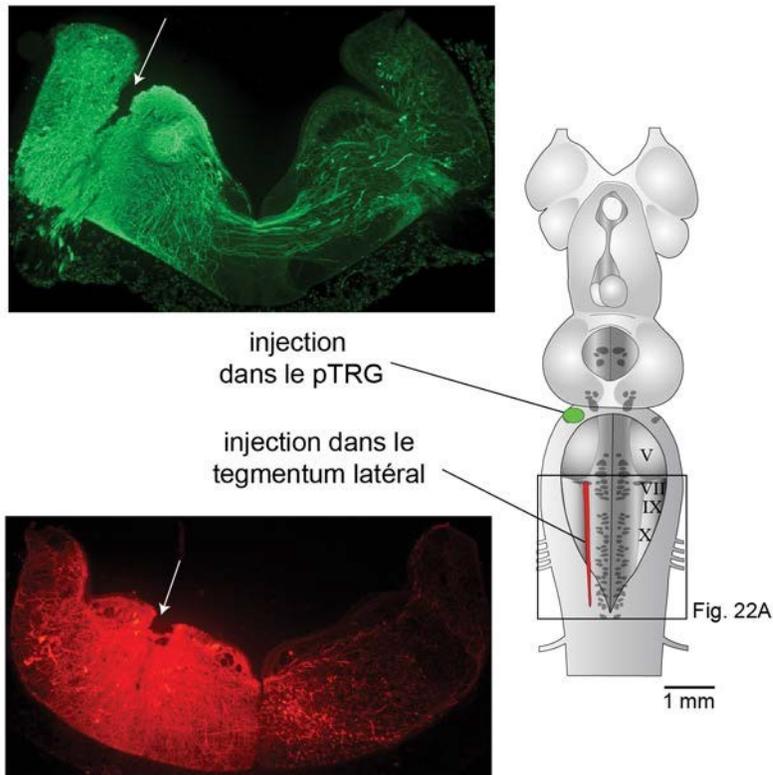
**Tableau 1. Résumé des projections des neurones enregistrés dans le pTRG.** Un crochet indique la présence d’au moins une branche contenant des varicosités dans la structure, ou autour des dendrites des neurones localisés dans la structure. pTRG, groupe respiratoire paratrigéminal; VII, noyau facial; IX, noyau glossopharyngien; X, noyau vague; i. ipsilatéral; c, controlatéral.

### Connectivité des réseaux neuronaux responsables du rythme respiratoire lent

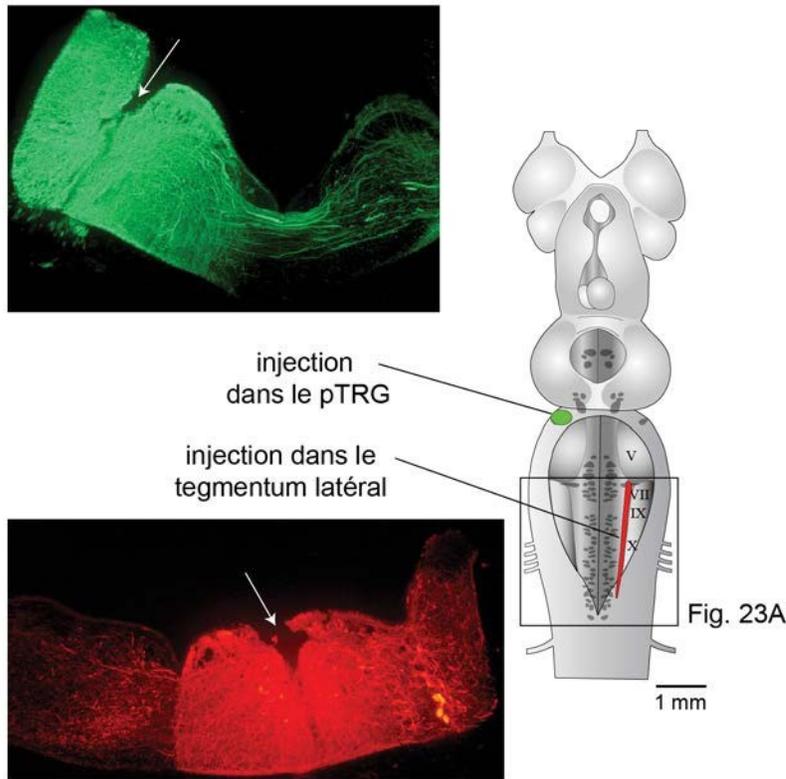
Les travaux de Martel et al. (2007) ont démontré que le rythme respiratoire lent, caractérisé par de longues bouffées de décharge (période moyenne de  $102 \pm 114$  sec et une durée de décharge moyenne de  $506 \pm 174$  ms), peut être enregistré au-dessus des motoneurones respiratoires, dans la partie caudale du rhombencéphale. Le rythme lent ne dépend pas du rythme rapide puisqu’il persiste après une section transverse complète du rhombencéphale sous  $V_m$ , ce qui l’isole complètement du pTRG. Ceci suggère que le rythme respiratoire lent provient de neurones localisés dans la partie caudale du rhombencéphale, d’où son appellation « groupe respiratoire caudal » (CRG). Afin d’identifier les neurones responsables de générer le rythme lent, des expériences de marquage rétrograde ont d’abord été réalisées.

A) *Localisation et organisation des neurones du CRG*

Des injections de dextran amines couplées au fluorophore Texas Red le long des motoneurones ont été combinées à des injections de biocytine dans le pTRG (n = 4 animaux) (Fig. 20,21).

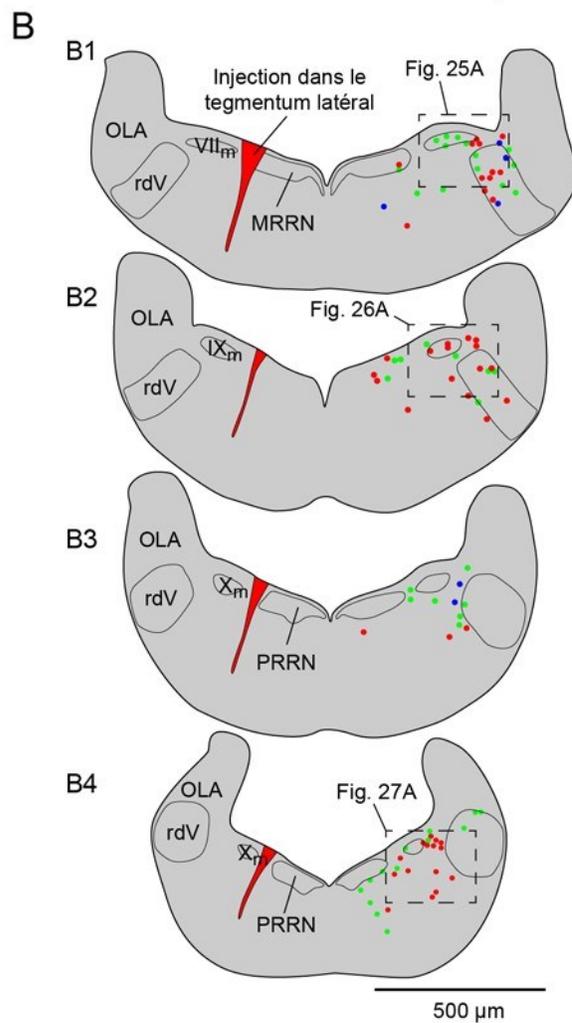
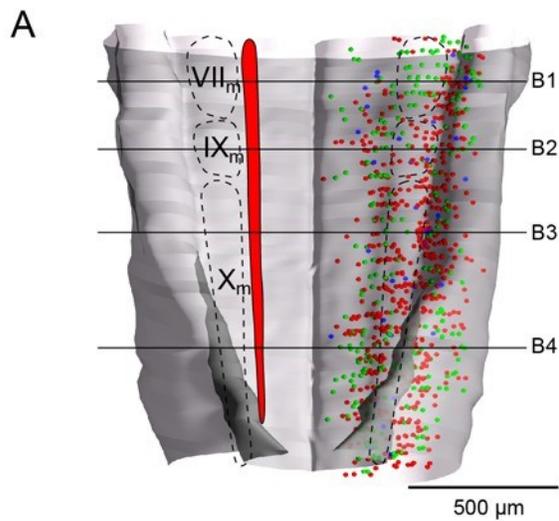


**Figure 21. Sites d'injection des traceurs anatomiques dans le pTRG et dans la partie caudale du rhombencéphale du même côté. Schéma de la vue dorsale d'un cerveau entier de lamproie illustrant un site d'injection dans le pTRG (vert) et une injection longitudinale dans la partie caudale du rhombencéphale (rouge).**

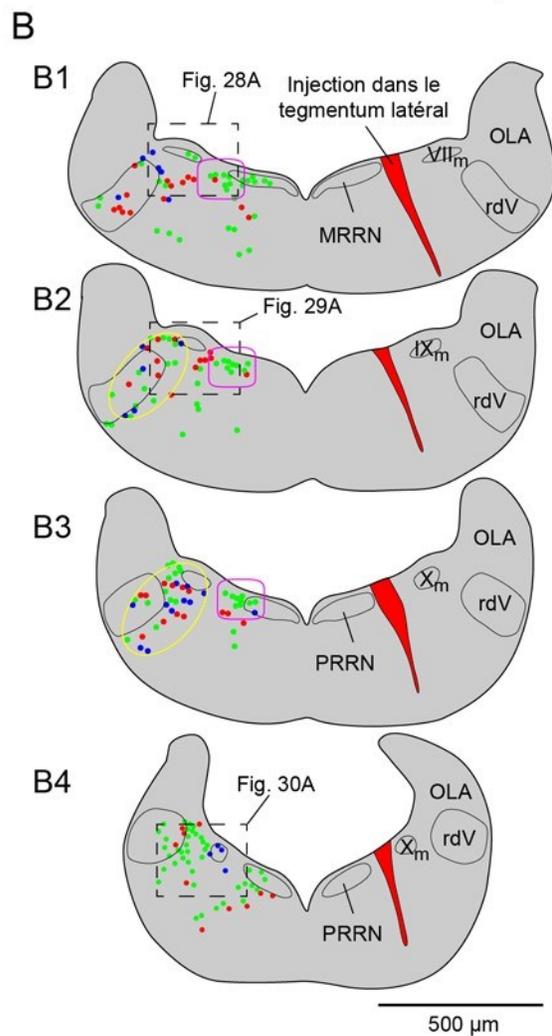
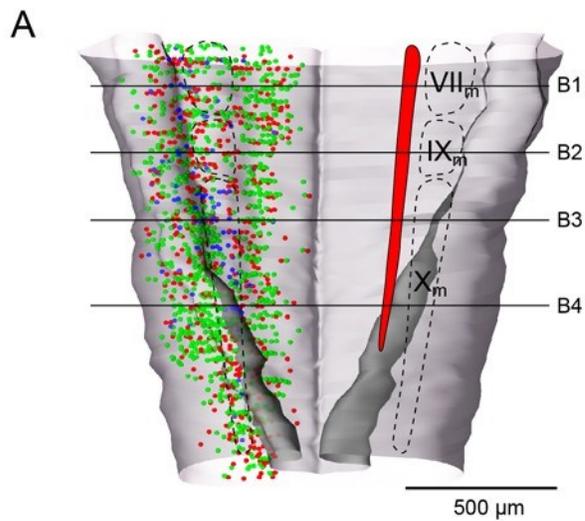


**Figure 22. Sites d'injections des traceurs anatomiques dans le pTRG et dans la partie caudale du rhombencéphale du côté opposé. Schéma d'un cerveau entier de lamproie illustrant un site d'injection dans le pTRG (vert) et une injection longitudinale dans la partie caudale du rhombencéphale (rouge).**

Les injections de dextran amines couplées au Texas Red dans le tegmentum latéral du rhombencéphale caudal ont marqué des neurones du côté opposé du cerveau dans la partie médiane et latérale du tegmentum, dans la région du rdV près du sulcus limitans et à travers, ou à proximité, des noyaux moteurs respiratoires VII<sub>m</sub>, IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub> (points rouges dans Figs. 22 et 24; neurones rouges dans Figs. 25-30). Des cellules marquées ont également été observées dans la région octavolatérale (OLA), mais cette dernière n'a pas été incluse dans l'analyse, car ces cellules ne sont pas susceptibles de participer à la genèse du rythme respiratoire lent. Les axones commissuraux des cellules marquées dans OLA passent au niveau du tegmentum ventral et peuvent avoir été lésés par les injections profondes dans le rhombencéphale caudal.



**Figure 23. Distribution des neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG et vers le tegmentum latéral controlatéraux (voir Fig. 20). A : Reconstruction 3D de la partie caudale du rhombencéphale comprenant les neurones projetant seulement au pTRG (vert), au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et aux deux régions à la fois (bleu). B : Schéma des sections transverses dans la partie caudale du rhombencéphale aux niveaux indiqués en A. Le code de couleur en B est le même qu'en A.**



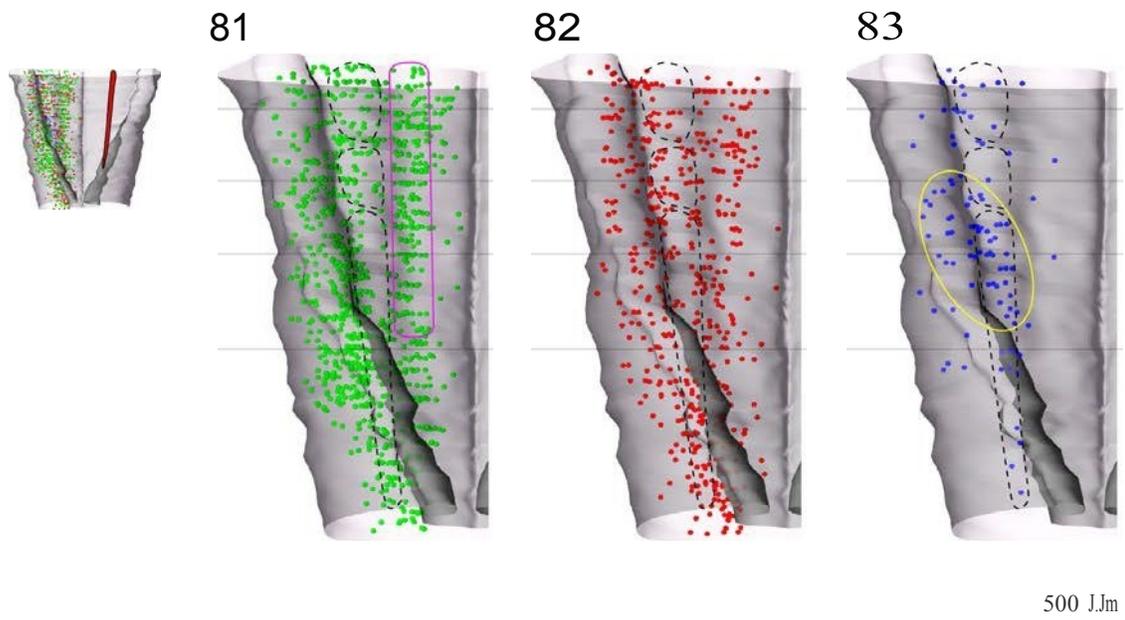
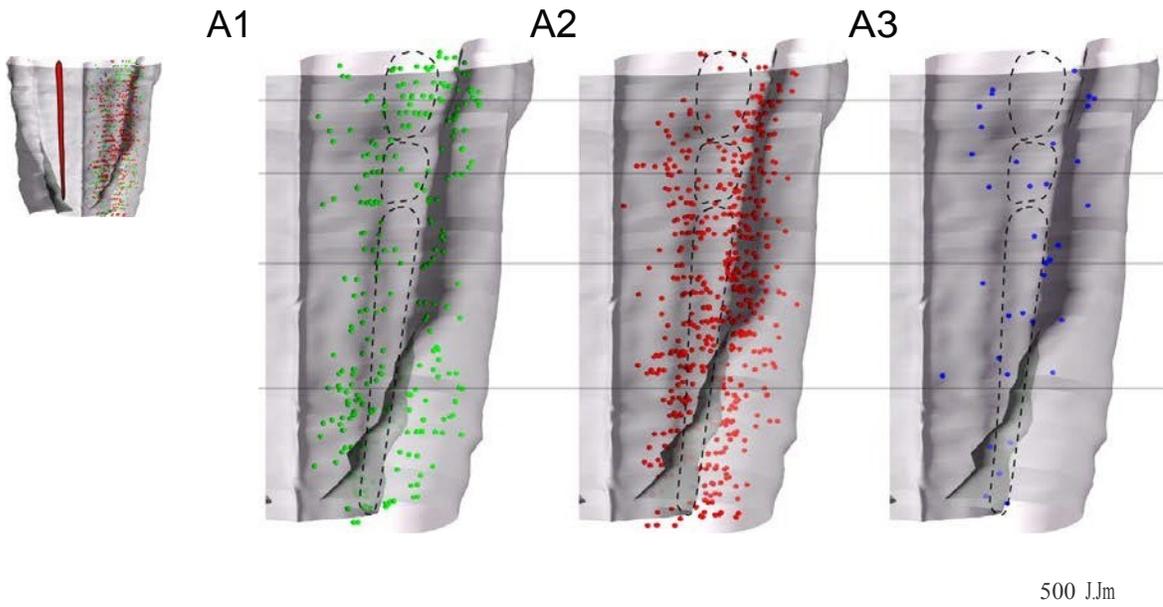
**Figure 24. Localisation et distribution des neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG ipsilatéral et vers le tegmentum latéral controlatéral (voir Fig. 21).**

A : Reconstruction 3D de la partie caudale du rhombencéphale comprenant les neurones projetant seulement au pTRG ipsilatéral (vert), au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et aux deux régions à la fois (bleu).

B : Schéma des sections transverses dans la partie caudale du rhombencéphale aux niveaux indiqués en A. Le code de couleur en B est le même qu'en A.

En règle générale, les injections dans le pTRG ont marqué davantage de neurones du côté ipsilatéral que du côté controlatéral à l'injection (Fig. 24, points verts en A1 et B1). Par contre, quelques différences ont été observées malgré une distribution similaire.

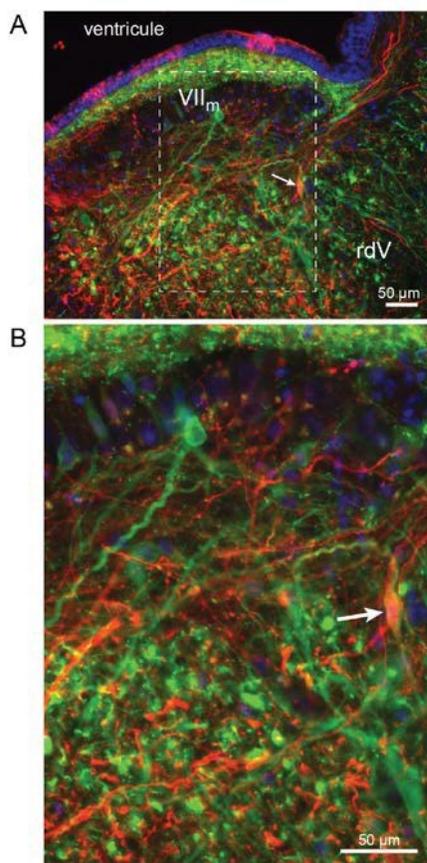
Premièrement, une population de grands neurones, localisés entre les motoneurones respiratoires et les cellules réticulospinales dans le MRRN et le PRRN ont seulement été marqués du côté ipsilatéral aux injections (voir encadré mauve dans les Figs. 23, 24 et 29). De plus, peu de neurones ont été observés à proximité des noyaux moteurs du IX et du X du côté controlatéral aux injections dans le pTRG, alors qu'ils étaient nombreux à proximité du noyau moteur du VII des deux côtés (Fig. 24, A1 et B1). Les injections unilatérales de biocytine dans le pTRG ont identifié des neurones des deux côtés du cerveau dans le tegmentum latéral, dans la région du rdV près du sulcus limitans et à proximité des motoneurones respiratoires (Figs. 25-30), dans des endroits semblables à ceux où des neurones ont été trouvés suivant les injections dans le tegmentum du rhombencéphale caudal.



**Figure 25. Distribution des trois types de populations de neurones dans la partie caudale du rhombencéphale projetant au pTRG et vers le tegmentum latéral controlatéral.** A1-A3: Distribution des neurones projetant au pTRG (vert), au tegmentum controlatéral (rouge) et aux deux régions à la fois (bleu) montrées individuellement, après à une injection de traceurs anatomiques dans le pTRG et le tegmentum latéral du même côté (voir aussi Fig. 20). B1-B3: Distribution des neurones projetant au pTRG (vert), au tegmentum controlatéral (rouge) et aux deux régions à la fois (bleu) montrées individuellement, après à une injection de traceurs anatomiques dans le pTRG et le tegmentum latéral du côté opposé (voir aussi Fig. 21). Noter la concentration de neurones bleus à l'intérieur du trait ovale jaune au niveau de la partie rostrale du noyau X<sub>m</sub> et caudale du noyau IX<sub>m</sub>. Le trait mauve délimite la population de neurones rétrogradement marqués entre les motoneurones et les cellules réticulospinales.

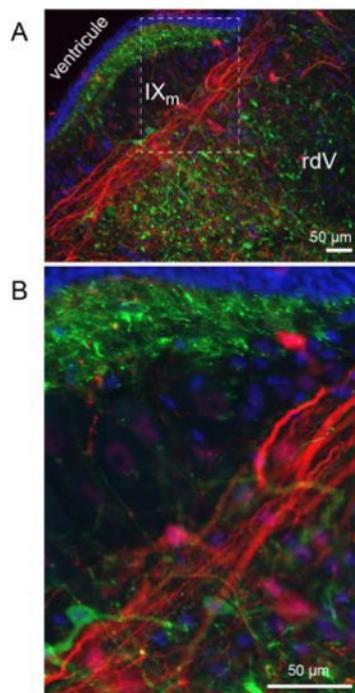
De plus, beaucoup de neurones ont été doublement marqués par les injections de traceurs dans un pTRG et dans le tegmentum latéral ipsi-, ou controlatéral, à ce dernier. Les neurones doublement marqués étaient particulièrement nombreux du côté des injections dans le pTRG (comparer Figs. 22, 23 et 24), notamment dans la région du tegmentum latérale et dans celle du rdV, au niveau de la partie rostrale du noyau moteur du X et caudal du IX (structure jaune dans les Figs. 23, 24 et 29). Les animaux témoins n'ayant reçu que des injections dans le pTRG ont également démontré de larges populations de neurones rétrogradement marqués du côté ipsilatéral aux injections.

Les résultats anatomiques démontrent que les neurones potentiellement responsables de générer le rythme lent sont distribués dans le rhombencéphale caudal. Les neurones sont distribués sans organisation précise, à l'exception de la région du tegmentum latéral au niveau de la partie rostrale du noyau moteur du X et la partie caudale de celle du IX<sub>m</sub>. Une agglomération de neurones projetant à la fois au pTRG et du côté opposé peut y être observée.



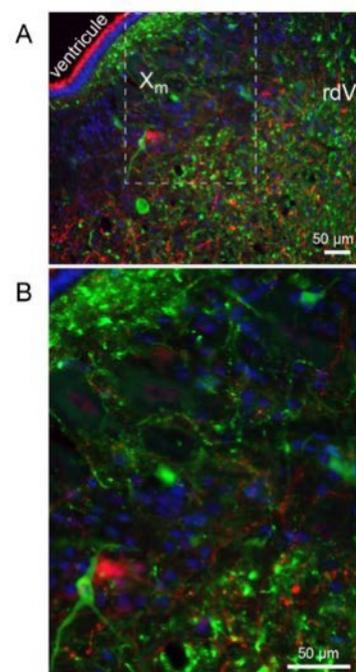
**Figure 26. Neurones rétromarqués dans le noyau facial ( $VII_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20).**

A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert), de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et d'un neurone projetant aux deux régions (flèche blanche). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.



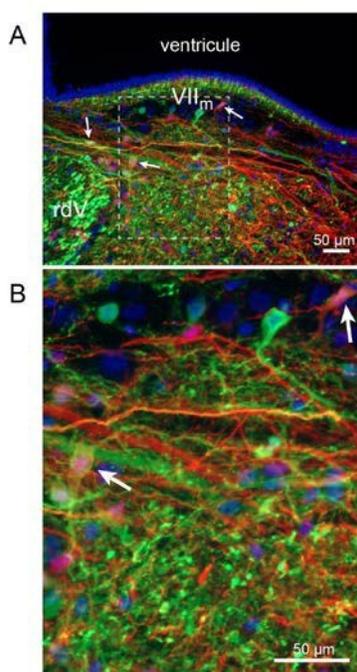
**Figure 27. Neurones rétromarqués dans le noyau glossopharyngien ( $IX_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20).**

A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert) et de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.

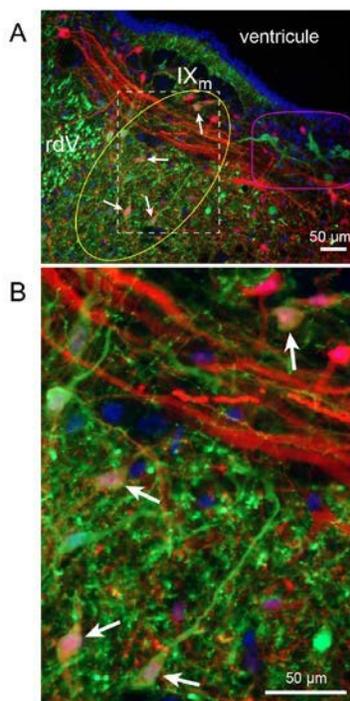


**Figure 28. Neurones rétromarqués dans le noyau vague ( $X_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG et le tegmentum ventral du même côté (voir Fig. 20).**

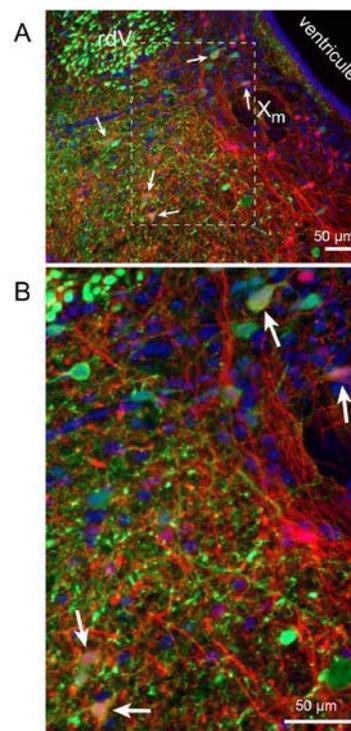
A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert) et de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.



**Figure 29. Neurones rétromarqués dans le noyau facial ( $VII_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert), de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et de neurones projetant aux deux régions (flèches blanches). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.**



**Figure 30. Neurones rétromarqués dans le noyau glossopharyngien ( $IX_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert), de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et de neurones projetant aux deux régions (flèches blanches). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.**



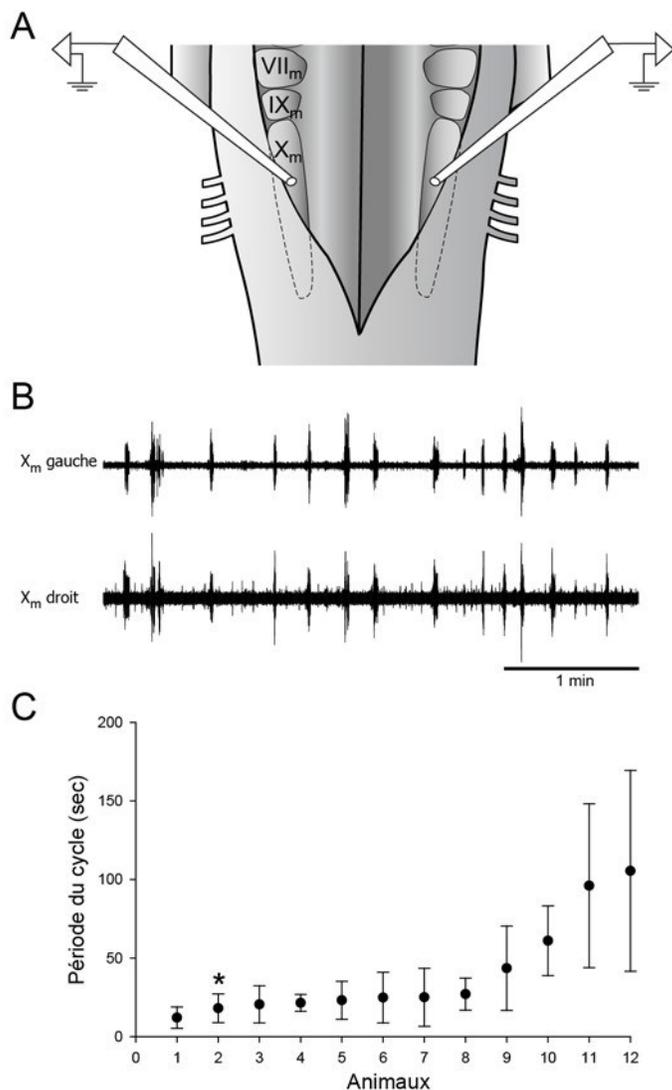
**Figure 31. Neurones rétromarqués dans le noyau vague ( $X_m$ ) après une injection de traceurs dans le pTRG ipsilatéral et dans le tegmentum latéral du côté opposé (voir Fig. 21). A : Exemple de photomicrographie de neurones projetant au pTRG (vert), de neurones projetant au tegmentum latéral controlatéral (rouge) et de neurones projetant aux deux régions (flèches blanches). B : Agrandissement de la partie délimitée par un trait pointillé en A.**

## B) Organisation fonctionnelle *du CRG*

Les expériences anatomiques ont montré que trois populations de neurones, distribuées à proximité des pools de motoneurones respiratoires des deux côtés, sont rétromarquées par une injection dans le pTRG de même que par une injection longitudinale dans le tegmentum latéral, entre les motoneurones et les cellules réticulospinales (voir Figs. 22, 23). De ces populations, une projette vers le tegmentum controlatéral, une deuxième projette vers le pTRG et une troisième projette à la fois vers le tegmentum controlatéral et le pTRG. Cette dernière population, surtout dans le cas d'injections de côtés opposés (Fig. 23 et 24B, trait ovale jaune), est principalement concentrée dans la partie rostrale du  $X_m$ .

### a. *Activation des neurones du CRG*

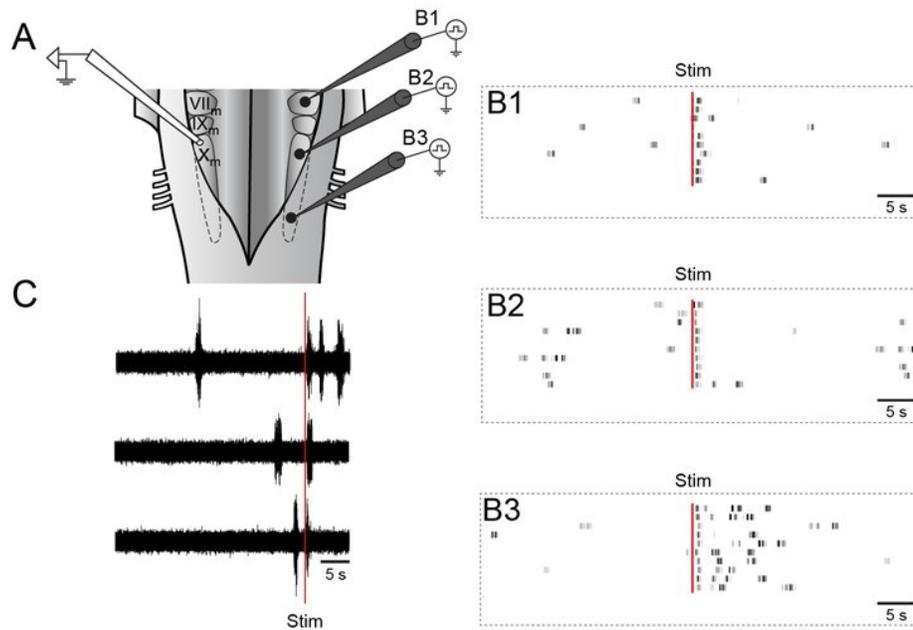
Afin d'identifier les régions susceptibles de générer les bouffées du rythme respiratoire lent dans le rhombencéphale caudal, une préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro* a été utilisée (*cf.* méthodologie). Dans ce type de préparation, seul le rythme respiratoire lent persiste et les réseaux nerveux du CRG ne peuvent bénéficier de l'influence des entrées descendantes du pTRG (Martel et al., 2007; Rovainen, 1985), ainsi que des influx modulateurs de la respiration provenant de la MLR (Gariépy et al., 2012b). Les neurogrammes de la Figure 31 illustrent la synchronisation bilatérale du rythme respiratoire lent enregistré au-dessus des motoneurones respiratoires des deux côtés dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé. Dans ces expériences, la période moyenne des longues bouffées de décharges a été calculée à partir des dix premières bouffées suivant la transection au-dessus du  $VII_m$  ( $26.04 \pm 6.31$  sec; étendue de 12.02 - 60.97 sec,  $n = 12$  animaux) (Fig. 31C), pour s'assurer que les enregistrements soient faits avant que la santé de la préparation ne se détériore et que le rythme lent baisse en fréquence quelques temps après la lésion.



**Figure 32. Enregistrements extracellulaires du rythme respiratoire lent dans le rhombencéphale caudal.** A : Schéma de la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, illustrant la localisation des électrodes d'enregistrements extracellulaires des deux côtés. B : Exemple de tracés neurographiques des deux côtés du cerveau au niveau du X<sub>m</sub>. C : Graphique illustrant la période moyenne (sec) des cycles du rythme respiratoire lent pour 12 animaux. Les tracés neurographiques en B proviennent de l'animal 2 (\*). VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

Il est possible de déclencher de longues bouffées de décharges, très similaires aux bouffées observées lors du rythme lent, en stimulant le tegmentum latéral dans ce type de préparation. L'intensité seuil requise pour déclencher de telles longues bouffées de décharges controlatérales à la stimulation a été comparée pour trois différents sites à l'intérieur de la colonne de cellules rétro-marquées lors des expériences anatomiques précédentes. Les trois sites correspondent à la région rostrale (niveau du VII<sub>m</sub>), moyenne (niveau du X<sub>m</sub> rostral) et

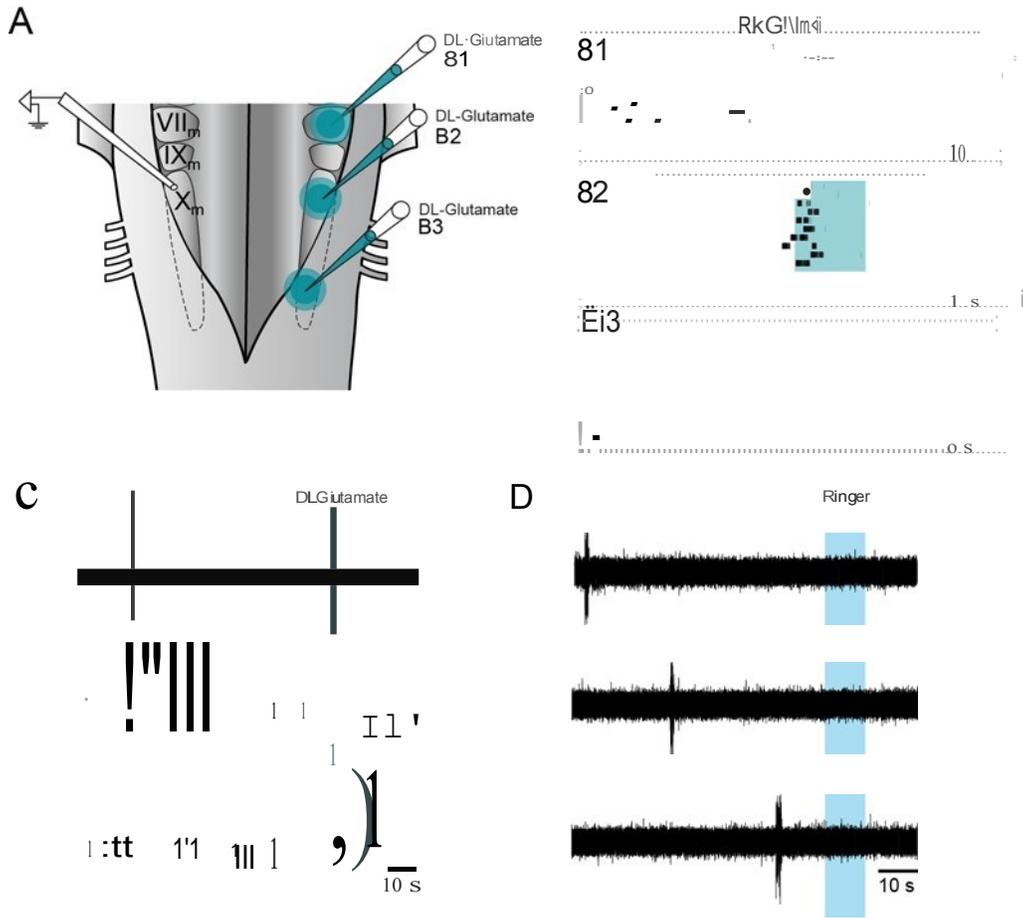
caudale (niveau du  $X_m$  caudal) de la colonne de cellules. Pour ce faire, les trois sites de la colonne de cellules rétro-marquées ont été stimulés électriquement pendant l'enregistrement extracellulaire des motoneurons du côté opposé au niveau du  $X_m$ . La stimulation de la partie rostrale ou caudale du  $X_m$  a produit de longues bouffées de décharges avec des intensités seuils respectives moyennes de  $3.5 \pm 0.87 \mu A$  et  $3.6 \pm 0.55 \mu A$ , ce qui est très similaire, alors que les stimulations dans la partie rostrale, au niveau du  $VII_m$ , ont requis une intensité seuil moyenne plus grande de  $5.6 \pm 0.82 \mu A$  (ANOVA unilatérale sur des mesures répétées;  $P = 0.004$ ). La méthode de comparaisons multiples Holm-Sidak a démontré des différences significatives entre les moyennes d'intensité seuil du  $VII_m$  avec la partie rostrale et caudale du  $X_m$ , ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$  animaux).



**Figure 33. Stimulations électriques le long des pools de motoneurones respiratoires.** A : Schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est montré à gauche, alors que les trois différents sites de stimulation sont représentés par les trois points noirs placés au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub>, de la partie rostrale du X<sub>m</sub> et de la partie caudale du X<sub>m</sub>. B1-B3 : Histogrammes de trames démontrant les réponses extracellulaires au niveau des motoneurones respiratoires du X<sub>m</sub> suivant les stimulations électriques (trois chocs de 5-9  $\mu$ A, 2 ms à une fréquence 30 Hz chaque 50-80 sec) du VII<sub>m</sub> (B1), de la partie rostrale (B2) et caudale (B3) du X<sub>m</sub>. Le début du train de stimulation (ligne verticale rouge) sert d'alignement pour les histogrammes. C : Tracés neurographiques provenant de trois épisodes de stimulations illustrés en B2. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

Nous avons déterminé empiriquement que la meilleure façon d'induire des bouffées de décharges typiques de celles du rythme lent était d'utiliser des trains de stimulation électrique (trois chocs de 5-9  $\mu$ A ; 2 ms ; 30 Hz ; à toutes les 50-80 sec). La présence de longues bouffées de décharges, suivant les épisodes de stimulation électrique, a été basée sur la comparaison entre le nombre de potentiels d'action 5 secondes précédant et suivant les stimulations. Les potentiels d'action détectés par le script de *réinitialisation du voltage intégré* (cf. Méthodologie) ont été analysés à cette fin. Les trains de stimulation électrique au niveau du VII<sub>m</sub> ont induit des longues bouffées de décharges dans les motoneurones respiratoires controlatéraux. Le nombre moyen de potentiels d'action était significativement plus élevé après les épisodes de stimulations ( $275.90 \pm 60.19$ ) qu'avant ceux-ci ( $10.90 \pm 17.39$ ; test-t apparié;  $P < 0.001$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour les stimulations de la partie rostrale du X<sub>m</sub>. Le script a détecté une moyenne de  $27.23 \pm 24.87$  potentiels d'action avant les stimulations comparativement à une moyenne de  $294.98 \pm 44.76$  potentiels d'action après (test-t apparié;  $P < 0.001$ ). Les épisodes de stimulation électrique au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub> ont eux aussi déclenché de longues bouffées de décharges. Une moyenne de  $9.23 \pm 10.81$  potentiels d'action a été détectée avant les stimulations comparativement à une

moyenne de  $306.90 \pm 44.44$  potentiels d'action après (test-t apparié;  $P < 0.001$ ;  $n = 8$  arùmaux) (Fig. 32).



**Figure 34. Éjections locales de DL-glutamate le long des pools de motoneurones respiratoires.** A1 : Schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est montré à gauche, alors que les trois différents sites d'injection pharmacologique sont représentés par les trois cercles turquoises placés au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub>, de la partie rostrale et caudale du X<sub>m</sub>. A2 : Histogrammes de trames démontrant les réponses extracellulaires au niveau des motoneurones respiratoires du VII<sub>m</sub>-IX<sub>m</sub> (B1), X<sub>m</sub> rostral (B2) et X<sub>m</sub> caudal (B3) suivant les injections de DL-Glutamate (2.5 mM). Les éjections étaient programmées à 1-3 psi de pression et réparties sur une durée de 5-10 msec à une fréquence de 5 Hz. La durée totale des injections variaient de 5-10 sec avec un délai minimal de 80 sec entre chaque épisode de stimulation. Les histogrammes sont alignés sur le début des injections pharmacologiques illustrées par les rectangles de couleur turquoise. C : Tracés neurographiques provenant de trois épisodes de stimulation illustrés en B2. Les trois épisodes sont alignés sur le début des injections pharmacologiques illustrées par les rectangles de couleur turquoise. D : Signal neurographique provenant de trois épisodes d'injection de Ringer au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub>, de la partie rostrale et caudale du X<sub>m</sub>. Les trois épisodes sont alignés sur le début des injections de Ringer illustrées par les rectangles de couleur turquoise. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

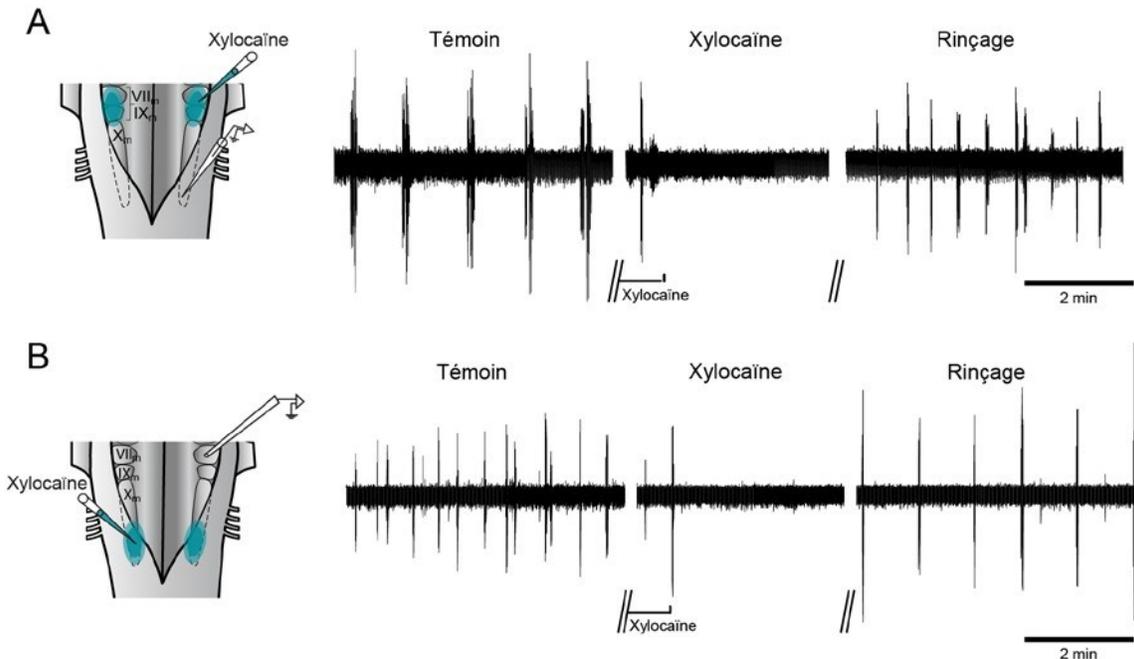
Les stimulations électriques peuvent autant dépolariser les corps cellulaires des neurones que leurs axones. Pour cette raison, les stimulations électriques ont été remplacées par des micro-injections de DL-glutamate (2.5 mM ; 1-3 psi de pression ; 5-10 msec ; 5 Hz ; durée de 5-10 sec ; à toutes les 80 sec au minimum). Les injections dans la région du VII<sub>m</sub> et du IX<sub>m</sub> ont produit de longues bouffées de décharges dans les motoneurones respiratoires controlatéraux. Le nombre moyen de potentiels d'action était moins élevé avant les épisodes de stimulations ( $4.48 \pm 3.93$ ) qu'après ceux-ci ( $33.04 \pm 37.07$ ; test-t apparié;  $P = 0.158$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour les stimulations au niveau de la partie rostrale du X<sub>m</sub>. Le script a détecté une moyenne de  $12.24 \pm 18.36$  potentiels d'action avant les stimulations comparativement à une moyenne de  $120.40 \pm 97.80$  potentiels d'action après (test-t apparié;  $P = 0.072$ ). Les injections dans la partie caudale du X<sub>m</sub> ont été légèrement plus efficaces afin de déclencher des longues bouffées de décharges. Une moyenne de  $9.68 \pm 17.06$  potentiels d'action a été détecté avant les stimulations comparativement à une moyenne de  $144.56 \pm$

109.41 potentiels d'action après (test-t apparié;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$  injections, 3 animaux) (Fig. 33). Des micro-injections de Ringer dans les mêmes régions non pas réussi à déclencher de telles bouffées de décharges (Fig. 33D).

En résumé, les résultats des expériences de stimulation électrique et pharmacologique démontrent que l'activation de neurones le long des pools de motoneurones respiratoires, où se trouve la colonne de cellules rétro-marquées, est en mesure de déclencher de longues bouffées de décharges typiques du rythme lent. Ceci suggère que les réseaux nerveux du CRG seraient distribués dans le rhombencéphale caudal le long des pools de motoneurones respiratoires des deux côtés.

*b. Inactivation des réseaux neuronaux du CRG*

Est-ce qu'une région du tegmentum latéral, le long de l'étendue rostro-caudale des pools de motoneurones respiratoires, est plus importante qu'une autre dans la genèse du rythme lent? Pour étudier cette hypothèse, l'application locale de Xylocaïne a été utilisée (Fig. 34 et Gariépy et al., 2012a).

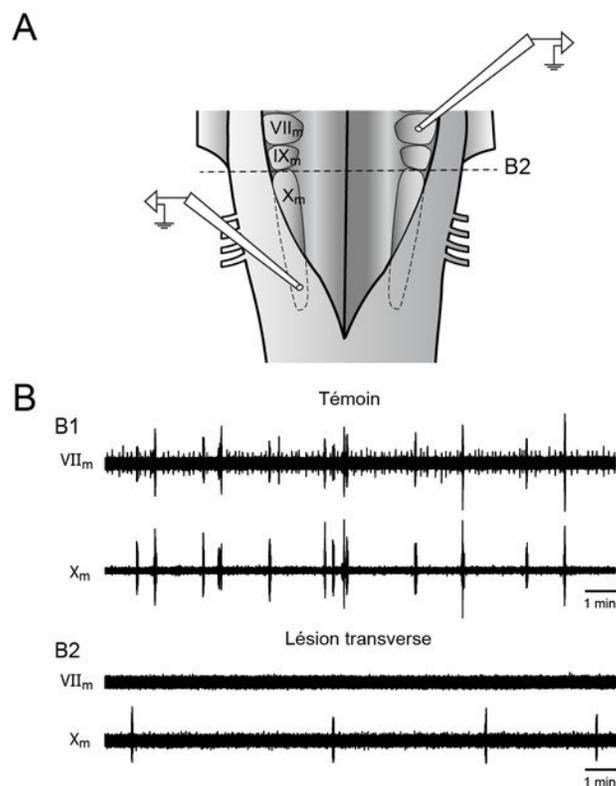


**Figure 35. Injections de Xylocaïne dans la partie rostrale et caudale du tegmentum latéral, le long des pools de motoneurones respiratoires.** A : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatéraux de Xylocaïne est illustrée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub>. À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. B : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau du VII<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatéraux de Xylocaïne est illustrée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus de la partie caudale de X<sub>m</sub>. À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

De manière générale, les injections bilatérales de Xylocaïne au niveau des noyaux moteurs du VII<sub>m</sub>/IX<sub>m</sub>/X<sub>m</sub> (portion rostrale) ont temporairement arrêté le rythme lent pour une durée moyenne de  $23.52 \pm 5.68$  min (Fig. 34A). Dans ces expériences, la variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue lors la situation de rinçage ( $434.02 \pm 347.87\%$ ) que pendant la situation témoin ( $103.31 \pm 16.45\%$ ; test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P <$

0.001; n = 4 injections; 3 animaux). Des résultats similaires ont été obtenus pour les micro-injections bilatérales dans la partie caudale du  $X_m$ . Ces injections ont temporairement arrêté le rythme lent pour une durée moyenne de  $11.14 \pm 9.71$  min (Fig. 34B). Dans ces expériences, la variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue pendant la situation de rinçage ( $397.36 \pm 350.90\%$ ) que durant la situation témoin ( $113.34 \pm 21.54\%$ ; test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P < 0.001$ ; n = 5 animaux).

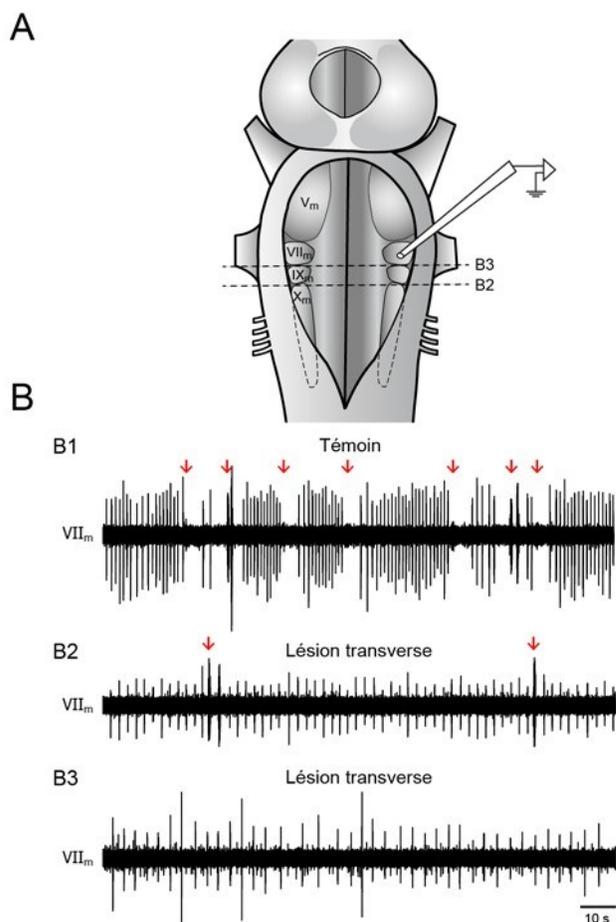
Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que plus des deux tiers du rhombencéphale caudal sont nécessaires pour générer du rythme lent. L'inactivation du tiers rostral ( $VII_m/IX_m/X_m$  portion rostrale) ou caudal (partie caudale du  $X_m$ ) est suffisante pour abolir ce rythme. Ces résultats mettent également de l'avant le rôle crucial que semble jouer la région à proximité du noyau moteur  $X_m$  dans la production du rythme lent, puisqu'au moins une portion de ce noyau moteur était touchée autant par les injections rostrales que caudales de Xylocaïne.



**Figure 36. Effets de lésions transverses sur le rythme respiratoire lent dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé.** A : Schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, démontrant la localisation des enregistrements extracellulaires des deux côtés. Le niveau de la lésion transverse est illustré par le trait pointillé entre IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub>. B : Tracés neurographiques enregistrés au-dessus du VII<sub>m</sub> avant la lésion transverse (B1) et suivant la lésion transverse sous IX<sub>m</sub> (B2). Noter l'absence de rythme lent enregistré sur VII<sub>m</sub> après la lésion. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

La Xylocaïne utilisée dans les expériences précédentes a été remplacée par des lésions transverses, dans le but d'exclure une contribution de fibres nerveuses de passage (Fig. 35 et 36). Dans la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, les lésions transverses entre IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub>, séparant les réseaux du CRG en une partie rostrale (un tiers) et caudale (deux tiers), ont aboli le rythme lent dans la partie rostrale contenant VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub>. Par contre, ce dernier a persisté dans la partie caudale comprenant X<sub>m</sub> (Fig. 35B2, n = 4 animaux).

Il faut se souvenir ici que les neurones du rhombencéphale caudal projetant à la fois au pTRG et au tegmentum latéral controlatéral (Fig. 24A3,B3), des neurones considérés comme d'excellents candidats à la genèse du rythme lent, sont plus nombreux dans la portion du tegmentum au niveau de  $X_m$  rostral que dans la portion au niveau de  $VII_m$  et  $IX_m$ . Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus lors de cette première série d'expériences de lésions (Fig. 35). Selon la même logique, un moins grand nombre de neurones dans la région du  $VII_m$  et  $IX_m$  peut se traduire par un potentiel d'excitabilité moins important dans cette région que la partie caudale du CRG au niveau du  $X_m$ . À cet effet, une préparation plus complète comprenant le tronc cérébral intact *in vitro* a été utilisée afin de conserver les connexions excitatrices descendantes du pTRG localisé plus rostralement. Le rythme respiratoire était enregistré de manière extracellulaire au niveau du  $VII_m$  avant et après les lésions transverses du tronc cérébral (Fig. 36). Les longues bouffées de décharges de même que le rythme rapide ont persisté après avoir enlevé totalement la partie la plus caudale du rhombencéphale à l'aide d'une lésion sous  $IX_m$  (Fig. 36B2, n=3 animaux). Les lésions supplémentaires en-dessous du  $VII_m$  ont complètement aboli le rythme respiratoire lent sans affecter la présence du rythme rapide toujours enregistré à la surface du  $VII_m$  (Fig. 36B3, n=3 animaux).



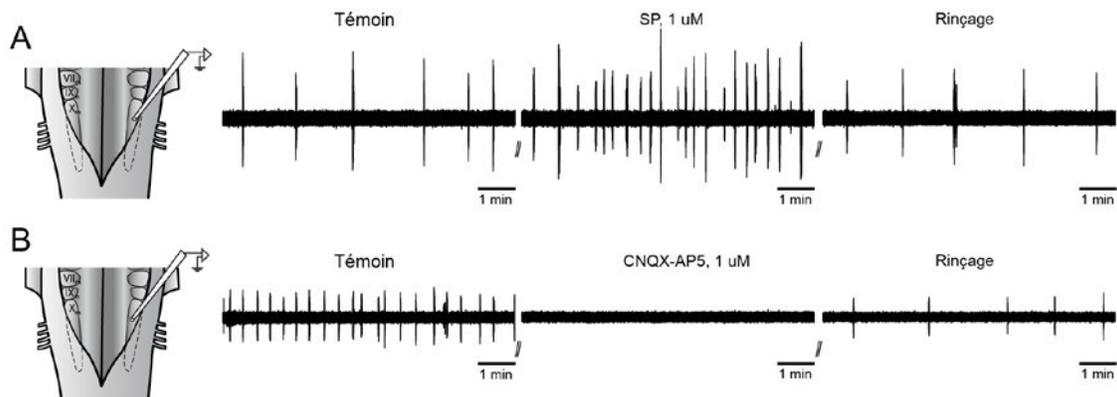
**Figure 37. Effets de lésions transverses sur le rythme respiratoire lent dans un cerveau de lamproie.** A : Schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, démontrant la localisation de l'enregistrement extracellulaire à la surface du VII<sub>m</sub>. Le niveau des lésions transverses est illustré par les traits pointillés. B : Tracés neurographiques enregistré sur le VII<sub>m</sub> avant les lésions transverses (B1), après la lésion transverse sous IX<sub>m</sub> (B2) et sous VII<sub>m</sub> (B3). Noter l'absence de rythme lent enregistré sur VII<sub>m</sub> après une lésion transverse sous le même noyau moteur. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

Ces résultats suggèrent que la partie caudale des réseaux du CRG au niveau du X<sub>m</sub> est capable de produire à elle seule du rythme lent et qu'elle est probablement indispensable à la genèse de ce même rythme. Ces résultats démontrent également que la partie rostrale du CRG, celle au niveau de VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub>, est capable de produire du rythme lent lorsqu'elle reçoit un apport excitateur supplémentaire, alors que la région du CRG ne contenant que la portion au niveau du VII<sub>m</sub> ne peut produire du rythme lent de manière spontanée.

c. *Rôle du glutamate et des peptides sur le rythme respiratoire lent*

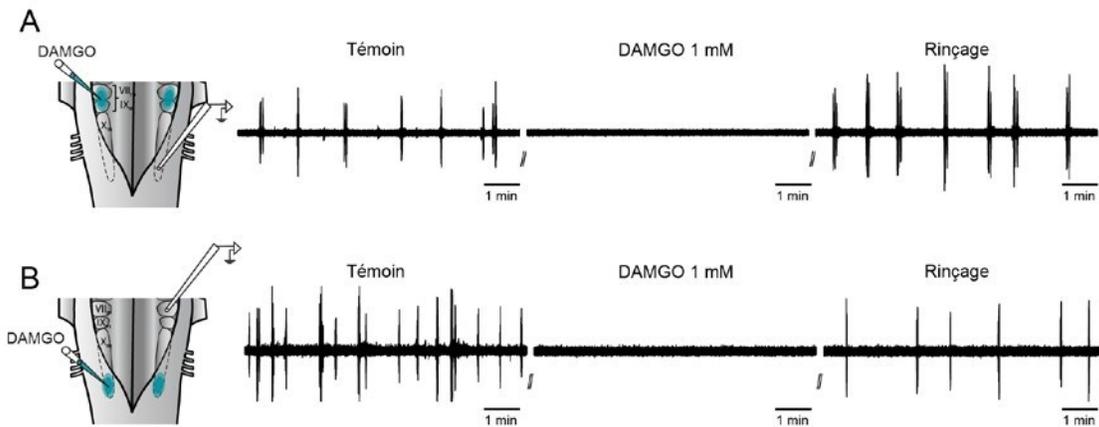
Dans le but d'identifier la nature des connexions impliquées dans la génération du rythme lent, des expériences de perfusion en bain de CNQX (1  $\mu$ M) et d'AP-5 (500 mM) sur une préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro* ont été réalisées. Au maximum de son effet, l'application de ces drogues a aboli le rythme lent dans deux animaux pour une durée moyenne de  $29.37 \pm 16.94$  min, avant qu'une période de rinçage ne permette le retour du rythme lent (Fig. 37B). Le test de la somme des rangs de Wilcoxon a démontré que la variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue durant la situation de rinçage ( $455.73 \pm 883.05\%$ ) par rapport à la situation témoin ( $98.63 \pm 55.02\%$ ;  $P = < 0.001$ ). Ces résultats suggèrent que le glutamate joue un rôle prépondérant dans la genèse du rythme respiratoire lent.

La sensibilité aux agonistes des récepteurs  $\mu$ -opiacés ([D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin) (DAMGO) et aux récepteurs à la substance P (SP) neurokinine-1 est généralement utilisée pour localiser les différents générateurs de la respiration chez les vertébrés (révisé dans Bianchi et al., 1995; Gray et al., 1999; Vasilakos et al., 2005; Mutolo et al., 2007). Dans le but de comparer les réseaux du CRG avec les autres générateurs respiratoires connus chez les vertébrés, des expériences d'injection de DAMGO et de perfusion de SP sur des préparations de rhombencéphale caudal isolé *in vitro* ont été effectuées.



**Figure 38. Perfusion en bain de substance P et d'antagonistes glutamatergiques au-dessus d'une préparation de rhombencéphale caudal isolé.** A : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau du  $X_m$ . À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-perfusion (SP, 1  $\mu$ M) et celle de récupération. B : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau du  $X_m$ . À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-perfusion (CNQX/AP-5, 1  $\mu$ M/500 mM) et celle de récupération.  $VII_m$ , noyau moteur facial ;  $IX_m$ , noyau moteur glossopharyngien ;  $X_m$ , noyau moteur vague.

Les injections bilatérales de DAMGO au niveau du  $VII_m$  et  $IX_m$ , ont temporairement aboli le rythme respiratoire lent dans tous les animaux testés pour une durée moyenne de  $26.99 \pm 15.59$  min (Fig. 38A). Dans ces expériences, la variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue pendant la situation de rinçage ( $115.77 \pm 51.51\%$ ) comparativement celle des cycles de la situation témoin ( $100.14 \pm 49.66\%$ ); test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P = 0.045$ ;  $n = 5$  animaux). Des résultats semblables ont été obtenus pour les micro-injections locales de DAMGO au niveau du  $X_m$  où ces dernières ont temporairement aboli le rythme lent dans tous les animaux testés pour une durée moyenne de  $29.72 \pm 9.17$  min (Fig. 38B). La variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue pendant la la situation de rinçage ( $140.09 \pm 96.24\%$ ) que durqant la situation témoin ( $91.84 \pm 51.37\%$ ; test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P = < 0.001$ ;  $n = 5$  animaux).



**Figure 39. Injections locales de DAMGO dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé.** A : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatérales de DAMGO (1 mM) est illustrée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub>. À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. B : À gauche, un schéma illustrant la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau du VII<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatérales de DAMGO (1 mM) est illustrée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus de la partie caudale du X<sub>m</sub>. À droite, trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

Contrairement aux injections de DAMGO, la perfusion en bain de SP sur la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro* a réduit la variation de la période des cycles du rythme lent pendant la situation d'effet (Fig. 37A). Une ANOVA unilatérale sur les rangs pour des mesures répétées ( $P < 0.001$ ), suivi du test de comparaisons multiples Student-Newman-Keuls, ont démontré une différence importante entre la variation de période de la situation d'effet ( $57.75 \pm 62.83\%$ ) avec celle de la situation témoin ( $109.90 \pm 70.06\%$ ) et de rinçage ( $152.28 \pm 124.29\%$ ;  $P < 0.05$ ). Le même test n'a cependant pas identifié de différences

marquées pour la variation de la période des cycles du rythme lent entre la situation témoin et de rinçage ( $P > 0.05$ ,  $n = 8$  animaux).

### C) *Interaction entre le pTRG et le CRG*

Les résultats anatomiques et physiologiques présentés ici, ainsi que ceux de Martel et al. (2007), suggèrent que la présence de connexions descendantes et ascendantes sous-tend la synchronisation du rythme rapide et du rythme lent au niveau des motoneurones respiratoires (Martel et al., 2007, Gariépy et al., 2012a). Afin de caractériser les interactions entre le CRG et le pTRG, des expériences physiologiques ont été effectuées dans une préparation *in vitro* de cerveau entier. En premier lieu, la capacité de déclencher des longues bouffées de décharges à l'aide de stimulations électriques et pharmacologiques des réseaux nerveux du CRG a été évaluée. Ensuite, la Xylocaïne a été utilisée dans le but d'étudier l'effet d'une inactivation temporaire et réversible des réseaux du CRG.

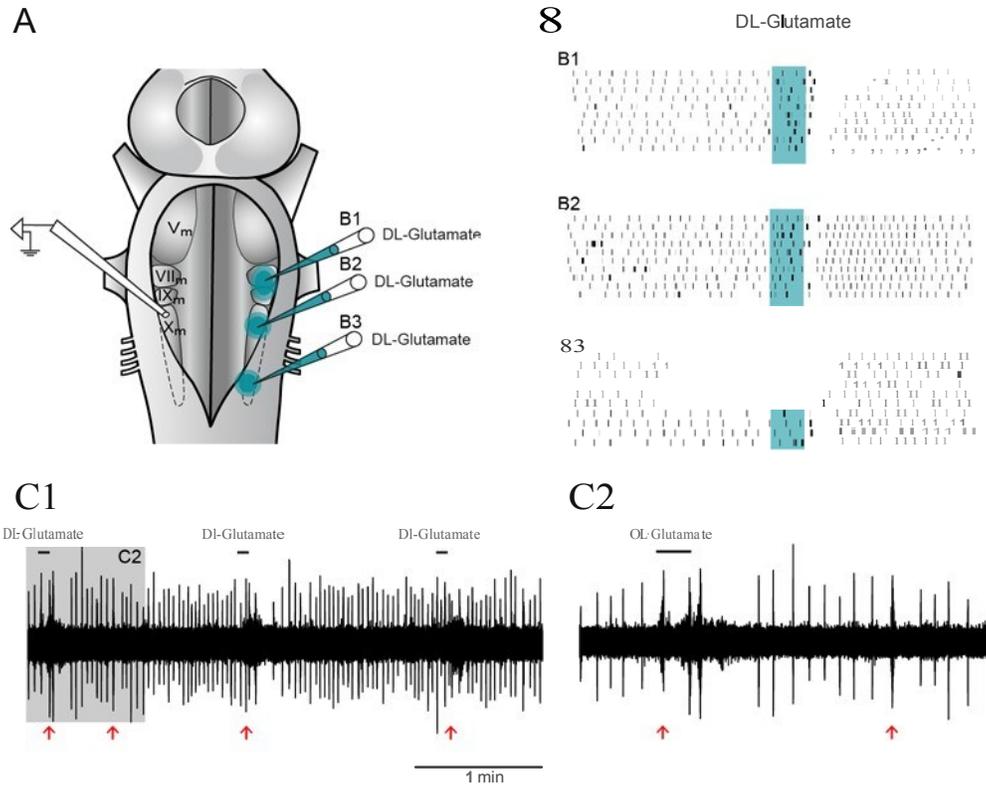
La figure 39 démontre que des trains de stimulation électrique (trois chocs de 5-15  $\mu\text{A}$ ; 2 ms; 30 Hz ; à toutes les 50 sec), au niveau du VII<sub>m</sub>, la partie rostrale du X<sub>m</sub> et sa partie caudale ont déclenché de longues bouffées de décharges au niveau du X<sub>m</sub> de l'autre côté (Fig. 39B1-B3). Ces longues bouffées de décharges ont perturbé la fréquence et bloqué le rythme rapide enregistré au niveau des motoneurones (Fig. 39C1,C2). Comme pour les expériences de stimulation dans la préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, la présence de longues bouffées de décharges typiques du rythme lent a été basée sur la comparaison entre le nombre de potentiels d'action 5 secondes précédant et suivant les épisodes de stimulation. Le test de la somme des rangs de Wilcoxon n'a pas relevé de différences significatives entre le nombre de potentiels d'action avant et après les épisodes de stimulation au niveau du VII<sub>m</sub>



**Figure 40. Stimulations électriques dans une préparation de tronc cérébral intact.** A : Schéma illustrant la préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à gauche, alors que les trois différents sites de stimulations sont représentés par les trois points noirs placés au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub>, de la partie rostrale du X<sub>m</sub> et de la partie caudale du X<sub>m</sub>. B: Histogrammes de trames démontrant les réponses extracellulaires au niveau des motoneurones respiratoires du X<sub>m</sub> suivant les stimulations électriques (trois chocs de 2 msec à 15 μA à une fréquence 30 Hz à toutes les 50 sec) du VII<sub>m</sub> (B1), de la partie rostrale (B2) et caudale (B3) du X<sub>m</sub>. Les histogrammes sont alignés sur l'artéfact du train de simulation (trait noir foncé). C1 : Tracé neurographique provenant de trois épisodes de stimulations illustrés en B3. Les flèches rouges indiquent les épisodes de rythme respiratoire lent. C2 : Grossissement de la partie encadré en gris du tracé neurographique illustré en C1. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

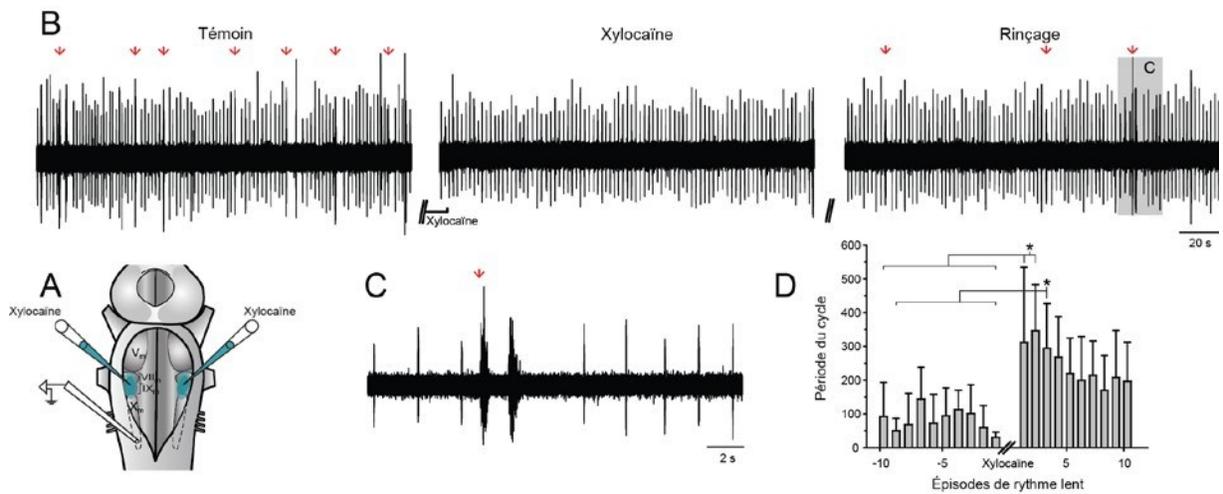
Dans une autre série d'expériences, du DL-glutamate a été utilisé au lieu des stimulations électriques (Fig. 40). Les injections dans la région du VII<sub>m</sub> et du IX<sub>m</sub> ont produit de longues bouffées de décharges dans les motoneurones respiratoires controlatéraux. Comme pour les stimulations électriques, ces longues bouffées de décharges ont perturbé la fréquence et bloqué le rythme rapide enregistré au niveau des motoneurones (Fig. 40C1,C2). Le nombre moyen de potentiels d'action était significativement plus élevé après les épisodes de stimulations ( $80.00 \pm 54.25$ ) qu'avant celles-ci ( $14.03 \pm 12.37$ ; test-t apparié;  $P = 0.021$ ). En ce qui concerne les injections au niveau de la partie rostrale du X<sub>m</sub>, le script de *réinitialisation du voltage intégré* a détecté une moyenne de  $33.00 \pm 34.93$  potentiels d'action avant les stimulations comparativement à une moyenne  $51.50 \pm 24.06$  potentiels d'action après (test-t apparié;  $P = 0.319$ ). Les épisodes de stimulation pharmacologique, au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub>, ont également réussi à déclencher des longues bouffées de décharges. Le test de la somme des rangs de Wilcoxon a montré que le nombre moyen de potentiels d'action était significativement plus élevé après les épisodes de stimulations ( $144.56 \pm 109.41$ ) qu'avant celles-ci ( $9.68 \pm 17.06$ ;  $P = 0.031$ ;  $n = 6$  séries d'injection; 5 animaux).

Ces résultats démontrent que les stimulations électriques et pharmacologiques, au niveau des colonnes de cellules rétro-marquées le long des pools de motoneurones, sont capables de produire de longues bouffées de décharges dans un tronc cérébral intact.



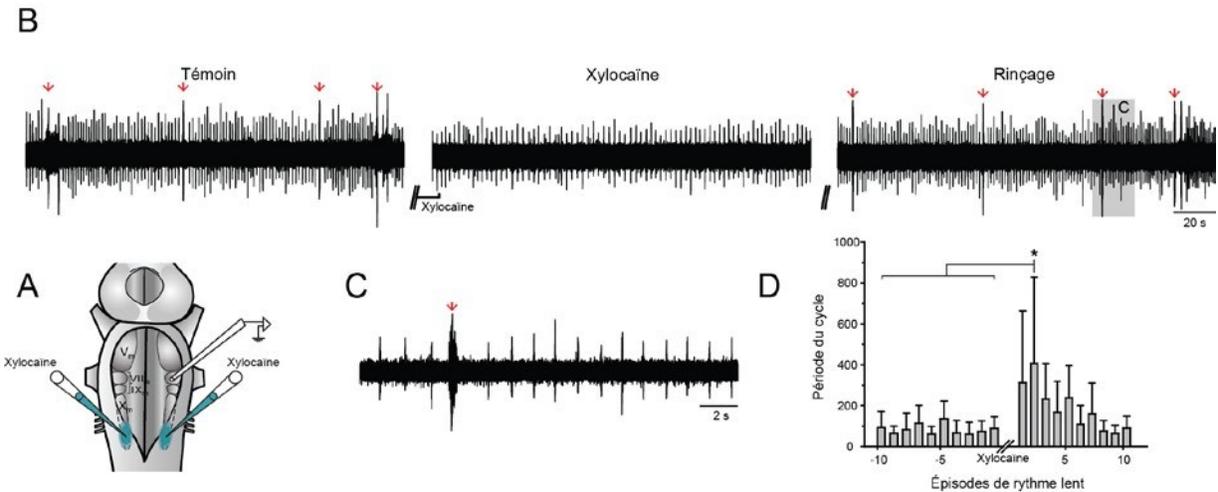
**Figure 41. Stimulations glutamatergiques dans une préparation de tronc cérébral intact.**

A : Schéma illustrant la préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est montré à gauche, alors que les trois différents sites d'injections de DL-glutamate (2.5 mM) sont représentés par les trois cercles concentriques placés au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub>/IX<sub>m</sub>, et de la partie rostrale et caudale du X<sub>m</sub>. B : Histogrammes de trames démontrant les réponses extracellulaires au niveau des motoneurons respiratoires du X<sub>m</sub> suivant les injections de DL-Glutamate au-dessus du VII<sub>m</sub>/IX<sub>m</sub> (B1), et au-dessus de la partie rostrale (B2) et caudale (B3) du X<sub>m</sub>. Les impulsions étaient programmées à 2-4 psi de pression et réparties sur une durée de 10 msec à une fréquence de 5 Hz. La durée totale des injections était de 5 sec à toutes les 100 sec. Les histogrammes sont alignés par rapport au début des injections pharmacologiques illustrées par les rectangles de couleur turquoise. C1 : Tracé neurographique provenant de trois épisodes de stimulations illustrés en B1. Les flèches rouges indiquent les épisodes de rythme respiratoire lent. C2 : Grossissement de la partie encadrée en gris du tracé neurographique illustré en C1. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.



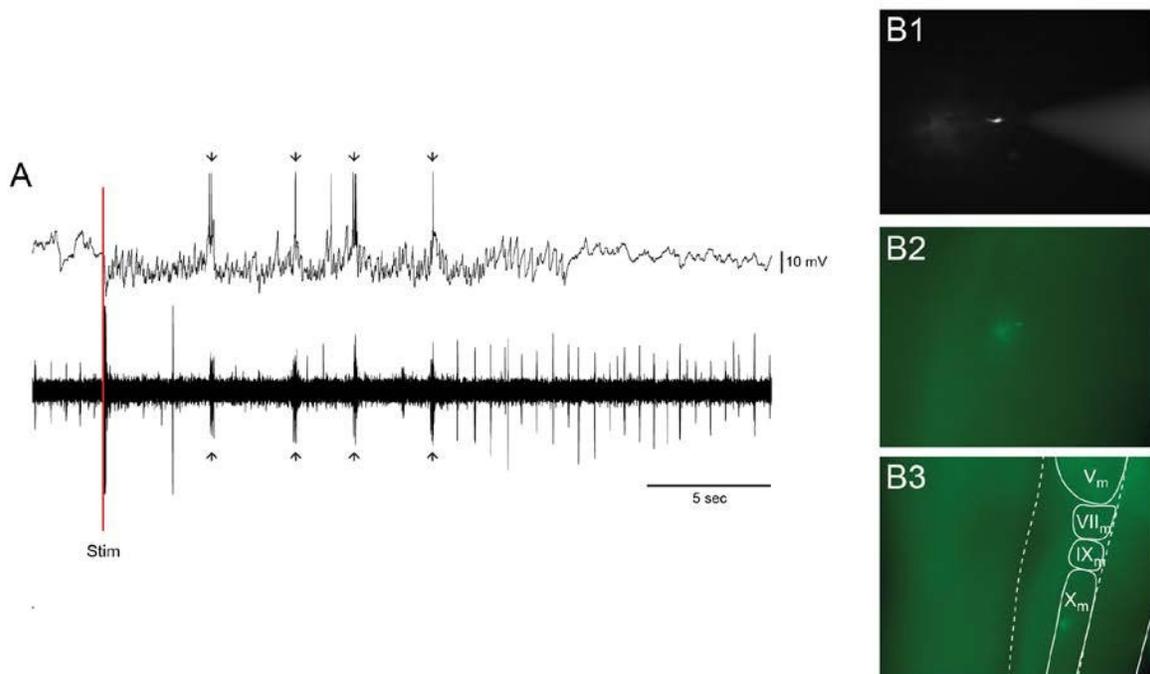
**Figure 42. Expériences d'inactivation à la Xylocaïne au niveau du VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub> dans une préparation de tronc cérébral intact.** A : Schéma illustrant la préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à gauche au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatéraux de Xylocaïne est illustrée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus des noyaux moteurs VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub>. B : Trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. C : Grossissement de la partie encadrée en gris du tracé neurographique illustré en B (récupération). D : Histogramme illustrant la période normalisée moyenne (axe Y) de 10 cycles d'épisode de rythme lent précédant et suivant l'injection bilatérale de Xylocaïne (axe X). La période normalisée moyenne des cycles est exprimée en pourcentage de la moyenne de la situation témoin. Notez la durée de la période des épisodes de rythme lent suivant la période d'injection. Les flèches rouges indiquent les épisodes de rythme respiratoire lent. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

Par la suite, une autre série d'expériences visant à inactiver de manière sélective le rythme lent a été effectuée. Pour ce faire, nous avons procédé à des injections bilatérales de Xylocaïne au niveau de la région du VII<sub>m</sub> et IX<sub>m</sub> dans une préparation *in vitro* de tronc cérébral intact. Ces injections ont temporairement arrêté le rythme lent, sans affecter le rythme rapide, pour une durée moyenne de  $14.97 \pm 17.96$  min (Fig. 41). Dans ces expériences, la variation de la période entre les cycles du rythme lent était plus longue pendant la situation de rinçage ( $242.67 \pm 35.13\%$ ) que durant la situation témoin ( $82.33 \pm 27.69\%$ ; test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P < 0.001$ ;  $n = 5$  injections; 3 animaux). Des résultats similaires ont été obtenus pour les injections au niveau de la partie caudale du X<sub>m</sub>. Les injections ont temporairement arrêté le rythme lent, sans affecter le rythme rapide, pour une durée moyenne de  $13.70 \pm 8.51$  sec (Fig. 42). Dans ces expériences, la variation de la période des cycles du rythme lent était plus longue pour les cycles suivant les injections ( $212.73 \pm 127.34\%$ ) comparativement à celle de la situation témoin ( $85.51 \pm 18.07\%$ ; test de la somme des rangs de Wilcoxon;  $P < 0.001$ ;  $n = 6$  injections; 5 animaux).



**Figure 43. Expériences d'inactivation à la Xylocaïne au niveau de la partie caudale du  $X_m$  dans une préparation de tronc cérébral intact.** A : Schéma illustrant la préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Le site d'enregistrement extracellulaire est indiqué à droite au niveau du VII<sub>m</sub>. La localisation des sites d'injections bilatéraux de Xylocaïne est indiquée par les cercles concentriques de couleur turquoise au-dessus de la partie caudale du  $X_m$ . B : Trois tracés neurographiques représentant la situation témoin, celle post-injection et celle de récupération. C : Grossissement de la partie encadrée en gris du tracé neurographique illustré en B (récupération). D : Histogramme illustrant la période normalisée moyenne (axe Y) de 10 cycles d'épisode de rythme lent précédant et suivant l'injection bilatérale de Xylocaïne (axe X). La période normalisée moyenne des cycles est exprimée en pourcentage de la moyenne de la situation témoin. Notez la durée de la période des épisodes de rythme respiratoire lent suivant la période d'injection. Les flèches rouges indiquent les épisodes de rythme respiratoire lent. VII<sub>m</sub>, noyau moteur facial ; IX<sub>m</sub>, noyau moteur glossopharyngien ; X<sub>m</sub>, noyau moteur vague.

De façon générale, ces résultats illustrent des interactions entre les réseaux du CRG et ceux du pTRG. Ces résultats montrent que l'inactivation de la partie rostrale ou de la partie caudale du rhombencéphale caudal abolit le rythme respiratoire lent exclusivement. De plus, ces résultats suggèrent également que plus du tiers du rhombencéphale caudal est nécessaire pour que le rythme lent puisse se produire de manière spontanée. Ces expériences d'inactivation supportent fortement l'hypothèse que les réseaux nerveux du CRG interagissent fort probablement avec ceux du pTRG via des connexions ascendantes.



**Figure 44. Caractérisation physiologique des neurones du CRG.** A : Enregistrement intracellulaire en « patch mode cellule entière/courant imposé » dans une préparation de tronc cérébral intact *in vitro*. Le tracé du haut, démontre des potentiels d'action (flèches noires) en phase avec l'activité respiratoire du rythme lent enregistrée à la surface du noyau moteur du vague ( $X_m$ ) sur le tracé du bas (flèches noires), en réponse à une stimulation électrique (ligne rouge). À noter que le tracé neurographique du neurone illustré par la trace du haut ne présente pas d'activité associée aux bouffées du rythme respiratoire rapide. B1-B3 : Photomicrographies en fluorescence d'un neurone du CRG marqué par l'injection dans le pTRG (B1) et injecté intracellulairement à la biocytine (B2,3).

Finalement, dans le but de localiser les neurones rythmiques dans le CRG responsable de générer le rythme lent, une préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro* a été modifiée afin d'enregistrer des neurones en « patch » comme il avait déjà été fait pour le pTRG. Pour être capable de visualiser et d'enregistrer les neurones du CRG, des injections de dextran amines couplées au fluorophore Texas Red ont été préalablement effectuées dans le

pTRG du côté opposé au site d'enregistrement dans le rhombencéphale caudal 24 heures avant l'expérience électrophysiologique. Le neurone enregistré dans la figure 43 montre de longues bouffées de décharge de potentiels d'action (flèches noires) synchronisées avec les longues bouffées de décharge enregistrées extracellulairement à la surface des motoneurones respiratoires du côté opposé, en réponse à une stimulation électrique (ligne rouge).

Ces expériences suggèrent que des neurones du rhombencéphale caudal identifiés par marquage rétrograde lors des expériences anatomiques pourraient faire partie du générateur de la respiration lente. Notamment, l'enregistrement d'un neurone rythmique au niveau du rhombencéphale caudal appuie davantage la présence du CRG dans cette région.

# Discussion

Les résultats présentés dans ma thèse nous ont permis de découvrir que le pTRG comprend des populations de neurones projetant vers leurs homologues controlatéraux et des projections vers les motoneurones respiratoires du même côté, ou des deux côtés. Les enregistrements unitaires de neurones du pTRG ont également montré que ces derniers possèdent une arborisation axonale complexe, de sorte que des neurones du pTRG peuvent démontrer les trois types de projections mentionnées ci-haut.

De plus, à notre connaissance, nous avons identifié pour la première fois la localisation et l'organisation des réseaux neuronaux responsables de générer le rythme respiratoire lent chez la lamproie. Nous avons démontré que la génération du rythme lent est assurée par des neurones distribués tout au long des pools de motoneurones respiratoires dans la partie caudale du rhombencéphale, soit : dans le tegmentum médian et latéral, dans le rdV, dans la région près du sulcus limitans, ainsi qu'à l'intérieur et à proximité des noyaux moteurs VII, IX et X. Un des faits saillants de ces travaux est que les longues bouffées de décharge, caractéristiques du rythme lent, peuvent être déclenchées localement tout au long de la colonne des motoneurones respiratoires. À l'inverse, une inactivation bilatérale de la partie rostrale, ou caudale, de la colonne des motoneurones abolit ce rythme. De plus, nous avons démontré que nous pouvions abolir le rythme lent sans affecter le rythme rapide, dans une préparation *in vitro* de tronc cérébral intact. Enfin, nous avons découvert des neurones possédant une activité rythmique en phase avec celle du rythme lent au niveau du CRG. Les résultats de ma thèse suggèrent que l'organisation des réseaux neuronaux du CRG est distribuée dans le rhombencéphale caudal, au niveau du tegmentum latéral, le long des groupes de motoneurones respiratoires.

et que les projections du CRG vers l'autre côté, ainsi que vers le pTRG jouent un rôle clé dans la synchronisation bilatérale du rythme lent et l'interaction avec le rythme rapide généré dans le pTRG.

## **Connexions du pTRG**

### **a. Bilatéralité**

Les injections de traceurs anatomiques dans les pools de motoneurones respiratoires ont permis d'identifier plusieurs populations de neurones dans la région du pTRG des deux côtés du tronc cérébral, alors que les injections dans un pTRG ont identifié des populations de neurones au niveau de son homologue controlatéral. Bien que nous ne sachions pas si tous ces neurones sont impliqués dans la genèse de la respiration chez la lamproie, la localisation de ces populations de neurones correspond à celle où des enregistrements extra- et intracellulaires ont été effectués par Russell (1986), dans le tegmentum latéral au niveau de la racine motrice du nerf V (pTRG). Ces enregistrements ont montré que des neurones de cette région possédaient une activité nerveuse rythmique précédant et en phase avec celle des motoneurones respiratoires. Plus tard, Martel et al., (2007) sont parvenus à enregistrer le rythme rapide de manière extracellulaire dans la région du pTRG. Ils ont aussi montré que le rythme respiratoire rapide pouvait être aboli par l'application d'un mélange d'antagonistes glutamatergiques (AP5 et CNQX) dans le pTRG d'un seul côté du cerveau. Ceci suggère que les neurones que nous avons identifiés dans le pTRG par marquage rétrograde font probablement partie des réseaux neuronaux responsables de générer le rythme rapide et que les connexions entre le pTRG des deux côtés du cerveau sont essentielles à la présence de ce

rythme. Martel et al., (2007) ont d'ailleurs proposé que le rythme respiratoire résulterait d'une excitation mutuelle entre les deux pTRG. Nos résultats anatomiques ont démontré que les axones commissuraux des neurones du pTRG croisent la ligne médiane en un faisceau compact de fibres au niveau de  $V_m$ . À cet égard, les injections de Xylocaïne sur la ligne médiane, entre les deux pTRGs, se sont avérées très révélatrices. Ces dernières ont pratiquement aboli les PPSEs enregistrés dans les motoneurones respiratoires, renforçant ainsi l'hypothèse d'embrassement mutuel entre les pTRGs de chaque côté. Ces résultats appuient également l'hypothèse de Rovainen (1985) voulant que le générateur du rythme respiratoire rapide soit localisé dans la partie rostrale du rhombencéphale, puisque des bouffées de décharges rythmiques, synchronisées avec l'activité des motoneurones respiratoires peuvent être enregistrées sur la ligne médiane au niveau rostro-caudal du pTRG. De plus, une lésion sagittale de la ligne médiane au niveau du rhombencéphale caudal n'abolit pas le rythme rapide, de même que la synchronisation de ces bouffées. Il apparaît donc que les bouffées de décharge rythmiques enregistrées au niveau de la ligne médiane par Rovainen (1985) correspondent probablement à l'activité nerveuse des axones commissuraux provenant des neurones du pTRG, puisqu'aucune population de neurones n'a été observée au niveau de la ligne médiane par nos expériences anatomiques.

Tel que mentionné précédemment, nos résultats anatomiques montrent que les axones commissuraux des neurones du pTRG peuvent être classés en deux catégories : ceux qui projettent au pTRG controlatéral et ceux qui projettent directement vers les motoneurones respiratoires du côté opposé. Les injections de Xylocaïne dans le pTRG opposé à la stimulation de l'autre pTRG ont réduit la réponse synaptique induite par la stimulation du

pTRG controlatéral. Le même effet pouvait également être observé lors des injections d'antagonistes glutamatergiques en remplacement de la Xylocaïne. Il est donc fort probable que les injections de Xylocaïne et d'antagonistes glutamatergiques dans le pTRG aient affecté seulement la partie des projections faisant relai dans ce dernier et non les axones commissuraux projetant directement aux motoneurones controlatéraux. Les projections d'un pTRG vers les motoneurones respiratoires du côté opposé seraient donc suffisantes au maintien des réponses synaptiques dans ces derniers. Nos expériences de double enregistrement de motoneurones respiratoires pendant la stimulation du pTRG supportent cette hypothèse. Les résultats de ces expériences suggèrent que les motoneurones respiratoires reçoivent des connexions monosynaptiques du pTRG opposé, puisque les réponses synaptiques enregistrées dans les motoneurones suivent l'application de stimulations à hautes fréquences du pTRG (Brocard et al., 2010 ; Brocard et Dubuc 2003).

Dans leur ensemble, nos résultats anatomiques et physiologiques montrent deux ensembles de projections pouvant sous-tendre la synchronisation bilatérale de l'activité respiratoire chez la lamproie: les axones du pTRG vers les motoneurones respiratoires des deux côtés et les axones du pTRG vers son homologue controlatéral. Les enregistrements unitaires de l'activité des neurones du pTRG ont non seulement démontré qu'ils possèdent des propriétés physiologiques rythmiques associées à la respiration, mais aussi un réseau de projections complexes, incluant des projections bilatérales vers les pools de motoneurones respiratoires dans le tronc cérébral, ainsi que des connexions reliant les pTRGs des deux côtés. La respiration étant une activité vitale à la survie, cette particularité des neurones du pTRG confère au générateur du rythme rapide un aspect de redondance et de stabilité. Ces résultats

sont semblables à ceux obtenus dans le système respiratoire des mammifères où des projections controlatérales existent entre les régions qui génèrent la respiration (Bouvier et al., 2010; Tan et al., 2010), ainsi qu'entre ces dernières et les motoneurones respiratoires (Janczewski et Karczewski, 1990; Duffin et Li, 2006; Tarras-Wahlberg et Rekling, 2009 ; Tan et al., 2010). Chez la lamproie, une population de neurones de la MLR comprend aussi des neurones comportant de multiples projections. Des enregistrements unitaires de neurones de la MLR ont démontré que certains de ces neurones peuvent projeter à la fois au pTRG et aux motoneurones respiratoires des deux côtés. La stimulation de la MLR module l'activité respiratoire en lien avec le mouvement (Gariépy et al., 2012b). Enfin, le besoin de synchronisation bilatérale entre les deux côtés du cerveau n'est pas exclusif à la respiration. Par exemple, une synchronisation bilatérale est aussi présente dans les réseaux locomoteurs, quoique cette dernière est en phase alternée (Fagerstedt et al., 2000; Grillner, 2003; Mentel et al., 2008; Brocard et al., 2010). Les réseaux d'interneurones du noyau moteur trijumeau participant à l'allaitement sont également connus pour se synchroniser bilatéralement chez les rats néonataux (Koizumi et al., 2009).

#### b. Connexions descendantes

Des études antérieures ont démontré que les contractions entre les différentes branchies sont régies selon un délai progressif rostro-caudal chez la lamproie (Rovainen, 1977; Russel, 1986 ; Guimond et al., 2003). Par exemple, les muscles de la 7<sup>e</sup> branchie sont activés légèrement après celle qui la précède et ainsi de suite. Par le passé, ce délai a été attribué à la différence de longueur entre les nerfs de VII<sub>m</sub>, IX<sub>m</sub> et X<sub>m</sub> innervant leurs muscles respiratoires respectifs, le nerf de X<sub>m</sub> étant plus long (Guimond et al., 2003). Des enregistrements

extracellulaires provenant des différents noyaux moteurs ont ensuite démontré qu'il y avait également un délai de 5 ms entre les portions rostrales et caudales des motoneurones respiratoires. La présence de ce délai rostro-caudal au niveau des motoneurones pourrait en partie être expliqué par le fait que l'information nerveuse en provenance des neurones du pTRG rejoint les noyaux moteurs VII, IX et X dans cet ordre chronologique, X<sub>m</sub> étant le plus caudal. Un délai rostro-caudal semblable a également été observé entre les différents pools de motoneurones respiratoires chez le rat (Giraudin et al., 2008). Les différents segments spinaux, faisant partie du système locomoteur de la lamproie, présentent aussi un délai d'activation rostro-caudal lors de la locomotion (Cohen et al., 1992; Matsushima et Grillner, 1992; Kozlov et al., 2009).

Enfin, nous avons également démontré que l'injection de bloqueurs glutamatergiques dans les motoneurones respiratoires abolit les PPSEs déclenchés par l'activation du pTRG, suggérant que la connexion entre le pTRG et les motoneurones est glutamatergique. Chez les mammifères, les motoneurones respiratoires sont activés par des synapses excitatrices glutamatergiques (Greer et al., 1991; Berger, 2000; Wang et al., 2002). Les motoneurones spinaux de la lamproie sont également innervés en partie par une classe d'interneurones pré-moteurs glutamatergiques (Buchanan et Grillner, 1987).

## **CRG**

### **c. Réseaux neuronaux distribués**

Rovainen (1974 ; 1977) a été le premier à enregistrer le rythme respiratoire lent de la lamproie et cela à partir des nerfs IX et X dans une préparation de tronc cérébral intact *in*

*vitro*. Il observa que des stimulations mécaniques des branchies étaient en mesure de produire de longues bouffées de décharge caractéristiques du rythme lent se traduisant par une contraction bilatérale massive des branchies de la lamproie (Rovainen, 1974, 1977). Il proposa ensuite que le rythme lent est généré dans le rhombencéphale caudal et que les longues contractions des branchies permettent le nettoyage du système branchio-respiratoire, afin de favoriser le maintien des échanges gazeux (Rovainen, 1985). Il compara ce rythme à de la « toux » (Rovainen, 1985). Thompson (1985) confirma l'existence d'un rythme lent observé par Rovainen. Elle caractérisa ce rythme par de « faibles » longues bouffées (200-400 ms) et de longues bouffées « d'embrasement » (500 -1000 ms). Elle observa également que les longues bouffées respiratoires persistaient dans une moitié du rhombencéphale caudale isolé (Thompson, 1985). Kawasaki (1981 ; 1984) avait lui aussi observé que la contraction des branchies persistait après une section transversale séparant la partie rostrale de la partie caudale du rhombencéphale de la lamproie. Il remarqua également que les deux rythmes respiratoires, enregistrés au niveau des motoneurones respiratoires, continuaient d'être générés suivant une paralysie des muscles périphériques de la lamproie induite par des injections systémiques de curare. Kawasaki conclut que les deux rythmes respiratoires devaient être générés centralement sans besoin de retour sensoriel (Kawasaki, 1984). Ce n'est que plus tard que Martel et al., (2007) ont plus spécifiquement caractérisé le rythme respiratoire lent de la lamproie. En effet, ces derniers ont confirmé que les réseaux responsables de générer le rythme lent sont situés dans le rhombencéphale caudal, puisque seulement le rythme lent pouvait être enregistré au niveau des motoneurones respiratoires après une section transversale sous  $V_m$  séparant le pTRG du reste du rhombencéphale.

Tel que mentionné précédemment, nos résultats anatomiques ont permis de trouver que des populations de neurones dans le rhombencéphale caudal, distribuées le long des pools de motoneurones respiratoires, projettent de l'autre côté vers leur homologue controlatéral. Des stimulations électriques et pharmacologiques (DL-glutamate), tout au long des pools de motoneurones respiratoires, ont été capables de déclencher de longues bouffées de décharge enregistrées de l'autre côté du cerveau dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*, suggérant la présence de connexions bilatérales, ainsi qu'une distribution rostro-caudale des réseaux neuronaux du CRG. Notamment, les expériences d'inactivation réversible bilatérale de la partie rostrale, ou caudale, du rhombencéphale caudal (environ 1/3 du CRG) ont aboli le rythme respiratoire lent dans une préparation de rhombencéphale caudal isolé *in vitro*. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les réseaux neuronaux du CRG seraient distribués rostro-caudalement.

De plus, les expériences de sections transversales du CRG montrent que le rythme lent persiste malgré une ablation d'une partie des réseaux du CRG. Une section transverse du rhombencéphale caudal isolé au-dessus de  $X_m$  entraîne une abolition du rythme lent enregistré dans les noyaux moteurs respiratoires VII et IX, alors qu'il persiste au niveau de  $X_m$ . À la lueur des résultats d'inactivation bilatérale utilisant de la Xylocaïne, la perte du rythme lent au niveau de  $VII_m$  et  $IX_m$  n'est pas surprenante considérant que plus de la moitié du CRG ait été enlevée. Par contre, lorsqu'une section transversale sous  $IX_m$  est exécutée dans une préparation de rhombencéphale isolé, préservant ainsi la portion rostrale du tronc cérébral, le rythme respiratoire persiste au niveau de  $VII_m$  et  $IX_m$ . Ces résultats suggèrent que la portion rostrale du tronc cérébral ajoute fort probablement une source d'excitation supplémentaire

nécessaire à l'enregistrement supra-liminaire du rythme lent. Cette source d'excitation est inconnue, mais pourrait être d'origine tonique. Des neurones possédant une décharge tonique ont d'ailleurs été enregistré dans la région du pTRG (Mutolo et al., 2010).

En somme, les résultats d'activation et d'inactivation de la moitié caudale du rhombencéphale isolé supportent l'hypothèse que le CRG est caractérisé par des réseaux neuronaux distribués bilatéralement le long des pools de motoneurones respiratoires, puisque l'activation locale tout au long des différentes régions du CRG sont capables de générer de longues bouffées de décharge et que des inactivations locales réversibles de ces mêmes régions perturbent dramatiquement ce rythme.

#### d. Connexions ascendantes

Martel et al. (2007) ont démontré que l'inactivation locale du pTRG par des antagonistes glutamatergiques abolit le rythme rapide sans affecter le rythme lent enregistré au niveau des motoneurones respiratoires. Il a été proposé que le CRG et le pTRG interagissent l'un avec l'autre par l'intermédiaire de connexions ascendantes et descendantes (Martel et al., 2007). Cette hypothèse est également supportée par des enregistrements extracellulaires du pTRG démontrant un arrêt temporaire du rythme rapide durant les longues bouffées de décharge rythmiques du rythme lent, avant la reprise subséquente du rythme respiratoire rapide enregistré au niveau des motoneurones et dans le pTRG (Martel et al., 2007). Les expériences anatomiques de ma thèse ont montré que des populations de neurones dans le rhombencéphale caudal projettent à leur homologue controlatéral ou au pTRG ipsi- ou controlatéral. D'autres populations de neurones projettent à la fois de l'autre côté et au pTRG

ipsi- ou controlatéral. Ces neurones doublement marqués sont plus particulièrement regroupés autour de la portion rostrale et médiale de  $X_m$ . Cette région est également plus sensible aux activations électriques et pharmacologiques du CRG, en plus de se retrouver là où la concentration de motoneurones respiratoires est la plus importante (Guimond et al., 2003).

L'hypothèse selon laquelle les interactions entre le pTRG et CRG sont régies par des connexions descendantes et ascendantes est également supportée par les expériences d'inactivation bilatérale réversible utilisant de la Xylocaïne dans une préparation *in vitro* de tronc cérébral intact. Ces injections ont aboli le rythme lent de manière temporaire sans affecter le rythme rapide enregistré au niveau des motoneurones respiratoires.

Les enregistrements unitaires de neurones rythmiques du CRG inclus dans ma thèse supportent l'hypothèse d'un réseau de connexions ascendantes entre le CRG et pTRG, puisque les neurones enregistrés étaient préalablement identifiés par l'injection d'un marqueur rétrograde dans le pTRG. Ces expériences physiologiques représentent également les premiers exemples d'enregistrement du rythme respiratoire lent dans un neurone du CRG.

Il a également été démontré que des connexions ascendantes glutamatergiques vers le pTRG proviennent de populations de neurones situés dans la région des noyaux moteurs VII, IX et X (Cinelli et al., 2014, 2016). Tout comme le démontrent les résultats de ma thèse, ces neurones rétrogradement marqués par une injection dans le pTRG forment une colonne de neurones le long des pools de motoneurones respiratoires. Ces neurones se trouvent également à proximité, ou inter-mêlés, aux motoneurones respiratoires. Les neurones excitateurs décrit par Cinelli et al. (2014, 2016) semblent être en partie contrôlés par des entrées inhibitrices

GABAergiques et glycinergiques. La désinhibition de la région de  $X_m$  entraîne une augmentation du rythme rapide enregistré dans les motoneurones respiratoires (Cinelli et al., 2014, 2016).

En résumé, les résultats anatomiques de ma thèse montrent que le CRG comprend des neurones projetant vers leur homologue controlatéral, vers le pTRG des deux côtés, ainsi que des neurones projetant à la fois au côté opposé et vers le pTRG. Les neurones doublement marqués, par une injection dans le pTRG et dans le rhombencéphale caudal du côté opposé, dans le CRG pourraient jouer un rôle clé dans les interactions avec le pTRG de même que dans la synchronisation bilatérale du rythme lent.

Ce même type d'organisation est aussi observé dans le cerveau de la lamproie. Les régions de la MLR et du pTRG comprennent toutes deux des neurones démontrant des projections multiples (Gariépy et al, 2012a,b). Des neurones de la MLR sont capables de projeter à leur homologue controlatéral, ainsi qu'au pTRG et aux motoneurones respiratoires des deux côtés. Il en va de même pour les neurones du pTRG projetant à la fois au pTRG d'un côté et aux motoneurones des deux côtés. Enfin, nos résultats préliminaires d'enregistrement intracellulaire de neurones du CRG semblent démontrer qu'un neurone du CRG projetant au pTRG peut être rythmique.

- B) Aspects comparatifs avec les autres générateurs de la respiration chez les vertébrés
  - a. pTRG

Chez la lamproie, le pTRG a souvent été comparé au preBötC, le générateur de l'inspiration chez les mammifères, (Martel et al., 2007; Mutolo et al., 2007, 2010, 2011;

Gariépy et al., 2012a,b; Cinelli et al., 2013; 2014) ainsi qu'au générateur de la respiration pulmonaire chez la grenouille (Wilson et al., 2002; Cinelli et al., 2014). Par contre, le preBötC et le générateur de la respiration pulmonaire chez la grenouille sont localisés dans le bulbe rachidien (Smith et al., 1991 ; Wilson et al., 2002; Baghdadwala et al., 2015), alors que la localisation plus rostrale du pTRG correspond à celle du pont chez les mammifères. D'un point de vue anatomique, le pTRG est plutôt comparable à la région du noyau médial parabrachial/Köliker-Fuse des mammifères, ayant pour rôle de contrôler les transitions entre l'inspiration et l'expiration (Cohen, 1971; von Euler et al., 1976; von Euler, 1977; St-John et Zhou, 1991; Alheid et al., 2004; Rybak et al., 2008; Arata et al., 2010; révisé dans Dutschmann et Dick, 2012), ou même au noyau isthmique de la famille des anoues faisant partie de la grande famille des amphibiens (Kinkead et al., 1997; révisé dans Gargaglioni et Branco, 2004).

Sur le plan de la connectivité, les résultats de ma thèse ont démontré que le pTRG comprend des projections monosynaptiques vers les motoneurones respiratoires des deux côtés du cerveau. Des études anatomiques chez le rat indiquent que le preBötC possède des projections bilatérales vers la région du VRG, comprenant les neurones pré-moteurs respiratoires. Comme pour le pTRG, le preBötC comprend lui aussi des neurones projetant vers son homologue controlatéral (Tan et al., 2010). Il se trouve que l'ablation des gènes contrôlant la migration de ses axones commissuraux perturbe dramatiquement le rythme inspiratoire de même que sa synchronisation (Bouvier et al., 2010). Cette étude démontre également que ces axones commissuraux font partie d'une classe de neurones de type glutamatergiques. Des injections de Xylocaïne sur la ligne médiane au même niveau que les

pTRGs abolissent les réponses synaptiques dans un pTRG, pendant la stimulation du pTRG opposé. Ces connexions seraient en partie glutamatergiques, puisque l'injection d'antagonistes glutamatergiques dans un pTRG, entraîne une diminution importante des PPSEs enregistrés dans un motoneurone, pendant la stimulation du pTRG opposé.

À cet égard, l'hypothèse concernant l'origine de la rythmogenèse respiratoire veut que des neurones respiratoires présentant des propriétés rythmogènes intrinsèques forment de petits groupes interconnectés par des connexions glutamatergiques : a « group pacemaker hypothesis » (Del Negro et Hayes, 2008 ; révisé dans Feldman et al., 2013). Notamment, le rôle du glutamate a été démontré comme jouant un rôle crucial dans la rythmogenèse respiratoire (Greer et al., 1991), ainsi que dans l'activation de neurones démontrant des propriétés rythmiques intrinsèques dans le preBötC (Pace et al., 2007; Pace et Del Negro, 2008). En ce sens, l'application d'antagonistes glutamatergiques dans le pTRG de la lamproie est également connue pour abolir la respiration rapide (Martel et al., 2007, Cinelli et al., 2013), alors que la perfusion d'agonistes des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de classe I et II augmente la fréquence du rythme et l'amplitudes des bouffées respiratoires (Bongianni et al., 2002). Le pTRG de la lamproie partage sans aucun doute plusieurs similarités avec d'autres générateurs de vertébrés, mais plusieurs contradictions, notamment sur le plan anatomique, rendent difficile la comparaison directe avec ces derniers.

#### b. CRG

La fréquence du rythme respiratoire lent de la lamproie se rapproche davantage de celle de la respiration pulmonaire chez les amphibiens (Wilson et al., 2002). En termes de

localisation, le CRG est comparable au générateur de la respiration buccale des amphibiens. Ce dernier étant caudal au générateur de la respiration pulmonaire, comme le CRG est caudal au pTRG. Cependant, le générateur de la respiration buccale et pulmonaire de la grenouille sont tous les deux situés dans une région équivalente au bulbe des mammifères, similaire au CRG (Baghdadwala et al., 2015 ; Wilson et al., 2002). Par contre,

À des fins de comparaison entre les différents générateurs de la respiration, le rôle de neuropeptides, tels que les opiacés et la substance P a été observé. L'application d'agonistes des récepteurs  $\mu$ -opiacés au niveau du PreBötC (Gray et al., 1999), du générateur de la respiration pulmonaire des amphibiens, de même qu'au niveau du pTRG (Mutolo et al., 2007) engendre des périodes d'apnée (Vasilakos et al., 2005). A l'inverse, les agonistes des récepteurs  $\mu$ -opiacés n'ont pas d'effet sur le RTN/pFRG des mammifères (Janczewski et al., 2002) et la respiration buccale des amphibiens (Vasilakos et al., 2005). Les résultats de ma thèse ont montré que ces mêmes drogues sont capables d'abolir temporairement le rythme respiratoire lent chez la lamproie, comme c'est le cas pour le pTRG, le preBötC et la respiration pulmonaire des amphibiens.

Quant à elle, l'application de SP est également connue pour augmenter et embraser l'activité respiratoire, chez le chat, le lapin (Von Euler et Pernow, 1956), ainsi que chez le chien (Hahxiu et al., 1990). Chez les rongeurs, l'injection de SP dans le preBötC et le RTN/pFRG augmente le rythme respiratoire et engendre d'importantes dépolarisations membranaires dans les neurones pre-I, respectivement (Gray et al., 1999 ; Onimaru et al., 2012). Finalement, l'application de SP dans le pTRG, ou dans le CRG, a pour effet d'augmenter la fréquence du rythme rapide et lent respectivement.

Une étude récente a démontré que le rythme respiratoire lent de la lamproie est modulé par le CO<sub>2</sub>/pH (Hoffman et al., 2015). Cette sensibilité au CO<sub>2</sub>/pH présuppose la présence de chimiorécepteurs dans la région qui génère le rythme lent et que cet aspect particulier aurait pu jouer un rôle important dans l'évolution du système respiratoire des vertébrés (Hoffman et al., 2015). La région du RTN/pFRG, localisée en périphérie du noyau moteur facial, est aussi connue pour être sensible aux variations de CO<sub>2</sub>/pH (pour revue, voir Guyenet et Bayliss, 2015). Finalement, tout comme pour le preBötC, l'application d'antagonistes glutamatergiques dans le CRG est capable d'abolir temporairement le rythme respiratoire lent.

Ensemble, ces résultats génèrent davantage de questions quant à l'homologie entre le CRG et les autres générateurs respiratoires chez les vertébrés à travers l'évolution. Les résultats de ma thèse tendent à suggérer que la localisation et l'organisation rostro-caudale des réseaux de neurones du CRG est similaire à celle des colonnes respiratoires ventrales (VRC) contenant des régions impliquées dans la genèse de l'inspiration et de l'expiration dans le bulbe rachidien des mammifères (révisé dans Feldman et Del Negro, 2006). Bien que la respiration des mammifères soit caractérisée par des phases inspiratoires et expiratoires pouvant être passives ou actives, la lamproie ne possède qu'une phase expiratoire active et une phase inspiratoire passive variant en fréquence selon l'état de l'animal. De plus, sur le plan physiologique, le CRG partage plusieurs points communs avec les générateurs de la respiration chez les mammifères compris dans le VRC, tels que le preBötC et le RTN/pFRG. Néanmoins, plus d'études sur le plan développemental des origines des générateurs de la respiration chez la lamproie sont nécessaires afin de pouvoir établir une comparaison fondée entre les générateurs de la respiration chez les vertébrés.

## **Conclusion et perspectives futures**

Les travaux de ma thèse ont permis de caractériser davantage les réseaux neuronaux responsables de générer les deux rythmes respiratoires de la lamproie, soit le rythme rapide (pTRG) et le rythme lent (CRG). Les réseaux neuronaux du pTRG et du CRG partagent plusieurs points communs, soit : des neurones affichant des propriétés rythmiques, ainsi que des connexions bilatérales et unilatérales leur permettant de synchroniser et de coordonner l'activité rythmique des muscles respiratoires des branchies, afin de permettre les échanges gazeux entre le milieu aqueux et la lamproie.

En utilisant la méthode d'enregistrement intracellulaire de « patch » nous avons réussi à enregistrer des neurones unitaires du pTRG et du CRG, dans le but de confirmer leur rôle dans la genèse respiratoire, ainsi que de caractériser plus spécifiquement les projections des neurones du pTRG et du CRG. Dans le futur, il serait intéressant de détailler davantage les connexions uni- et bilatérales entre les générateurs (pTRG et CRG) et les motoneurones respiratoires. Des neurones des générateurs pourraient être enregistrés en « patch » pendant que l'activité des motoneurones respiratoires serait enregistrée simultanément en intracellulaire. Ces expériences permettraient de mieux évaluer l'apport d'un neurone des générateurs aux motoneurones. La présence de courants synaptiques dans les motoneurones pourrait être observée, afin de savoir si un neurone du pTRG est capable d'activer un ou plusieurs motoneurones à la fois. Des marqueurs anatomiques pourraient également être inclus dans les micropipettes d'enregistrement, de sorte que nous puissions examiner les réseaux de projection de neurones générateurs vers les motoneurones respiratoires.

L'hypothèse du « group pacemaker » veut que des neurones générateurs possédant des propriétés rythmiques intrinsèques soient interconnectés par des connexions glutamatergiques (Del Negro et Hayes, 2008 ; révisé dans Feldman et al., 2013). En ce sens, il a été démontré que la perfusion de riluzole et de flufenamate, connue pour bloquer les  $I_{nap}$  et les  $I_{can}$ , respectivement, abolit l'activité respiratoire dans une préparation de tronc cérébral *in vitro* de la lamproie (Mutolo et al., 2010). Le rôle potentiel que pourraient jouer les  $I_{nap}$  et les  $I_{can}$  quant aux propriétés intrinsèques rythmiques des neurones générateurs pourrait être étudié. Des neurones des générateurs seraient enregistrés et nous les isolerions du réseau de la respiration par la perfusion en bain d'antagonistes glutamatergiques. La présence, ou non, d'oscillations rythmiques sous-liminaire serait observée. Du riluzole et/ou du flufenamate pourraient être perfusés à leur tour, afin d'essayer d'abolir ces oscillations.

Les connexions entre les générateurs de chaque côté du cerveau pourraient également être étudiées. Un générateur pourrait être stimulé électriquement, ou pharmacologiquement, pendant que des neurones du générateur opposé seraient enregistrés en « patch » mode cellule entière. La contribution des entrées excitatrices et inhibitrices serait ensuite évaluée.

Enfin, nous pourrions tirer profit des techniques d'imagerie calciques développées au laboratoire pour évaluer la dynamique temporelle de l'activité des neurones des générateurs. Ces expériences nous permettraient de déterminer quel est le pourcentage de neurones des générateurs présentant une activité synchronisée et en lien avec la respiration. Nous pourrions également observer si des populations de neurones sont actives lors des différentes phases du cycle respiratoire.

Les résultats obtenus chez la lamproie, ainsi que les résultats de ma thèse suggèrent que plusieurs mécanismes impliqués dans la rythmogénèse respiratoire sont conservés à travers les vertébrés. Cependant, le manque de données portant sur les origines développementales des générateurs de la respiration chez la lamproie limite notre connaissance concernant l'évolution de ces réseaux au sein de la famille des vertébrés. Des outils génétiques ont été développés chez les mammifères dans le but d'identifier plus précisément l'origine développementale des différentes populations de neurones impliquées dans la genèse respiratoire (Feldman et al., 2013). Il est maintenant connu que les neurones rythmiques du preBötC sont dérivés de cellules exprimant le facteur de transcription génétique Dbx-1 (Bouvier et al., 2010), alors que ceux du RTN/pFRG peuvent être identifiés par le marqueur génétique Phox2B (Onimaru et al., 2008). L'identification de ces facteurs de transcription au niveau des réseaux respiratoires de la lamproie représenterait donc une avancée importante quant à la comparaison entre les différents générateurs de la respiration chez les vertébrés. En ce sens, l'hybridation *in situ* a récemment été développée chez la lamproie (Albersheim-Carter et al., 2015) et l'utilisation de cette technique pourrait nous permettre de savoir si les neurones du pTRG et du CRG de la lamproie expriment Dbx-1 et Phox2B.

En conclusion, les résultats de ma thèse nous ont permis de caractériser davantage les circuits neuronaux responsables de générer, coordonner et synchroniser l'activité respiratoire de la lamproie. Bien que l'on savait déjà que les rythmes respiratoires rapide et lent étaient générés dans le pTRG et la partie caudale du rhombencéphale, respectivement, les réseaux de connexions de ces réseaux respiratoires demeuraient inconnus. Les travaux de ma thèse ont

notamment démontré que le pTRG possède des populations/neurones projetant vers son homologue controlatéral, ainsi que vers les motoneurones des deux côtés et que le CRG semble être défini par des réseaux de neurones distribués tout au long des pools de motoneurones respiratoires. Le CRG contient lui aussi des populations de neurones projetant vers son homologue controlatéral, ainsi que vers le pTRG. Tel que mentionné ci-haut, plusieurs expériences pourraient être réalisées dans le but d'approfondir nos connaissances sur le rôle des connexions au sein de ces réseaux, de même que les mécanismes sous-tendant la genèse respiratoire. Il serait tout aussi important de s'attarder à la question concernant l'évolution de réseaux respiratoires de la lamproie par rapport aux autres vertébrés. À cet égard, le modèle de la lamproie présente plusieurs avantages, dont : un système nerveux moins complexe que celui des mammifères, la possibilité d'enregistrer l'activité respiratoire pendant une longue période de temps, ainsi que la possibilité d'enregistrer des groupes et/ou des neurones à même les réseaux de la respiration intacts. Les connaissances amassées chez un vertébré basal tel que la lamproie pourraient, sans aucun doute, permettre une meilleure compréhension des réseaux qui contrôlent la respiration chez les mammifères et même chez l'homme.

## Bibliographie

Albersheim-Carter J, Blubaum A, Ballagh IH, Missaghi K, Siuda ER, McMurray G, Bass AH, Dubuc R, Kelley DB, Schmidt MF, Wilson RJ, Gray PA. (2016) Testing the evolutionary conservation of vocal motoneurons in vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 224:2-10.

Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR. (2004) Pontine influences on breathing: an overview. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 143:105-114.

Anders K, Ballantyne D, Bischoff AM, Lalley PM, Richter DW. (1991) Inhibition of caudal medullary expiratory neurones by retrofacial inspiratory neurones in the cat. *Journal of Physiology*. 437:1-25.

Arata A, Tanaka I, Fujii M, Ezure K. (2010) Active inspiratory-expiratory phase switching mechanism exists in the neonatal nucleus parabrachialis. *Advances in Experimental Medicine and biology*. 669:135-138.

Aristote (350 avant JC) On youth and old age, on life and death, on breathing. Traduit par Ross, G.R.T. MIT Classics. Consulté en ligne ([http://classics.mit.edu//Aristotle/longev\\_short.html](http://classics.mit.edu//Aristotle/longev_short.html))

Baghdadwala MI, Duchcherer M, Paramonov J, Wilson RJ. (2015) Three brainstem areas involved in respiratory rhythm generation in bullfrogs. *Journal of Physiology*. 593(13):2941-54.

- Bellingham MC, Lipski J. (1992) Morphology and electrophysiology of superior laryngeal nerve afferents and postsynaptic neurons in the medulla oblongata of the cat. *Neuroscience*. 48:205-216.
- Berger AJ. (2000) Determinants of respiratory motoneuron output. *Respiratory Physiology* 122:259–269.
- Bertrand F, Hugelin A, Tarrade T. (1971) [Apnea produced by punctiform injury of the pons in vagotomized cats]. *Journal of Physiology (Paris)*. 63(2):12A.
- Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiological Reviews*. 75(1):1-45.
- Boers J, Kirkwood PA, de Weerd H, Holstege G. (2006) Ultrastructural evidence for direct excitatory retroambiguus projections to cutaneous trunci and abdominal external oblique muscle motoneurons in the cat. *Brain Research Bulletin*. 68:249-256.
- Boers J, Klop EM, Hulshoff AC, de Weerd H, Holstege G. (2002) Direct projections from the nucleus retroambiguus to cricothyroid motoneurons in the cat. *Neuroscience Letters*. 319(1):5-8.
- Bongianni F, Corda M, Fontana G, Pantaleo T. (1990) Expiration-related neurons in the caudal ventral respiratory group of the cat: influences of the activation of Bötzing complex neurons. *Brain Research*. 526:299-302.

- Bongianni F, Mutolo D, Carfi M, Pantaleo T. (2002) Group I and II metabotropic glutamate receptors modulate respiratory activity in the lamprey. *European Journal of Neuroscience*. 16(3):454-460.
- Bonis JM, Neumueller SE, Marshall BD, Krause KL, Qian B, Pan LG, Hodges MR, Forster HV. (2011) The effects of lesions in the dorsolateral pons on the coordination of swallowing and breathing in awake goats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 175:272–282.
- Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chédotal A, Fortin G. (2010) Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nature Neuroscience*. 13:1066-1074.
- Breuer J. (1868) Die selbststeuerung der athmung durch den *nervus vagus*. *Aus dem physiol. Laboratorium der k. k. Josephs-Akademie*.
- Brocard F, Dubuc R. (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *Journal of Neurophysiology* 90:1714–1727.
- Brocard F, Ryczko D, Fénelon K, Hatem R, Gonzales D, Auclair F, Dubuc R. (2010) The transformation of a unilateral locomotor command into a symmetrical bilateral activation in the brainstem. *Journal of Neuroscience*. 30(2):523-533.
- Buchanan JT, Grillner S. (1987) Newly identified 'glutamate interneurons' and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science*. 236(4799):312-314.

- Cheung T. (2013) Limits of Life and Death: Legallois's Decapitation Experiments. *Journal of the History of Biology*. 46(2):283-313.
- Cinelli E, Robertson B, Mutolo D, Grillner S, Pantaleo T, Bongianni F. (2013) Neuronal mechanisms of respiratory pattern generation are evolutionary conserved. *Journal of Neuroscience*. 22;33(21):9104-9112.
- Cinelli E, Mutolo D, Robertson B, Grillner S, Contini M, Pantaleo T, Bongianni F. (2014) GABAergic and glycinergic inputs modulate rhythmogenic mechanisms in the lamprey respiratory network. *Journal of Physiology*. 15;592(Pt 8):1823-1838.
- Cinelli E, Mutolo D, Contini M, Pantaleo T, Bongianni F. (2016) Inhibitory control of ascending glutamatergic projections to the lamprey respiratory rhythm generator. *Neuroscience*. 21;326:126-140.
- Cohen MI. (1971) Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *Journal of Physiology*. 217:133–158.
- Cohen AH, Ermentrout GB, Kiemel T, Kopell N, Sigvardt KA, Williams TL. (1992) Modelling of intersegmental coordination in the lamprey central pattern generator for locomotion. *Trends Neurosci*. 15(11):434-438.
- Cohen MI, Shaw CF. (2004) Role in the inspiratory off-switch of vagal inputs to rostral pontine inspiratory-modulated neurons. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 143:127–140.

Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL. (1990) Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. *American Journal of Physiology*. 258:L33-44.

Curtis, JG. (2015) *Harvey's Views on the Use of the Circulation of the Blood*. Columbia University Press, New-york. 102 p. Consulté en ligne (<https://books.google.ca/books?id=yKksBgAAQBAJ&lpg=PT16&ots=T-7d7b7ph2&dq=Life%20and%20respiration%20are%20convertible%20terms%2C%20for%20there%20is%20no%20life%20without%20breathing%2C%20and%20no%20breathing%20without%20life&hl=fr&pg=PT16#v=onepage&q=Life%20and%20respiration%20are%20convertible%20terms,%20for%20there%20is%20no%20life%20without%20breathing,%20and%20no%20breathing%20without%20life&f=false>)

Davies RO, Edwards MW Jr. (1973) Distribution of carotid body chemoreceptor afferents in the medulla of the cat. *Brain Research*. 64:451-454.

Debru A. (2000) Les conceptions de la respiration dans l'Antiquité., *Med Sci (Paris)*, Vol. 16, N° 2; p.243-7 <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/1628#sthash.CUsmSrkm.dpuf>

de Castro D, Lipski J, Kanjhan R. (1994) Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. *Brain Research*. 639:49-56.

Del Negro CA, Hayes JA. (2008) A 'group pacemaker' mechanism for respiratory rhythm generation. *Journal of Physiology*. 1;586(9):2245-6.

- Del Negro CA, Koshiya N, Butera RJ Jr, Smith JC. (2002) Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 88:2242-2250.
- Derjean D, Moussaddy A, Atallah E, St-Pierre M, Auclair F, Chang S, Ren X, Zielinski B, Dubuc R. (2010) A novel neural substrate for the transformation of olfactory inputs into motor output. *PLoS Biology*. 21;8(12):e1000567.
- Duffin J, Li YM. (2006) Transmission of respiratory rhythm: midline-crossing connections at the level of the phrenic motor nucleus? *Respir Physiol Neurobiol*. 28;153(2):139-47.
- Dutschmann M, Dick TE. (2012) Pontine mechanisms of respiratory control. *Comprehensive Physiology*. 2(4):2443-69.
- Dutschmann M, Herbert H. (2006) The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *European Journal of Neuroscience*. 24:1071–1084.
- Dutschmann M, Jones SE, Subramanian HH, Stanic D, Bautista TG. (2014) The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Progress in Brain Research*. 212:113-30.
- Eldridge FL, Millhorn DE, Waldrop TG. (1981) Exercise hyperpnea and locomotion: parallel activation from the hypothalamus. *Science*. 211(4484):844-6.
- Ellenberger HH, Feldman JL. (1990) Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Research*. 513:35–42.

- Ezure K, Tanaka I. (2006) Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat. *Neuroscience*. 141:1011–1023.
- Ezure K, Tanaka I, Saito Y. (2003) Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *Neuroscience Research*. 45:41-51.
- Fagerstedt P, Zelenin PV, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S. (2000) Crossed reciprocal inhibition evoked by electrical stimulation of the lamprey spinal cord. *Experimental Brain Research*. 134(2):147-54.
- Faraday M, Crookes W. (1861). *A Course of Six Lectures on the Chemical History of a Candle*. Harper & Brother, New-York. 208 p. Consulté en ligne (<https://archive.org/details/acoursesixlectu01croogoo>)
- Fedorko L, Merrill EG. (1984) Axonal projections from the rostral expiratory neurones of the Bötzing complex to medulla and spinal cord in the cat. *Journal of Physiology*. 350:487-496.
- Feldman JL, Del Negro CA. (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nature Reviews in Neuroscience*. 7:232-242.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA. (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual Review in Physiology*. 75:423-52.
- Feldman JL, Gautier H. (1976) Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *Journal of Neurophysiology*. 39:31–44.

- Feldman JL, Kam K. (2015) Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: taking a few breaths may help. *Journal of Physiology*. 593(1):3-23.
- Feldman JL, Loewy AD, Speck DF. (1985) Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. 5(8):1993-2000.
- Fulwiler CE, Saper CB. (1984) Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research*. 319:229–259.
- Gandevia B. (1970a) The breath of life: an essay on the earliest history of respiration: part I. *Austrian Journal of Physiotherapy*. 16(1):5-11.
- Gandevia B. (1970b) The breath of life: an essay on the earliest history of respiration: part ii. *Austrian Journal of Physiotherapy*. 1970 Jun;16(2):57-69.
- Gargaglioni LH, Branco LG. (2004) Nucleus isthmi and control of breathing in amphibians. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 143(2-3):177-86.
- Gariépy JF, Missaghi K, Chartré S, Robert M, Auclair F, Dubuc R. (2012a ) Bilateral connectivity in the brainstem respiratory networks of lampreys. *Journal of Comparative Neurology*. 1;520(7):1442-56.
- Gariépy JF, Missaghi K, Chevallier S, Chartré S, Robert M, Auclair F, Lund JP, Dubuc R. (2012b ) Specific neural substrate linking respiration to locomotion. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 10;109(2):E84-92.

- Gerrits PO, Holstege G. (1996) Pontine and medullary projections to the nucleus retroambiguus: a wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase and autoradiographic tracing study in the cat. *Journal of Comparative Neurology*. 373(2):173-85.
- Gestreau C, Dutschmann M, Obled S, Bianchi AL. (2005) Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 147:159–176.
- Giraudin A, Cabirol-Pol MJ, Simmers J, Morin D. (2008) Intercostal and abdominal respiratory motoneurons in the neonatal rat spinal cord: spatiotemporal organization and responses to limb afferent stimulation. *Journal of Neurophysiology*. 99:2626-2640
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiario CM, Feldman JL. (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science*. 286:1566–1568.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. (1991) Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *Journal of Physiology*. 437:727-749.
- Grillner S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. (2003) *Nature Reviews in Neuroscience*. 4(7):573-86.
- Guertin P, Dubuc R. (1997) Effects of stimulating the reticular formation during fictive locomotion in lampreys. *Brain Research*. 753(2):328-34.
- Guimond JC, Auclair F, Lund JP, Dubuc R. (2003) Anatomical and physiological study of respiratory motor innervation in lampreys. *Neuroscience*. 122(1):259-66.

- Guyenet PG, Bayliss DA. (2015) Neural Control of Breathing and CO<sub>2</sub> Homeostasis. *Neuron*. 87(5):946-61.
- Guyenet PG, Mulkey DK. (2010) Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 173(3):244-55.
- Haxhiu MA, Cherniack NS, van Lunteren E. (1990) Central action of tachykinins on activity of expiratory pumping muscles. *Journal of Applied Physiology*. 69(6):1981-6.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB. (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 293:540–580.
- Hoffman M, Taylor BE, Harris MB. (2015) Evolution of lung breathing from a lungless primitive vertebrate. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. pii: S1569-9048(15)30053-7.
- Holstege G. (1989) Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *Journal of Comparative Neurology*. 284(2):242-52.
- Janczewski WA, Feldman JL. (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *Journal of Physiology*. 570:407-420.
- Janczewski WA, Karczewski WA. (1990) The role of neural connections crossed at the cervical level in determining rhythm and amplitude of respiration in cats and rabbits. *Respiratory Physiology*. 79(2):163-75.

- Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL. (2002) Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. *Journal of Physiology*. 15;545(Pt 3):1017-26.
- Jordan D. (1996) Central nervous mechanisms in cough. *Pulmonary pharmacology*. 9:389-392.
- Jordan D, Spyer KM. (1977) Studies on the termination of sinus nerve afferents. *Pflügers. Archives*. 369:65-73.
- Kalia M, Mesulam MM. (1980a) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *Journal of Comparative Neurology*. 193:435-465.
- Kalia M, Mesulam MM. (1980b) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *Journal of Comparative Neurology*. 193:467-508.
- Kawasaki R. (1981) Artificial pacemaking of breathing movements by medullary stimulation in adult lampreys. *Japanese Journal of Physiology*. 31(4):571-83.
- Kawasaki R. (1984) Breathing rhythm-generation mechanism in the adult lamprey (*Lampetra japonica*). *Japanese Journal of Physiology*. 34(2):319-35.
- Kinkead R, Harris MB, Milsom WK. (1997) The role of the nucleus isthmi in respiratory pattern formation in bullfrogs. *Journal of Experimental Biology*. 200(Pt 12):1781-93.

- Koizumi H, Nomura K, Yokota Y, Enomoto A, Yamanishi T, Iida S, Ishihama K, Kogo M. (2009) Regulation of trigeminal respiratory motor activity in the brainstem. *Journal of Dental Research*. 88(11):1048-53.
- Kozlov A, Huss M, Lansner A, Kotaleski JH, Grillner S. (2009) Simple cellular and network control principles govern complex patterns of motor behavior. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 106(47):20027-32.
- Lee KZ, Fuller DD. (2011) Neural control of phrenic motoneuron discharge. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 179(1):71-9.
- Lindsey BG, Rybak IA, Smith JC. (2012) Computational models and emergent properties of respiratory neural networks. *Comprehensive Physiology*. 2(3):1619-70.
- Lipski J. (1979) [Electrophysiological studies on the neuronal organization of the arterial chemoreceptors' reflex]. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 13:671-673.
- Loewy AD, Burton H. (1978) Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brainstem and spinal cord of the cat. *Journal of Comparative Neurology*. 181(2):421-49.
- Lumsden T. (1923a) The regulation of respiration: Part I. *Journal of Physiology*. 58:81-91.
- Lumsden T. (1923b) The regulation of respiration: Part II. Normal Type. *Journal of Physiology*. 58:111-126.
- Lumsden T. (1923c) Observations on the respiratory centres in the cat. *Journal of Physiology*. 58:153:160.

- Mantilla CB, Seven YB, Sieck GC. (2014) Convergence of pattern generator outputs on a common mechanism of diaphragm motor unit recruitment. *Progress in Brain Research*. 209:309-29.
- Martel B, Guimond JC, Gariépy JF, Gravel J, Auclair F, Kolta A, Lund JP, Dubuc R. (2007) Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon. *Neuroscience*. 10;148(1):279-93.
- Matsushima T, Grillner S. (1992) Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *Journal of Neurophysiology*. 67(2):373-88.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL. (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*. 37:821-826.
- Merrill EG. (1970) The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Research*. 24(1):11-28.
- Mentel T, Cangiano L, Grillner S, Büschges A. (2008) Neuronal substrates for state-dependent changes in coordination between motoneuron pools during fictive locomotion in the lamprey spinal cord. *Journal of Neuroscience*. 28(4):868-79.
- Merrill EG. (1981) Where are the real respiratory neurons? *Federation Proceedings*. 40:2389-2394.

- Monteau R, Hilaire G. (1991) Spinal respiratory motoneurons. *Progress in neurobiology*. 37:83-144.
- Mörschel M, Dutschmann M. (2009) Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 12;364(1529):2517-26.
- Mutolo D, Bongiani F, Cinelli E, Pantaleo T. (2010) Role of neurokinin receptors and ionic mechanisms within the respiratory network of the lamprey. *Neuroscience*. 1;169(3):1136-49.
- Mutolo D, Bongiani F, Einum J, Dubuc R, Pantaleo T. (2007) Opioid-induced depression in the lamprey respiratory network. *Neuroscience*. 12;150(3):720-9.
- Mutolo D, Cinelli E, Bongiani F, Pantaleo T. (2011) Identification of a cholinergic modulatory and rhythmogenic mechanism within the lamprey respiratory network. *Journal of Neuroscience*. 14;31(37):13323-32.
- Norman JL, (2011) *The Ins and Outs of Breathing. How we Learnt about the Body's most Vital Function*. iUniverse, Bloomington. 284 p.
- Norgren R. (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience*. 3(2):207-18.
- Norgren R, Leonard CM. (1971) Taste pathways in rat brainstem. *Science*. 173:1136–1139.

- Onimaru H, Arata A, Homma I. (1997) Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using in vitro preparation. *Japanese Journal of Physiology*. 47(5):385-403.
- Onimaru H, Ballanyi K, Homma I. (2003) Contribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro. *Journal of Physiology*. 552:727-741.
- Onimaru H, Homma I. (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *Journal of Neuroscience*. 15;23(4):1478-86.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. (2008) CO<sub>2</sub>-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *Journal of Neuroscience*. 28:12845-12850.
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. (2012) Postsynaptic mechanisms of CO<sub>2</sub> responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *Journal of Physiology*. 590(7):1615-24.
- Otake K, Sasaki H, Ezure K, Manabe M. (1989) Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. *Journal of Comparative Neurology*. 286:218-230.
- Pace RW, Mackay DD, Feldman JL, Del Negro CA. (2007) Inspiratory bursts in the preBötzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. *Journal of Physiology*. 582(Pt1):113-25.

- Pace RW, Del Negro CA. (2008) AMPA and metabotropic glutamate receptors cooperatively generate inspiratory-like depolarization in mouse respiratory neurons in vitro. *European Journal of Neuroscience*. 28(12):2434-42.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL. (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *Journal of Neuroscience*. 31:2895-2905.
- Rekling JC, Feldman JL. (1998) PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annual Review in Physiology*. 60:385-405.
- Ricardo JA, Koh ET. (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Research*. 153:1–26.
- Richter DW, Smith JC. (2014) Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology (Bethesda)*. 29(1):58-71.
- Rikard-Bell GC, Bystrzycka EK, Nail BS. (1984) Brainstem projections to the phrenic nucleus: A HRP study in the cat. *Brain Research Bulletin*. 12:469–477.
- Rikard-Bell GC, Bystrzycka EK, Nail BS. (1985) The identification of brainstem neurones projecting to thoracic respiratory motoneurons in the cat as demonstrated by retrograde transport of HRP. *Brain Research Bulletin*. 14:25–37.

- Rovainen CM. (1974) Respiratory motoneurons in lampreys. *Journal of Comparative Physiology*. 94(1): 57-68.
- Rovainen CM. (1977) Neural control of ventilation in the lamprey. *Federation Proceedings*. 36(10):2386-9.
- Rovainen CM. (1985) Respiratory bursts at the midline of the rostral medulla of the lamprey. *Journal of Comparative Physiology*. 157(3):303-9.
- Russell DF. (1986) Respiratory pattern generation in adult lampreys (*Lampetra fluviatilis*): interneurons and burst resetting. *Journal of Comparative Physiology*. 158(1):91-102.
- Rybak IA, O'Connor R, Ross A, Shevtsova NA, Nuding SC, Segers LS, Shannon R, Dick TE, Dunin-Barkowski WL, Orem JM, Solomon IC, Morris KF, Lindsey BG. (2008) Reconfiguration of the pontomedullary respiratory network: a computational modeling study with coordinated in vivo experiments. *Journal of Neurophysiology*. 100:1770-1799.
- Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Nuding SC, Segers LS, Lindsey BG. (2004) Pontine respiratory group neuron discharge is altered during fictive cough in the decerebrate cat. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 142:43–54.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. (1991) Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*. 254:726-729.

- Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, Otto MR, Feldman JL. (1989) Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *Journal of Comparative Neurology*. 1;281(1):69-96.
- Song G, Li Q, Shao FZ. (2000) GABAergic neurons in Kölliker-Fuse nucleus and Bötzing complex with axons projecting to phrenic nucleus. *Acta Physiologica Sinica*. 52:167-169.
- St-John WM. (2009) Noeud vital for breathing in the brainstem: gasping--yes, eupnoea--doubtful. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 364:2625-2633.
- St-John WM, Zhou D. (1991) Rostral pontine mechanisms regulate durations of expiratory phases. *Journal of Applied Physiology*. 71:2133-2137.
- St-John WM, Paton JF. (2004) Role of pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 143:321-332.
- Subramanian HH, Holstege G. (2009) The nucleus retroambiguus control of respiration. *Journal of Neuroscience*. 29(12):3824-32.
- Tan W, Pagliardini S, Yang P, Janczewski WA, Feldman JL. (2010) Projections of preBötzing complex neurons in adult rats. *Journal of Comparative Neurology*. 15;518(10):1862-78.
- Tarras-Wahlberg S, Reikling JC. (2009) Hypoglossal motoneurons in newborn mice receive respiratory drive from both sides of the medulla. *Neuroscience*. 16;161(1):259-68.

- Thoby-Brisson M, Ramirez JM. (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *Journal of Neurophysiology*. 86:104-112.
- Thompson KJ. (1985) Organization of inputs to motoneurons during fictive respiration in the isolated lamprey brain. *Journal of Comparative Physiology*. 157(3):291-302.
- Vasilakos K, Wilson RJ, Kimura N, Remmers JE. (2005) Ancient gill and lung oscillators may generate the respiratory rhythm of frogs and rats. *Journal of Neurobiology*. 15;62(3):369-85.
- von Euler C. (1977) The functional organization of the respiratory phase-switching mechanisms. *Federation Proceedings*. 36:2375-2380.
- von Euler C, Marttila I, Remmers JE, Trippenbach T. (1976) Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 96:324–337.
- von Euler US, Pernow B. (1956) Neurotropic effects of substance P. *Acta Physiologica Scandinavica*. 36(3):265-75.
- Wallois F, Gros F, Masmoudi K, Larnicol N. (1995) C-Fos-like immunoreactivity in the cat brainstem evoked by sneeze-inducing air puff stimulation of the nasal mucosa. *Brain Research*. 687:143–154.

- Wang X, Hayes JA, Revill AL, Song H, Kottick A, Vann NC, LaMar MD, Picardo MC, Akins VT, Funk GD, Del Negro CA. (2014) Laser ablation of Dbx1 neurons in the pre-Bötzinger complex stops inspiratory rhythm and impairs output in neonatal mice. *Elife*. 15;3:e03427.
- Wang J, Irnaten M, Venkatesan P, Evans C, Baxi S, Mendelowitz D. (2002) Synaptic activation of hypoglossal respiratory motoneurons during inspiration in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*. 3:195–199.
- Wilson RJ, Vasilakos K, Harris MB, Straus C, Remmers JE. (2002) Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *Journal of Physiology*. 15;540(Pt 2):557-70.
- Zheng Y, Riche D, Rekling JC, Foutz AS, Denavit-Saubie M. (1998) Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Research*. 782:113-125.